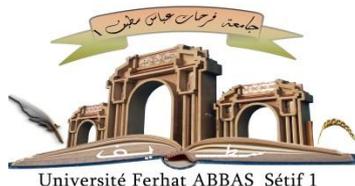


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SETIF1- FERHAT ABBAS

FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

THÈSE

Présentée au Département de génie des procédés

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Domaine : Sciences et Technologie

Filière: Génie des procédés

**Option: Génie des procédés
pharmaceutiques**

Par

BOUKEZZOULA Amina

THÈME

**Préparation et caractérisation physico-chimique des nanoparticules à base
d'extrait de grenade et évaluation des activités biologique**

Soutenue le 25/02/2025 devant le Jury:

BOUGUETTOUCHA Abdallah	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Président
BOUDEMAGH Djalila	M.C.A	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Directeur de thèse
BOUNEKHEL Mahmoud	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Co-Directeur
CHEBLI Derradji	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Examineur
BELHADJI Amel	M.C.A	Univ. Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem	Examinatrice
MOKHNACHE Kamel	M.C.A	Universite Hassiba Benbouali, Chlef	Examineur
DHAMNA saliha	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Invitée

Remerciements

Une thèse est le fruit d'une multitude de rencontres, de volontés encouragées et encourageantes, d'efforts conjoints, de réflexions, de soutiens, de questions et de réponses partagées. Ce travail n'a pas fait exception à la règle. A ce titre, je tiens à remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'avancement et à la réussite de ce travail, ainsi qu'à mon épanouissement personnel.

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Dr BOUDEMAGH Djalila, pour la confiance qu'elle m'a accordé, pour ses précieux conseils scientifiques, pour son soutien, ses critiques constructives et ses encouragements, sa grande disponibilité et l'aide inestimable que vous m'avez apportée tout au long de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier profondément mon co -directeur de thèse, Monsieur le professeur BOUNEKHEL Mahmoud pour m'avoir orienté durant ces années avec beaucoup de patience et de professionnalisme et pour l'intérêt qu'il a apporté à mon travail.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Madame le Professeur DHAMNA saliha Professeur de l'université Ferhat Abbas Sétif-1 pour la confiance qu'elle a donnée. Je tiens à la remercier pour sa contribution à la réalisation de la partie extraction et partie biologique. Ainsi que pour ses recommandations au cours de travail dans son laboratoire.

Je tiens à remercier le Professeur ESHAMAILEH Ehab, enseignant en chimie à l'Université de Jordanie, pour avoir généreusement accepté de m'accueillir dans son laboratoire.

Je vous suis profondément reconnaissant pour l'énergie, les conseils précieux tout au long de mes séjours au laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements à madame PALKO Nadezhda et madame GRISHINA Maria pour leur contribution dans la réalisation de la partie étude de simulation. Je tiens à les remercier pour leur professionnalisme et sérieux au travail.

J'adresse mes remerciements également à Monsieur Chawki BENSOUICI, Chef de service du Laboratoire de Biochimie au Centre National en Biotechnologie (Constantine), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et m'avoir procuré l'appui et l'aide pour accomplir ce travail.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements au président du jury, le Professeur BOUGUETTOUCHA Abdallah, de l'université Ferhat Abbas Sétif-1, pour l'honneur considérable qu'il me fait en acceptant de présider la soutenance de ma thèse de doctorat.

Je souhaite exprimer une nouvelle fois ma gratitude envers Madame le Professeur DHAMNA saliha pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance acceptés de faire partie du jury de soutenance en tant qu'invités.

Je suis reconnaissant envers monsieur, le Professeur CHEBLI Derraji à l'université Ferhat Abbas Sétif-1, madame BELHADJI Amel Maître de conférences à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et monsieur MOKHNACHE Kamel Maître de conférences à l'université Hassiba Ben Bouali Chlef pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

Enfin, je tiens à exprimer mes pensées à mes proches qui m'ont soutenue tout au long de mes études : mes parents BOUKEZZOULA Abdelkarim et MEROUANI Hadda, mon mari SEBAI Housseem, ma fille Djannat errahman, ma sœur Chaima, mes frères Ali et Abd erraouf et toute ma famille.

Résumé

La méthode de nanopréciipitation a été utilisée afin d'encapsuler des composés bioactifs et améliorer leurs caractéristiques. L'objectif de ce travail est d'encapsuler des extraits de la peau jaune de grenade. Les constituants bioactifs sont extraits, puis analysés qualitativement et quantitativement par LC-MS. Les résultats ont montré que les trois extraits de la peau de grenade (aqueux, méthanoïque et hydro-éthanolique) sont riches en composés phénoliques. Les tests des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes in vitro des différents extraits ont révélé une activité antioxydante remarquable, avec des valeurs IC₅₀ notables en ABTS (7,05±0,12µg/ml), CUPRAC (7,40±0,79 µg/ml) et GOR (6.03±1.12 µg/ml) pour l'extrait aqueux. En outre, l'extrait hydro-méthanoïque a montré une efficacité antibactérienne supérieure contre des souches bactériennes sélectionnées. Concernant, l'activité anti-inflammatoire, les trois extraits ont présenté un effet anti-inflammatoire puissant. Ces résultats sont confirmés par des analyses in silico explorant l'interaction entre des composés spécifiques et les extraits de la peau de grenade dans différents solvants. Les résultats de la partie encapsulation montrent que la gélatine est capable d'encapsuler avec succès les trois extraits de peau jaune de grenade entraînant la formation des nanocapsules d'extrait de peau de grenade. Les différentes caractérisations et mesures DRX, FTIR, AFM,MEB, potentiel Zeta et granulométrie ont confirmé la formation de nanoparticules issus des différents extraits de grenade. Cette étude souligne le potentiel très prometteur des nanoparticules d'extrait de peau de grenade, mettant en évidence leur capacité à améliorer la stabilité et la solubilité.

Mots-clés : peau jaune de grenade, composés phénoliques, activité antioxydante, anti-inflammatoire, activité antibactérienne, nanoencapsulation, gélatine.

Abstract

The nanoprecipitation method was used to encapsulate bioactive compounds and enhance their characteristics. This work aims to encapsulate extracts from the yellow peel of pomegranate. The bioactive constituents were extracted and analyzed qualitatively and quantitatively by LC-MS, showing that the three extracts are rich in phenolic compounds. In vitro tests for antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of the different extracts revealed remarkable antioxidant activity, with notable IC₅₀ values for ABTS ($7.05 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$), CUPRAC ($7.40 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$) and GOR ($6.03 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$) for the aqueous extract. In addition, the hydro-methanolic extract showed superior antibacterial efficacy against selected bacterial strains, while for anti-inflammatory activity, all three extracts possessed a potent anti-inflammatory effect. These results are confirmed by in silico analyses exploring the interaction between specific compounds and various solvents. The encapsulation results show that gelatin can successfully encapsulate the three pomegranate yellow peel extracts, leading to the formation of nanocapsules. Various characterizations and measurements, including XRD, FTIR, AFM, MEB, Zeta potential, and particle size analysis, confirmed the formation of nanoparticles from the different pomegranate extracts. This study underlines the promising potential of pomegranate skin extract nanoparticles, highlighting their ability to improve stability and solubility.

Keywords: pomegranate yellow peel, phenolic compounds, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, antibacterial activity, nanoencapsulation, gelatin.

ملخص

تم إجراء ابتكارات في أنظمة التغليف النانوية من أجل تغليف المركبات النشطة بيولوجيًا لتحسين خصائصها. والهدف من هذا العمل هو تغليف مستخلصات من القشرة الصفراء للرمان. وقد تم استخلاص المكونات النشطة بيولوجيًا وتحليلها نوعيًا وكميًا بواسطة LC-MS ، والتي أظهرت أن المستخلصات الثلاثة غنية بالمركبات الفينولية. وأظهرت الاختبارات المخبرية لأنشطتها المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والمضادة للبكتيريا نشاطًا ملحوظًا مضادًا للأكسدة، مع قيم IC_{50} ملحوظة لـ ABTS (0.12 ± 7.05 ميكروغرام/مل) و CUPRAC (0.79 ± 7.40 ميكروغرام/مل) و GOR (1.12 ± 6.03 ميكروغرام/مل) للمستخلص المائي. بالإضافة إلى ذلك، أظهر المستخلص المائي الميثانولي فعالية فائقة مضادة للجراثيم ضد سلالات بكتيرية مختارة، بينما بالنسبة للنشاط المضاد للالتهابات، فإن المستخلصات الثلاثة جميعها تمتلك تأثيراً قوياً. تم تأكيد هذه النتائج من خلال تحليلات في السيليكو لاستكشاف التفاعل بين مركبات محددة ومذيبات مختلفة. أظهرت نتائج جزء التغليف أن الجيلاتين قادر على تغليف مستخلصات قشر الرمان الأصفر الثلاثة بنجاح في كبسولات نانوية. أكدت التوصيفات والقياسات المختلفة، بما في ذلك XRD، و FTIR، و AFM، و MEB وإمكانات زيتا، وتحليل حجم الجسيمات، تكوين الجسيمات النانوية من مستخلصات الرمان المختلفة. تؤكد هذه الدراسة على الإمكانيات الواعدة جدًا للجسيمات النانوية لمستخلصات قشر الرمان، مما يبرز قدرتها على تحسين ثباتها وقابليتها للذوبان.

الكلمات المفتاحية: قشر الرمان الأصفر، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للبكتيريا، الكبسولات النانوية، الجيلاتين.

SOMMAIRE

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1
CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1 la grenade (<i>punica granatum L.</i>)	4
I.1.1 Généralité ; historique du <i>punica granatum L.</i>	4
I.1.2 description botanique (profil botanique)	4
A. Profil botanique du grenadier	4
B. Classification botanique	5
✓ Classification de Linné	5
✓ Classification APG III (2009)	6
I.1.2 Variétés du grenadier	6
I.1.3 Le grenadier en Algérie	7
I.1.4 Valeur nutritionnelle	8
I.1.5 Composition Phytochimique du grenadier	8
I.1.6 Propriétés thérapeutiques de grenade	11
A. activité Antioxydante	12
B. activité antiinflammatoire	13
C. Activité anti-COVID-19 de la grenade	13
D. Activité Anticancéreux	14
E. les applications environnementales de la grenade	14
I.2 l'encapsulation	15
I.2.1 Introduction	15
I.2.2 La microencapsulation	16
I.2.3 La nanoencapsulation	18
I.2.4 l'encapsulation de fruit de grenade <i>punica granatum</i>	20
I.2.5 Les technique de la micro/nano encapsulations	22
A. Le séchage par pulvérisation (spray drying)	22
B. La lyophilisation (freeze drying)	23
C. L'enrobage sur lit fluidisé (fluidized bed coating)	23
D. L'extrusion	23

E. Emulsification	24
F. l'émulsification-évaporation de solvant	24
G. La complexation par inclusion	25
H. La coacervation (Gélation ionique)	25
I. La nanoprécipitation	26
I.2.6 les Matériaux utilisée pour l'encapsulation	26
A. Polysaccharides	26
B. Les lipides	27
C. Polymères synthétiques	27
D. Protéines	27
1.2.7 La Gélatine	28
A. Composition chimique de la gélatine	29
B. Propriétés physicochimiques des gélatines	30
I.2.8 Caractéristiques physicochimiques des micro/nano particules	30
A. Taille	31
B. Efficacité d'encapsulation	31
C. Charge de surface	32

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES	33
II.1 Préparation de la matière végétale	33
II.2 Préparation de l'extrait	33
II.3 Dosage des polyphénols totaux	34
II.4 Dosage des flavonoïdes	34
II.5 Dosage des Tanins hydrolysables	35
II.6 Analyses LC-MS/MS (chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem)	35
II.7 Études de simulation	35
A. Algorithme MOPS	36
B. Modèle MERA	37
C. Algorithmes QSAR 3D CiS et CoMin	37
II.8 Activité antioxydante	38
A. Pouvoir de piégeage des radicaux libres DPPH•	38
B. Activité de piégeage de l'ABTS	39

C. Essai GOR* (radical libre galvinoxl)	39
D. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC)	40
E. Essai du pouvoir réducteur	40
F. Test de la phénanthroline	40
II.9 Effet anti-inflammatoire des extraits in vitro	41
II.10 Activité antibactérienne	41
➤ détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	42
II.11 Analyse statistique	43
II.12 Procédé de préparation des nanoparticules vides de gélatine	43
II.12.1 Préparation des nanoparticules vides de gélatine	43
II.12.2 Synthèse des nanoparticules a base des extraits de la peau de grenade	43
II.12.3 Caractérisation des nanoparticules des extraits de la peau de grenade	44
A. Potentiel Zéta	44
B. Analyse granulométrique par laser	44
C. Efficacité d'encapsulation	44
D. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	44
E. Microscopie à force atomique (Atomic force microscopy AFM)	45
F. L'analyse par diffraction des rayons X	45
G. La microscopie électronique à balayage (MEB)	45
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III RESULTATS ET DISCUSSION	46
III.1 Rendement de l'extraction	46
III.2 Teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins hydrolysables	46
III.3 Caractérisation des composés phénoliques par LC-MS	49
Tanins hydrolysables	53

Acides phénoliques	54
Flavonoïdes	54
Anthocyanes	55
Proanthocyanidine	55
III.4 Modélisation des complexes	58
A. Analyse des caractéristiques énergétiques des complexes	59
B. Prédiction de l'activité biologique et du métabolisme	60
III.5 Activité antioxydante	64
III.6 Activité anti-inflammatoire des extraits in vitro	67
III.7 Activité antibactérienne	69
➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice	71
III.8 Résultats de la caractérisation des nanoparticules chargées des extraits de peau de grenade	72
III.8.1 Caractérisation des nanoparticules vides et chargées d'extraits	72
A. Potentiel zeta	74
B. Analyse granulométrique par laser	75
C. L'efficacité d'encapsulation	77
D. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	79
E. Microscope a force atomique AFM	82
F. L'analyse par diffraction des rayons X	83
G. La microscopie électronique à balayage (MEB)	84
Conclusion et perspective	86
Les références bibliographiques	90

Liste des tableaux

Tableau I.1 quelque variétés de grenade	6
Tableau I.2 liste des variétés du grenadier en Algérie	7
Tableau I.3 Valeurs nutritionnelles de la grenade pour 100g de portion comestible.	8
Tableau I.4 Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes	9
Tableau I.5 quelques matériaux biopolymères utilisés pour la nano-encapsulation..	28
Tableau I.6 Nombre d'acides aminés ($\times 1000$ résidus) présents dans les deux types de gélatine.....	29
Tableau I.7 Propriétés physicochimiques des gélatines de types A et B.....	30
Tableau I.8 Stabilité des dispersions pour différentes valeurs de potentiel zêta	32
Tableau III.1 Rendement d'extraction, phénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux hydrolysables de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique.....	48
Tableau III.2 Liste des composés phénoliques détectés à partir des trois extraits par comparaison avec des standards authentiques par Hplc.....	51
Tableau III.3 Analyse HPLC-ESI-MSMS des extraits de peau jaune de grenade...	56
Tableau III.4 Energie totale (E, kJ/mol) des complexes d'acide gallique, de punicalagine- β , de punicalagine- α , de punicaline, d'acide tannique avec l'éthanol, l'eau et le méthanol.....	60
Tableau III.5 Probabilités prédites (P) du métabolisme (M), de l'activité antibactérienne (AB) et de l'activité antioxydante (AOX) pour les composés étudiés.....	60
Tableau III.6 Activité antioxydante de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de l'écorce jaune de grenade par DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^+$, essai de piégeage de GOR; CUPRAC, pouvoir réducteur et essai de phénanthroline.....	64
Tableau III.7 Activité antibacterienne de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de l'écorce jaune de grenade (no inh=non inhibé, not det= non detecté).....	70
Tableau III.8 Les résultats de potentiel zêta des nanoparticules obtenues.....	75
Tableau III.9 diamètre moyen et l'indice de polydispersité (PDI) des des nanoparticules de gélatine et des trois extraits.....	76
Tableau III.10 les résultats de l'efficacité d'encapsulation et le drug loading des trois extraits encapsulés.....	78

Liste des figures

Figure I.1 le fruit de grenade et ses composants.....	5
Figure I.2 Fonctionnalité de la micro et nano-encapsulation.....	16
Figure I.3 Illustration schématique comparant une microcapsule et une microsphère.....	17
Figure I.4 Structure représentative des nanocapsules a et des nanosphères b.....	18
Figure I.5 Approches descendantes et ascendantes pour la formulation de la nano-encapsulation.....	20
Figure II.1 La peau jaune sèche et broyer.....	33
Figure II.2 les étapes d'extraction (a)La filtration, (b) Concentration sous vide a l'aide d'un évaporateur, (c) l'extrait après évaporation, (d) extrait aqueux après lyophilisation.....	34
Figure II.3 photo représente la méthode de travail et de stérilisation pour déterminer la CMI.....	43
Figure III.1 résultats de dosage des polyphénols totaux(A) et flavonoïdes(B) sur microplaque.....	48
Figure III.2 Chromatogrammes LC-MS/MS des extraits aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de la peau jaune de grenade.....	52
Figure III.3 Structure des complexes de l'acide gallique (A), de la punicalagine- β (B), de la punicalagine- α (C), de la punicaline (D), de l'acide tannique (E) avec l'eau.....	59
Figure III.4 a) punicalagine- α complexée à EtOH, b) punicalagine- α complexée à H ₂ O.....	62
Figure III.5 Résultats de quelque activité antioxydante sur microplaque.	65
Figure III.6 Activité anti-inflammatoire des extraits de peau jaune de grenade in vitro.....	67
Figure III.7 photos représentent la zone d'inhibition des extraits (A= aqueux, M= méthanolique, E= hydroéthanolique) contre les bactéries utilisées. (E.Coli= <i>Esherishia coli</i> , Stph= <i>Staphylococcus aureus</i> , Ent= <i>Enterococcus feacalis</i> , PS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	71
Figure III.8 : une photo des microplaques représente les résultats de le CMI.....	72

Figure III.9 les suspensions de particules obtenues après la phase de nanopréciipitation de gélatine (G) et des extraits méthanolique (M), aqueux (A) et hydroethanolique (E).....	73
Figure III.10 les poudres obtenues après la lyophlisations des suspension de de gélatine (G) et des extraits méthanolique (M), aqueux (A) et hydroethanolique (E).....	73
Figure III.11 Analyse granulométrique des suspensions des nanoparticules de gélatine et des trois extraits.....	75
Figure III.12 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait aqueux brute et encapsulé.....	79
Figure III.13 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait methanolique brute et encapsulé.....	80
Figure III.14 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait hydro-ethanolique brute et encapsulé	81
Figure III.15 photo des films chargées des particules des extraits encapsulées sous un-Microscope a force atomique AFM.....	83
Figure III.16 diagramme DRX des particules de gélatine après encapsulation, et des extraits aqueux et hydro-ethanolique encapsulés....	84
Figure III.15 images des nanoparticules (A) de gélatine, (B)chargées de l'extrait aqueux,(C) chargées de l'extrait methanolique et (D) chargées de l'extrait hydroethanolique sous un microscope électronique à balayage (MEB).....	85

Liste des abréviations

3D QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship en trois dimensions ;

Å : angström

ADN :acide désoxyribonucléique

Al (NO₃)₂ : nitrate d'aluminium

ANOVA : Analyse de la variance

APG : Angiosperm Phylo-genygroup).

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : butylhydroxytoluène

BSA : albumine sériume de bovine

CE : équivalent catéchines

CH₃COOK : acétate de potassium

CiS : Cinderella's Shoe

CoMin : Continual Molecular Interior analysis

CuCl₂ : Chlorure de cuivre

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity

CXCL8 : interleukine-8

FeCl₃ : Trichlorure de fer

GOR : Galvinoxyle scavenging assay

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IL1A : interleukine-1 alpha

IL6 : interleukine-6

INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

KIO₃ : iodate de potassium

kJ: kilo joule

KPs : kilo pascal

Kv : kilo volt

mA: milliampère

MERA : Model of Effective Radii of Atoms

MM3 : mécanique moléculaire combinée

MOPS : algorithme d'optimisation

NPs : nanoparticules

Ppb : parts per billion

Rt : temps de retention

Rpm: rotation par minute

SARS-CoV-2 : syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2

TAE : equivalent Acide tannique

TLC : Thin-Layer Chromatography" ,"Chromatographie sur Couche Mince

TPC : Contenu Phénolique Total

UPLC-ESI-MS-MS : chromatographie liquide à ultra haute performance avec ionisation par pulvérisation électrostatique et spectrométrie de masse en tandem.

Introduction générale

Introduction générale

Depuis quelques années, l'utilisation des plantes aromatiques et médicinales suscite un intérêt croissant dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture connaît un regain d'intérêt. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes médicinales en composés bioactifs, qui constituent une source inépuisable de substances aux multiples vertus (Malik et al. 2005). Ces derniers se caractérisent par leur disponibilité, leurs effets secondaires limités et leur faible toxicité, et surtout leur activité biologique potentielle (Zhu, C. P., 2015).

Diverses études menées sur les pelures de fruits et de légumes ont révélé la présence de constituants importants, qui peuvent être utilisés à des fins pharmacologiques ou pharmaceutiques. Les chercheurs ont identifié plusieurs composants bioactifs, tels que les phénols, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponines qui possèdent des activités antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires (Hanafy, S. M. 2021).

Depuis des millénaires, le fruit du grenadier (*Punica granatum L.*) est utilisé pour ses vertus médicinales et thérapeutiques dans de nombreuses régions du monde, notamment dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Asie du Sud et en Amérique latine (Malik et al. 2005). La consommation croissante de la partie comestible de la grenade génère une grande quantité de sous-produits tels que l'écorce, les graines et les fleurs qui sont souvent négligés malgré leur potentiel d'utilisation (Sood et Gupta, 2015).

Les pelures de grenade sont considérées comme le sous-produit le plus précieux du fruit, représentant environ 50% du poids total du fruit (Çam et Hışıl 2010); (Gullon et al. 2016). Elles constituent une source importante de métabolites végétaux secondaires précieux, offrant un potentiel considérable en termes de composés bioactifs, au même titre que les parties comestibles (Zhu et al. 2015 ; Ali et al. 2019). Par ailleurs, les jus commerciaux fabriqués par pressage complet des fruits contiennent des niveaux abondants de punicalagines A et B, d'acide gallique et l'acide ellagique, bien supérieures aux jus pressés à la main qui ne sont préparés qu'à partir des arilles et contiennent des quantités minimales de ces composés. (Qu, W., 2012). Toutefois, la valorisation des composés bioactifs d'origine naturelle nécessite, dans un premier temps, leur extraction de leur matrice végétale d'origine. Ce processus implique généralement de nombreuses étapes complexes souvent longues et coûteuses (Michel, T. 2011).

La première étape est l'extraction visant à libérer les molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle conditionne la nature et la quantité des molécules extraites, et, par conséquent le succès des étapes suivantes. En général, l'extraction de produits naturels suit un procédé de type solide-liquide, où un solide (la matrice végétale) est mélangé avec un liquide (le solvant d'extraction). Parmi les méthodes d'extraction, La macération est l'une des plus simples et des moins coûteuses, bien qu'elle nécessite un temps d'extraction relativement long. Cette technique est couramment utilisée pour extraire les composés bioactifs des végétaux. L'efficacité de la macération dépend de plusieurs facteurs, tels que la quantité de matière première, le choix des solvants et la durée d'extraction. Le principe de cette méthode repose sur l'immersion de l'échantillon dans le solvant d'extraction, permettant ainsi la désorption des molécules actives (Tambun, R., 2021).

Une relation linéaire entre la quantité de composés phénoliques présents dans l'extrait de peau de grenade et ses propriétés biologiques est bien établie et largement reconnue. Ces composés phénoliques présentent de nombreux avantages, mais ils sont également sensibles à des conditions environnementales telles que la lumière, l'oxygène, le pH et d'autres facteurs. L'encapsulation s'avère être une méthode prometteuse pour préserver la stabilité de ces composés et améliorer leur activité.

Parmi les techniques d'encapsulation, La nano-encapsulation est particulièrement adaptée à la protection des composés bioactifs sensibles. Elle permet de préserver et d'améliorer leurs propriétés physicochimiques tout en favorisant une libération contrôlée et efficace de ces composés (Rahnemoon, p 2021). Les polymères jouent un rôle important dans l'encapsulation. Parmi ces matériaux, la gélatine une protéine obtenue par l'hydrolyse du collagène isolé des os et de la peau des animaux, se distingue par plusieurs polymères par sa biocompatibilité et biodégradabilité est très utilisé dans les applications pharmaceutiques et médicales. Elle est ainsi considérée comme un biomatériau pour la libération contrôlée des molécules biologiquement actives. La gélatine peut être administrée sous différentes formes de molécules biologiquement actives tels que des hydrogels, des microsphères, des films, ou des nanoparticules. Son utilisation en tant que nanoparticules suscite de l'intérêt en raison de la combinaison de l'effet nanométrique et de ses caractéristiques moléculaires avantageuses : en tant que macromolécule naturelle, elle est facilement disponible et présente une faible antigénicité (Khan, S. A. 2013). En raison de ces propriétés, plusieurs chercheurs ont exploré différentes techniques pour préparer des nanoparticules de gélatine, la nanoprécipitation étant

l'une des méthodes prometteuses. Cette technique est rapide, facile et directe par rapport à d'autres procédés plus complexes (Khan, S. A. 2013).

Ainsi, la présente recherche est menée pour étudier l'efficacité de la gélatine pour la nano-encapsulation de l'extrait de la peau jaune de grenade pour conserver les propriétés bioactives de l'extrait de la peau de grenade à des fins thérapeutiques. Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres.

Le premier chapitre bibliographique est subdivisé en deux parties. la première partie est dédié aux généralités sur la grenade avec des données détaillés sur sa description botanique, sa classification, sa composition chimique et ses propriétés biologiques. La deuxième partie met en évidence les concepts fondamentaux de l'encapsulation, en particulier la nanoencapsulation des extraits des plantes par des polymères en tant que vecteur pour une application thérapeutique. Un rappel bibliographique sur la gélatine, les techniques d'encapsulation des micro/nano particules est également présenté dans cette section.

Le deuxième chapitre représente la partie expérimentale et est devisé en deux sections, La première section est consacrée à la préparation des extraits de la peau de la grenade, réalisée en utilisant différents solvants, à savoir l'eau, le méthanol et l'éthanol/eau. Un Dosage des composées phénoliques, des tannins hydrolysables et des flavonoïdes a été réalisé, suivi d'une analyse LC-MS pour l'identification des composés chimiques présentes dans les extraits.

Une étude de simulation a été menée dans le but d'optimiser la géométrie de quelques composés présents dans notre extrait tels que la punicalagine- β , la punicalagine- α , la punicaline, l'acide gallique, l'acide tannique. Cette étude a également inclus la modélisation de leurs complexes avec l'eau, l'éthanol et le méthanol. En outre, elle permet de prédire l'activité biologique et le métabolisme de ces extraits. A la suites nous présentons dans cette section l'activité anti-oxydante mesurée à l'aide de diverses méthodes, l'activité anti inflammatoire et l'activité antimicrobienne des extraits.

La deuxième section de cette partie expérimentale sera consacrée à la nanoencapsulation des extraits de la peau de grenade par la méthode de nanoprecipitation, ainsi que leur caractérisation.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation et discussion des résultats. Enfin, une conclusion générale synthétisera le bilan du travail réalisé et proposera des perspectives pour les recherches futures

Chapitre I

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 la grenade (*punica granatum L*)

I.1.1 Généralité ; historique du *punica granatum L*.

Depuis la découverte de l'agriculture il y a plus de 1 000 ans, la grenade est l'un des plus anciens fruits comestibles qui n'a pas beaucoup évolué (Seeram et al. 2006 ; Çam et al. 2009) ou son histoire est liée au développement de l'humanité. (Lansky et Newman, 2007). Le fait qu'il apparaisse dans de nombreuses légendes relatives à différentes vies humaines. Pour la bénédiction, les zoroastriens plantaient cet arbre dans leurs maisons. Alors qu'on mythologie grecque, la grenade était considérée comme un symbole du mariage. Les bouddhistes considèrent la grenade comme l'un des trois fruits bénis. Dans les céramiques chinoises, la grenade reflète le concept de grande fertilité, d'abondance, de bonheur, de santé et d'avenir radieux. (Bayramova, A., & Isayeva, N. 2022) ce qui est presque identique à la mythologie égyptienne ou La grenade était reconnue comme étant le fruit des dieux. Un signe de fertilité et de richesse, ou ils s'inspirent de ses nombreux grains et de sa forme arrondie. (Ruis, 2015). Dans les cultures chrétiennes et bédouines, la grenade est un symbole de fertilité. Dans l'islam, le Coran décrit un paradis où la grenade est un cadeau et un fruit céleste de Dieu (Bayramova, A., & Isayeva, N. 2022)

Le fruit est originaire d'Iran, d'Afghanistan, d'Inde, de Chine, et se répand également à partir de l'ouest dans tous les pays méditerranéens, tel que l'Espagne. En fait, la vaste répartition des formes sauvages de la grenade dans toute l'Eurasie est due à l'adaptation des grenadiers aux conditions climatiques changeantes du Maroc, de l'Égypte, de la Tunisie et de la Turquie. Ce qui montre que la grenade a la capacité de se conformer à une vaste gamme de climats. (Bayramova, A., & Isayeva, N. 2022)

I.1.2 description botanique (profil botanique)

A. Profil botanique du grenadier

La grenade (*Punica granatum L.*) est le fruit du grenadier qui est un arbre de 2 à 5 m de hauteur, avec un tronc tortueux surmonté d'une fine écorce grise ses branches sont légèrement épineuses et hérissées, au feuillage caduc et lancéolé en spires. (Shaygannia et al. 2016). Ses feuilles sont brillantes, lancéolées, rigide et coriaces, ses fleurs sont généralement écarlates rouges-orangées, simples ou doubles, solitaires à l'aisselle des feuilles selon la variété.

Le fruit en forme de pomme, globuleux à peau épaisse, Son diamètre peut atteindre 15 à 20 cm, d'une couleur jaune à un rouge grenat, avec un calice persistant. La partie comestible du fruit prend la forme d'une baie divisée par de nombreuses parois, renfermant de nombreuses graines de forme triangulaire dont les dimensions peuvent aller jusqu'à 15 millimètres, ces grains sont recouverts de pulpe rouge acidulée et sucrée, de couleur rouge foncé à rose clair (Iserin, 2001).

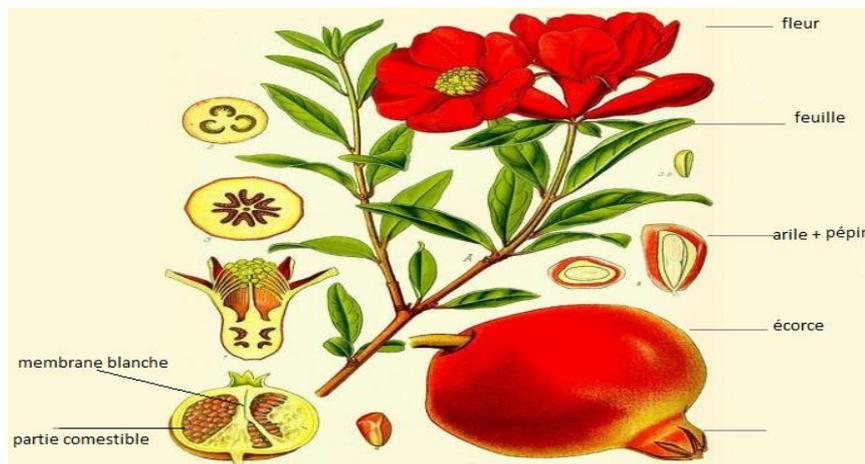


Figure I.1 : le fruit de grenade et ses composants.

B. Classification botanique

On distingue plusieurs systèmes de classification En botanique, la classification traditionnelle se différencie de la classification APG (Angiosperm Phylo-genygroup). (Moreno, P. M., 1992 ; Rana et al. 2010).

✓ **Classification de Linné**

En 1753, la grenade a été classifiée par Carl Von Linné comme suit ((Melgarejo et Martínez ,1992 ; Rana et al. 2010) :

Règne : Plantae Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : Punica

Espèce : Punica granatum

✓ **Classification APG III (2009)**

APG III (2009) est la troisième version mise à jour, après APG 1998 et APG II 2003, de la classification moléculaire et cladistique des Angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, établie par l'Angiosperms Phylogeny Group, qui réorganise le règne végétal selon des critères moléculaires. APG III (2009) classe les grenades comme suit :

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre : Punica

Espèce : Punica granatum

I.1.2 Variétés du grenadier

Plus de 1000 variétés de Punica granatum sont reconnues (Lansky et Newman, 2007). Les critères utilisés pour les différencier sont la taille des fruits, la couleur de l'écorce, la couleur des graines, la dureté des graines, la teneur en jus, l'acidité et l'astringence, et la période de maturation (Stover et Mercure, 2007).

Tableau I.1 quelques variétés de grenade (Wald, E 2009).

Zone géographique	Variétés	Maturation des fruits	Aspects des fruits	Graines ou arilles	Qualités gustatives
Espagne	<i>Blanca</i>	Septembre/octobre	Peau lisse	Roses	Pulpe juteuse et sucré
Tunisie	<i>Zéri</i>	Aout/septembre	Peau ferme, rouge	Très petites et rouges	Bonne et très juteuse
Grèce	<i>Douce de patras</i>	Aout/septembre	Peau colorée	Petites, rouges et très acides	Excellente
Turquie	<i>Ak anar</i>	Septembre	Peau épaisse jaune, blanc	Assez grosses et pâles	Très rustiques
Usa	<i>Wonderfull</i>	Aout/septembre	Rouge, rosâtre	Rouges	Très bonne et rustique

I.1.3 Le grenadier en Algérie

La culture de la grenade en Algérie, a connu une progression importante, notamment grâce au Programme de soutien à la relance agricole 2010-2014 et au Programme national de développement agricole (PNDA). La production est passée de 717 063 tonnes en 2010 à 790 374 tonnes en 2014, avec un rendement passant de 7,83 t/ha à 8,42 t/ha. Cependant, la collection de grenades de l'ITAFV (Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne) comprend des variétés dont les caractéristiques physiques et chimiques n'ont pas encore été déterminées. Il est connu que les variétés de grenades varient en goût, de très sucré à très acide, et en texture de la graine, de molle à dure. Malgré la courte saison de production de grenade de deux mois (septembre-octobre), Ces dernières années la consommation de grenade fraîche a augmenté, passant de 1,82 kg/hab. de grenade fraîche en 2009 à 2,07 kg/hab. de grenade fraîche en 2014 (Meziane, Z. K et al 2016).

Le deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques représente une liste de 14 variétés du grenadier autorisées à la production et à la commercialisation. Ces variétés sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau I.2 liste des variétés du grenadier en Algérie (INRAA 2006).

Variétés du grenadier en Algérie	
Espagne rouge	Selection station
Corda travita	Papers shell
Moller huesso	Gajin
Mellisse	Doux de koléa
Zemdautomne	Chelfi
Sulfani	Sefri
Spanish duoy	Messad

I.1.4 Valeur nutritionnelle

Les chercheurs se concentrent sur le grenadier on met en évidence certains principes actifs, La chromatographie, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique sont des techniques d'analyse chimique récentes qui peuvent être appliquées pour identifier la composition des différentes parties de la grenade, comme indiqué dans le tableau ci-dessous (Wald, 2009).

Tableau I.3 : Valeurs nutritionnelles de la grenade, pour 100g de portion comestible (Reguieg Yssad, A. 2019)

Composition nutritionnelle	Eau : 81 g	Fibres : 1 g	V. énergétique 74,2 kcal	V.énergétique 315 kJ
	Protéines 0,95 g	Lipides 0,3 g	Glucides 16,2 g	Sucres simples 16,2 g
Sels minéraux et oligo-éléments	Potassium 259 mg	Phosphore 8 mg	Calcium 3 mg	Magnésium 3 mg
	Sodium 3 mg	Fer 300 µg	Zinc 120 µg	Cuivre : 70 µg
Vitamines	Vitamine C 11,4 mg	Vitamine B1 30 µg	Vitamine B2 30 µg	Vitamine B3 300 µg
	Vitamine B5 590 µg	Vitamine B6 200 µg	Vitamine B9 (folate) :6 µg	Vitamine B12 0 µg
	Bêta-carotène 20µg	Rétinol 0 µg	Vitamine E 0,55 mg	Vitamine D 0 µg

I.1.5 Composition Phytochimique du grenadier

La grenade et ses différentes parties écorces, membranes blanches, arilles et graines sont riches en nombreux composés phénoliques, y compris les ellagitannins et ses dérivés (punicalagine, punicaline, pédonculagine, acide gallagique, acide ellagique, ellagitannins et gallotannins), anthocyanes (cyanidine, delphinidine et pélargonidine glycosides), flavonoïdes (quercétine, kaempferol et luteoline glycosides) (Carballo et al., 2009), et des acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide o-coumarique, l'acide p-coumarique, l'acide ferulique, syringique, vanillique, phlorodizine et la rutine (Gundogdu et Yilmaz, 2012).

La partie comestible de grenade représente 50% du fruit, il se compose de 40% d'arilles et de 10% de graines ou Les arilles se compose de 85% d'eau, 10% de sucres totaux, (le fructose et le glucose) et 1,5% de pectine, l'acide organique (l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'acide malique), et les composés bioactifs comme les phénoliques, les flavonoïdes et les anthocyanes

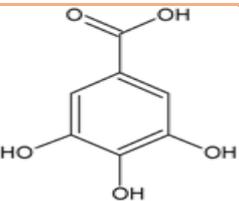
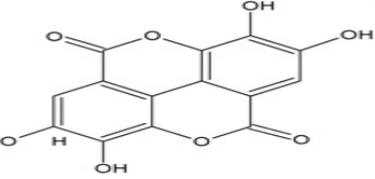
(Viuda-Martos et al., 2010). Les arilles aussi contiennent la delphinidine-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, delphinidine-3,5-diglucoside, cyanidine-3,5-diglucoside, pèlargonidine-3,5-Le diglucoside et le pèlargonidine-3-glucoside, le delphinidine-3,5-diglucoside étant l'anthocyanine principale du jus de grenade (Syed et al. 2006).

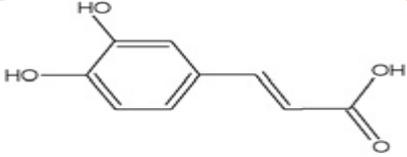
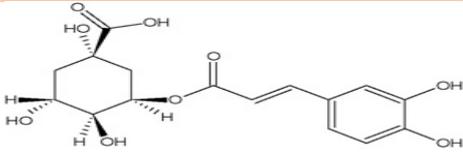
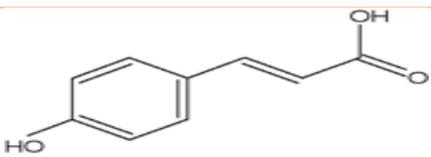
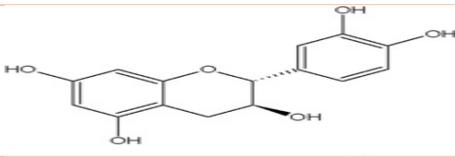
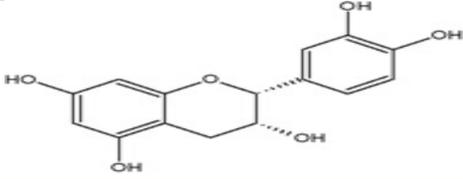
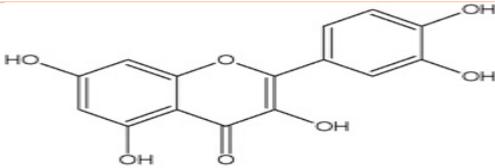
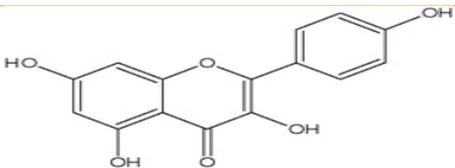
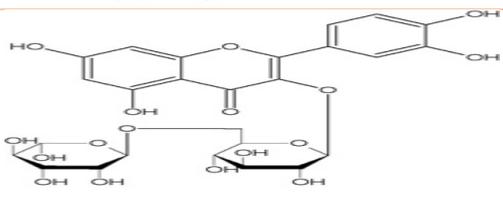
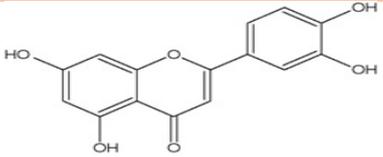
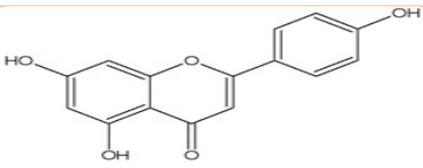
Les jus de grenade sont les plus riches en composés phénoliques, il contient principalement l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique, les acides o- et p -coumariques, la catéchine, la phloridzine et la quercétine (Poyrazoglu et al. 2002).

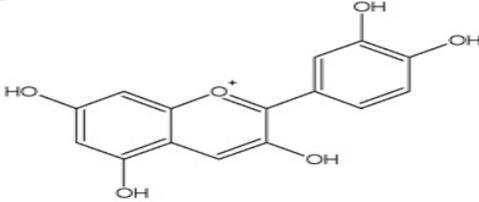
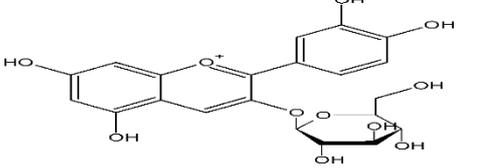
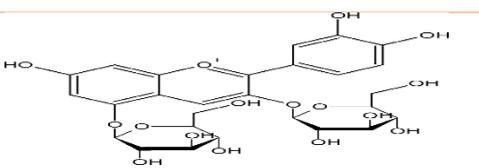
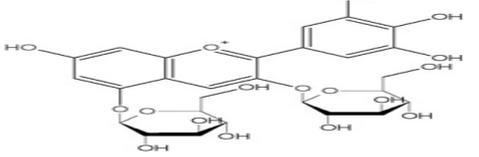
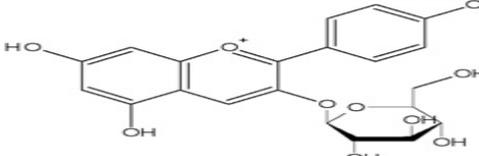
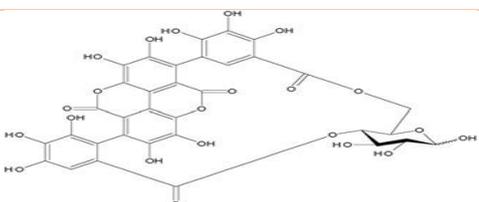
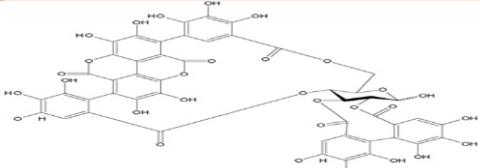
L'écorce de grenade et les membranes blanches représente Environ 50% du poids total de la grenade, ces deux partie sont une source très importante de composés bioactifs, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les procyanidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium. L'écorce de la grenade est riche en tanins hydrolysables, principalement en punicaline, pédunculagine et punicalagine. (Calin Sánchez and Carbonell Barrachina, 2012).

Les fleurs aussi contiennent également différents composés dont les polyphénols (l'acide gallique et l'acide éllagique) des triterpènes (acide oléanolique, l'acide ursolique, maslinique et asiatique), aussi un seul stérol (daucostérol) et un seul flavonoïde (punicaflavone) sont les plus abondants, ou ils ont montré une importante valeur médicinale et biologique (Eren et al. 2014).

Tableau I.4 Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions au niveau de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

Classe chimique	Nom du composé	Structure chimique	Organe
Acides Hydroxybenzoïque	Acide gallique		Jus Fleurs Feuilles
	Acide Ellagique		Jus Feuilles Pépines

Acides Hydroxycinnamique (phenylpropanoïdes)	Acide Cafféique		Jus Feuilles
	Acide Chlorogénique		Jus Feuilles
	Acide P-coumarique		Jus Feuilles
Flavan-3-ols	Catéchine		Jus Feuilles
	Epicatéchine		Jus Feuilles
Flavonols	Quercétine		Jus Feuilles
	Kaempferol		Feuilles
Flavonol glycosides	Rutine		Jus Feuilles
Flavones	Luteoline		Feuilles
	Apigénine		Feuilles

Anthocyanidines	Cyanidine		Feuilles
	Cyanidin 3-O glucoside		Jus
Anthocyanines	Cyanidin 3,5-di-O-glucoside		Jus
	Delphinidin 3-O-glucoside		Jus
	Pelargonidin 3-O-glucoside		Jus
Ellagitannins	Punicalin		Ecorce de l'arbre Écorce de racine Feuilles Écorce de fruits
	Punicalagin		

I.1.6 Propriétés thérapeutiques de grenade

Depuis très longtemps, la grenade est populaire en tant qu'aliment fonctionnel et source de nutraceutiques. Il est considéré comme « une pharmacie en soi », En médecine Ayurvédique, il est utilisé pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. L'écorce et les racines sont utilisées traditionnellement pour le traitement de la dysenterie, les diarrhées, les ulcères et les aphtes buccaux avec leurs propriétés astringentes, vermifuges et anthelminthiques (Lansky et Newman, 2007 ; Ben Abdennebi, 2012 ; Bhowmik

et al. 2013). Elle est enrichie en propriétés médicinales antioxydants, anti-cancérigènes, anti-obésité, anti-tumorales et anti-inflammatoires. Ses graines, ses fruits, son jus et son écorce possèdent de divers composés bioactifs tels que l'acide ellagique, les ellagitannins, les punicalagins, l'acide punicique, les flavonoïdes, les anthocyanidines, anthocyanines, flavonols œstrogéniques, autres acides gras et flavones (Saeed, M., 2018)

A. Activité Antioxydante

Les agents antioxydants sont des substances capables de piéger les radicaux libres. Parmi ces substances, on mentionne les composés phénoliques qui sont des antioxydants extrêmement puissants. La grenade est l'une des plantes les plus riches en polyphénols et par conséquent, elle est fréquemment testée pour évaluer son potentiel antioxydant in vitro et même in vivo. En effet plusieurs études ont rapporté que les composés phénoliques de grenade peuvent exercer une activité antioxydant, (Heena J 2018, Wan, H. C 2018, Hadjadj, S 2018.).

L'activité antioxydant de la grenade a été testée par Akpinar-Bayizit. Ces derniers ont mesuré la teneur totale en polyphénols et l'activité antioxydant par dosage DPPH de grenade. Le résultat indique que le contenu phénolique total variait de 118,28 à 828,15 mg d'équivalent acide gallique par gramme de grenade, et l'antioxydant variait de 560,23 à 1885,23 μmol Trolox équivalent par gramme d'échantillon, ce qui signifie une bonne activité antioxydant pour la grenade (Akpinar-Bayizit, A 2016).

Une étude comparative par Derakhshan, Z 2018 a été réalisée pour tester l'activité antioxydante, le contenu phénolique total, les flavonoïdes et les flavonols des extraits d'écorces, de graines et de jus de grenade. L'extrait d'écorce de grenade a montré un niveau élevé d'activité antioxydante, de teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en flavonols par rapport aux graines et aux jus. Les auteurs ont démontré une corrélation positive significative entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques totaux, ou ils suggèrent que l'écorce de grenade pourrait être utilisée comme conservateur alimentaire naturel et comme additif sain riche en antioxydants naturels .

Une étude in vivo a montré que la consommation de l'extrait de l'écorce de grenade par des rats albinos Wistar induit à une préservation de la catalase, de la peroxydase et du superoxyde dismutase à des valeurs comparables aux valeurs de contrôle. Bien que les examens histopathologiques du foie aient révélé que la peroxydation lipidique était réduite de 54 % par rapport aux témoins (Chidambara Murthy, K. à 2002).

B. Activité antiinflammatoire

L'inflammation est la première réponse biologique du système immunitaire à une infection, une blessure ou une irritation. L'impact anti-inflammatoire est obtenu par le contrôle des cytokines inflammatoires. Donc la prévention ou la réduction des diverses maladies inflammatoires se fait par l'inhibition de la surproduction de médiateurs inflammatoires. (Shao, J., 2013). C'est le cas avec la grenade, où il a été démontré que la grenade exerce des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes notamment, l'inhibition de la surproduction de médiateurs inflammatoires. (Rahimi et al. 2012),

La propriété anti-inflammatoire de la grenade et de ses produits dérivés a été démontrée clairement par de nombreuses études (Rashid, M 2018, Douaouri, N.2018, Mastrogiovanni, F2020 Waghulde, S.2018).

Le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait d'écorce de grenade obtenu à partir des déchets de production de jus a été testé, à la fois *in vitro* sur des cellules Caco-2 et *in vivo* en utilisant des explants de tissu colique porcin. En conséquence, l'extrait de peau de grenade présente de puissantes propriétés anti-inflammatoires, réduisant la libération de la cytokine pro-inflammatoire CXCL8 des cellules Caco-2. En outre, il a réduit la libération de CXCL8 et l'expression génétique des cytokines pro-inflammatoires (IL1A, IL6 et CXCL8). Ces résultats confirment l'effet anti-inflammatoire potentiel des substances chimiques bioactives contenues dans l'écorce de grenade sur les cellules et les tissus du système gastro-intestinal. (Mastrogiovanni, F 2019).

C. Activité anti-COVID-19 de la grenade

En février 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) déclare le nouveau coronavirus SARS-CoV-2, désigné comme COVID-19, qui est un des β -coronavirus hautement pathogènes qui infectent les humains. Au cours de cette période, les scientifiques ont recherché intensivement de nouveaux composés ayant une activité anti-COVID potentielle, en particulier des produits naturels, afin d'économiser du temps, de l'argent et du travail.

La grenade occupe une place importante dans la recherche sur le traitement du covid. Des tests *in vitro* et *in silico* ont été effectués pour évaluer l'activité de la grenade contre le covid 19, l'extrait de peau de grenade, la pédunculagine, la tercataine, Les résultats de ces études indiquent que les composants de la grenade sont des candidats prometteurs pour d'autres études

in vitro sur le SRAS-CoV-2 (Saadh, M. J 2021, Khalifa, I., 2020Suručić, R, 2021 Tito, A 2021 Suručić, R. 2021 mosa, A. F. 2021)

D. Activité Anticancéreuse

La recherche scientifique démontre que la grenade peut être utile dans la prévention et le traitement de divers types de cancer tels que le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer de la peau. En raison de sa teneur élevée en antioxydants, certaines personnes pensent que la consommation régulière de jus de grenade peut contribuer à prévenir le cancer. La grenade ralentit la reproduction des cellules cancéreuses et peut accélérer leur mort par la réduction de l'apport de sang aux tumeurs, les affamants et les rendants plus petites (Adhami V M., 2009 ; Hajleh, M. A. et al 2016).

Des essais in vitro utilisant trois lignées cellulaires de cancer de la prostate (DU-145, LNCaP et PC-3) ont démontré que divers extraits de grenade (jus, huile de pépins, écorce) inhibent puissamment l'invasivité et la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate, perturbent le cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent la croissance tumorale. Ces études ont également démontré que les combinaisons d'extraits de grenade provenant de différentes parties du fruit étaient plus efficaces qu'un seul extrait. (Paarakh, M. P. et al 2018).

E. les applications environnementales de la grenade

L'écorce de grenade, un résidu souvent polluant, est une biomasse renouvelable et peu coûteuse. Des recherches récentes ont démontré son efficacité dans le traitement des eaux usées en éliminant les contaminants tels que les métaux lourds et les colorants (Abdel-Galil, E. A et al 2021 ; Ibrahim, T. H et al 2016).

Ali H. Jawad et al 2018, El-Azazy, M et al 2019, Hodúr, C, et al 2020 et Hessien, M. 2022 étudient la possibilité d'utiliser l'écorce de grenade brute ou traitée par carbonisation, activation chimique ou physique comme adsorbant abordable pour traiter l'eau en testant sa capacité à adsorber le Ni(II), l'azote ammoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$), les ions Cr (VI) et le bleu de méthylène respectivement. Les résultats de ces études démontrent que la poudre d'écorce de grenade possède des propriétés prometteuses en tant que bio-adsorbant potentiel pour métaux lourds et les colorants . Selon des études, l'utilisation de l'écorce de grenade comme adsorbant a un double impact sur l'environnement : d'une part, elle nettoie les eaux usées et, d'autre part, elle élimine l'écorce de grenade en tant que déchet qui constitue un fardeau pour l'environnement.

I.2 l'encapsulation

I.2.1 Introduction

L'encapsulation peut être décrite comme un processus consistant à enfermer une substance à l'état solide, liquide ou gazeux dans une autre substance, produisant ainsi des particules dont le diamètre varie de quelques nm à quelques mm. La substance qui est encapsulée est le matériau central, l'agent actif, les charges, la phase interne ou la phase de charge utile. La substance enveloppante est le revêtement, la membrane, l'enveloppe, le matériau porteur, le matériau de paroi, la phase externe ou la matrice (Bratovic, A. et al 2019).

Cette technologie a de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique, mais elle est également utilisée dans l'industrie alimentaire. (Jafari, S. M. 2017). Ou il constitue un excellent choix pour protéger les composés bioactifs et les additifs dans les différentes applications. (Subramani, T. et al 2020). L'encapsulation est considérée comme une alternative possible pour préserver la stabilité des composés bioactifs pendant le traitement et le stockage, empêcher les interactions indésirables avec la matrice alimentaire, et ralentir les processus de dégradation (par ex. l'oxydation ou l'hydrolyse) jusqu'à ce que le produit soit libéré aux sites désirés (Lesmes, U., et al 2009). Ces ingrédients alimentaires étant très sensibles à l'environnement, au traitement et / ou les conditions gastro-intestinales. On industrie alimentaire, le processus d'encapsulation présente plusieurs avantages, dont voici la liste (Jafari, S. M. 2017 ; Bratovic, A. et al 2019) :

- Empêcher les interactions inutiles avec d'autres structures chimiques, par exemple, la microencapsulation d'acides organiques, tels que l'acide citrique et l'acide ascorbique pour maintenir les propriétés physicochimiques et la teneur en nutriments des aliments.
- Protéger les ingrédients alimentaires sensibles contre les conditions ambiantes et de traitement dans le but de prolonger leur durée de conservation.
- Libération contrôlée d'ingrédients encapsulés.
- Augmenter la biodisponibilité des ingrédients alimentaires.
- Modifier les propriétés physicochimiques en convertissant les solutions en poudres fines et en réduisant les coûts de production, ainsi qu'en facilitant la manipulation du composant bioactif par l'amélioration de la fluidité, la prévention de l'agglomération et la modification de la densité des particules.

- Masquer les arômes et les goûts désagréables.

La microencapsulation et la nano-encapsulation sont deux méthodes majeures dans la technologie de l'encapsulation, toutes deux ayant une spécialité particulière dans l'amélioration de la fonctionnalité des produits. Récemment, la nano-encapsulation ou le développement de systèmes d'administration à l'échelle nanométrique pour les composés bioactifs a rencontré un intérêt remarquable en raison de ses fonctionnalités exclusives. (Shishir, M. R. I, et al 2018).

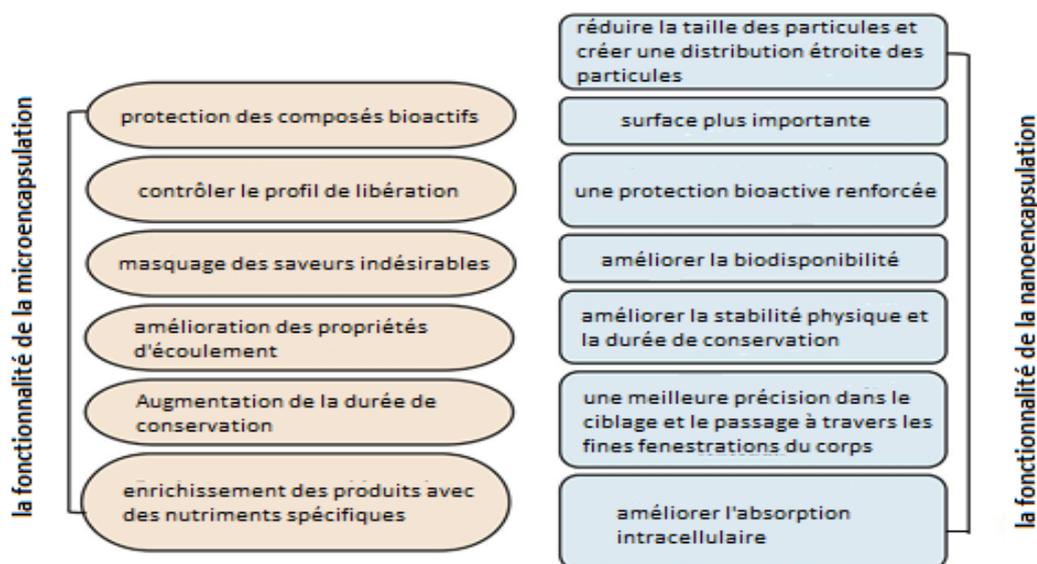


Figure I.2 Fonctionnalité de la micro et nano-encapsulation. (Shishir, M. R. I, et al 2018).

I.2.2 Microencapsulation

Les microcapsules mesurent généralement entre 0,2 et 5 000 μm de diamètre. Elles sont constituées d'une paroi qui renferme un noyau contenant l'ingrédient actif. La taille finale de ces particules est influencée par divers facteurs, notamment la technique de traitement choisie et les propriétés du matériau d'encapsulation (Calderón-Oliver, M et al 2022).

La paroi utilisée dans la microencapsulation peut être un revêtement polymère naturel, synthétique ou semi-synthétique. Cette technologie produit des microparticules qui peuvent être classées en fonction de leur taille et de leur morphologie, ces dernières étant déterminées par le matériau d'encapsulation et la méthode de microencapsulation employée.

Les microparticules peuvent prendre différentes formes : elles sont appelées « microcapsules » lorsque le matériau central est concentré au milieu, entouré d'une paroi continue. En revanche, les « microsphères » sont caractérisées par une dispersion uniforme de

l'agent actif dans une matrice. Une distinction essentielle est que dans les microsphères, une partie de la matière encapsulée est exposée à la surface de la particule.

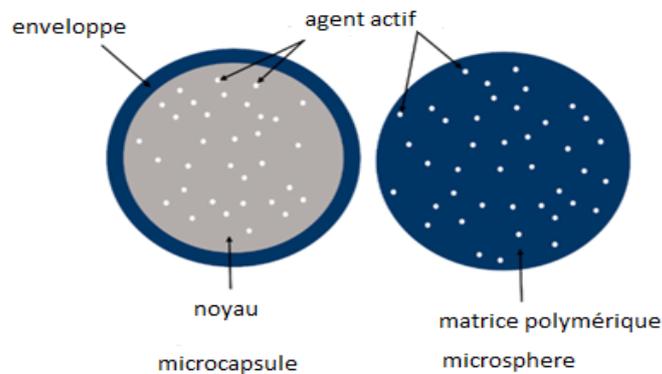


Figure I.3 Illustration schématique comparant une microcapsule et une microsphère. (Sousa, V. I et al 2022)

La microencapsulation comporte généralement quatre étapes clés : la formation du noyau et des encapsulants, l'incorporation et la solidification. Dans un premier temps, la taille du noyau est réduite et sa solubilité est améliorée par des méthodes telles que le broyage ou la fusion. Pour les noyaux solubles, un émulsifiant ou un surfactant est ajouté pour améliorer la stabilité, tandis que les noyaux gazeux sont encapsulés à l'aide de matières solides poreuses ou de matrices. Cependant, les températures élevées pendant la solidification peuvent entraîner une dégradation ou une fuite des matériaux sensibles. Pour atténuer ces pertes, des techniques telles que la lyophilisation, la coacervation, la réfrigération par pulvérisation et la réticulation sont employées, souvent en combinant des traitements chimiques et physiques pour obtenir une stabilité optimale.

La méthode d'encapsulation utilisée et les matériaux sélectionnés jouent un rôle crucial au succès de la microencapsulation, ou cette dernière dépend de plusieurs facteurs, notamment la stabilité des capsules, les propriétés de la matrice et la manière dont les ingrédients actifs sont libérés. Les considérations importantes qui influencent l'efficacité et la stabilité de l'encapsulation comprennent la structure moléculaire, les interactions entre les ingrédients naturels et le matériau d'enrobage, ainsi que des caractéristiques telles que le poids moléculaire, la polarité et la solubilité (Mehta, N et al 2022).

Aussi le choix du matériau d'enrobage détermine les techniques utilisées pour la production de microcapsules, ce qui influe sur leurs propriétés. Ces différentes méthodes entraînent des variations dans la taille, la morphologie, la porosité, l'hygroscopicité,

l'hydrophobicité, la tension superficielle et le comportement thermique des capsules. Il est essentiel de comprendre ces propriétés pour prédire comment les capsules se comporteront dans les différents systèmes alimentaires (Choudhury, N., et al 2021).

Diverses techniques sont utilisées pour produire des microcapsules, notamment le séchage par pulvérisation (spray drying), l'enrobage sur lit fluidisé (fluidized bed coating), l'extrusion, la lyophilisation (freeze drying), la complexation par inclusion, l'émulsification et la coacervation (Choudhury, N., et al 2021). En général, une méthode de microencapsulation efficace doit être rapide, simple, reproductible et évolutive pour des applications industrielles (Sousa, V. I et al 2022).

I.2.3 La nanoencapsulation

La nanoencapsulation est définie comme une technologie permettant d'encapsuler des substances à l'échelle nanométrique à l'aide de films, de couches et de revêtements (Ezhilarasi, P. N et al 2013). Cette couche est clairement d'échelle nanométrique et sert à former une couche protectrice sur les molécules/ingrédients alimentaires ou aromatiques (Paredes, A. J, et al 2016 ; Bratovic, A. et al 2019).

Les nanoparticules sont des particules de taille colloïdale dont le diamètre varie de 10 à 1000 nm et sont exprimées à la fois sous forme de nanocapsules et de nanosphères. Les nanocapsules sont des systèmes vésiculaires dans lesquels le composé bioactif est confiné dans une cavité entourée d'une membrane polymère unique, tandis que les nanosphères sont des systèmes matriciels dans lesquels le composé bioactif est uniformément dispersé (voir Fig. 1). Ainsi, la nanoencapsulation a le potentiel d'améliorer la biodisponibilité, d'améliorer la libération contrôlée et de permettre un ciblage précis des composés bioactifs dans une plus large mesure que la microencapsulation. (Ezhilarasi, P. N., et al 2013)

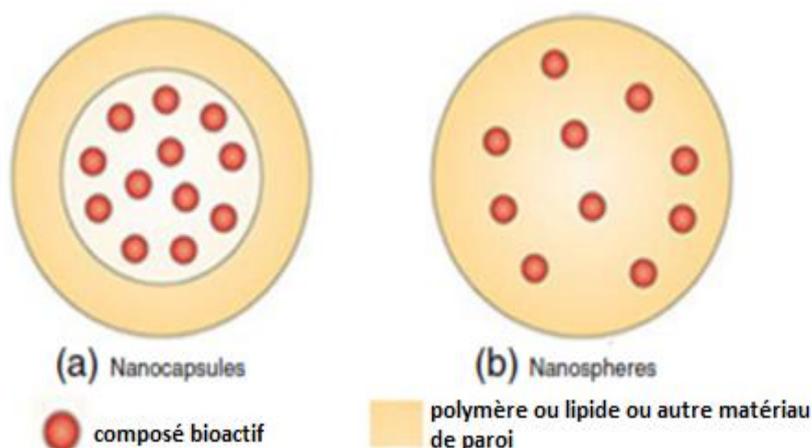


Figure I.4 Structure représentative des nanocapsules a et des nanosphères b (Ezhilarasi, P. N., et al 2013)

Généralement, les propriétés physicochimiques telles que la taille des particules, la distribution des tailles, la surface, la forme, la solubilité, l'efficacité de l'encapsulation et les mécanismes de libération sont altérées par la technique d'encapsulation et le système d'administration. En outre, les techniques utilisées pour réaliser la nanoencapsulation sont plus complexes que la microencapsulation. Cela est dû à la difficulté d'obtenir une morphologie complexe de la capsule et du matériau central et aux exigences en matière de taux de libération des nanoencapsulés (Ezhilarasi, P. N., et al 2013). L'émulsification, la coacervation, la complexation d'inclusion, l'évaporation de solvant d'émulsification et la nanopréciipitation sont considérées comme des techniques de nanoencapsulation car elles permettent de produire des capsules de l'ordre du nanomètre (10-1000 nm).

En général, deux types d'approches sont suivis pour la production de systèmes encapsulés, à savoir l'approche descendante et l'approche ascendante (Joye & McClements, 2014). Une approche descendante nécessite l'application des forces de perturbation mécaniques externes qui permettent de réduire la taille et de modeler la structure pour l'application souhaitée des nanomatériaux en cours de réalisation. Dans l'approche ascendante, les matériaux sont construits par auto-assemblage et auto-organisation des molécules, qui peuvent être affectées par de nombreux facteurs, telles que le pH, la température, la concentration et la force ionique. Les techniques telles que l'émulsification et l'émulsification-évaporation de solvant sont utilisées dans le cadre de l'approche descendante. D'autre part, la technique des fluides supercritiques, la complexation des inclusions, la coacervation et la nanopréciipitation sont utilisées dans l'approche ascendante (comme le montre la Figure I.5) (Ezhilarasi, P. N., et al 2013 ; Mishra et al. 2010).

Ces techniques consomment moins d'énergie et permettent un meilleur contrôle de la taille des particules, de leur distribution et de leur morphologie structurale par rapport aux approches descendantes (Joye & McClements, 2014).

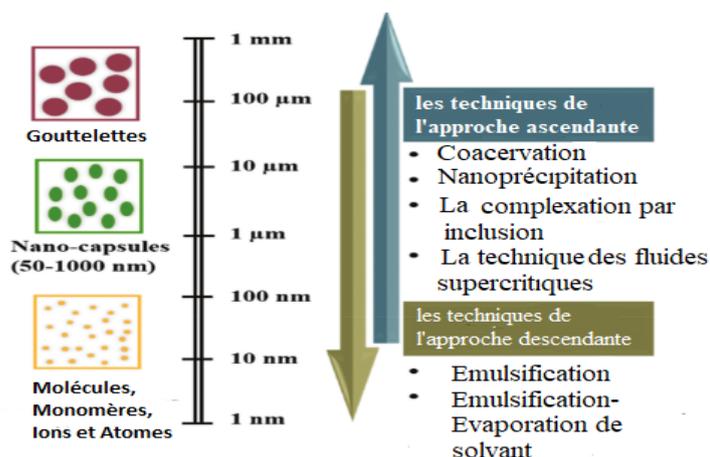


Figure I.5 Approches descendantes et ascendantes pour la formulation de la nano-encapsulation. (Ali Tahir, et al 2021)

Selon Jafari 2017, dans certains cas, une combinaison des deux approches a été utilisée, ce qui rend cette classification inapplicable aujourd'hui et il suggère qu'il est préférable de classer les techniques de nanoencapsulation en plusieurs groupes sur la base d'autres indices. Il a classé les technologies de nanoencapsulation en cinq groupes sur la base du principal mécanisme/ingrédient utilisé pour fabriquer les nanocapsules. Il s'agit des formulations lipidiques, des nanocarriers naturels, des équipements spécialisés, des nanoparticules biopolymériques fonctionnelles et des techniques disparates. (Seid Mahdi Jafari 2017).

I.2.4 L'encapsulation de fruit de grenade *punica granatum*

En raison des quantités croissantes de déchets agro-industriels, plusieurs études se sont concentrées sur la caractérisation des composés bioactifs qui peuvent être utilisés comme additifs naturels dans les industries alimentaires, biotechnologiques et pharmaceutiques. Leur instabilité dans les conditions normales de traitement et de stockage empêche toutefois leur utilisation. Heureusement, la sensibilité aux conditions environnementales de ses composés a été réduite en utilisant des techniques d'encapsulation en améliorant la stabilité et la solubilité dans l'eau (Marcillo-Parra, V., et al 2021).

Aussi l'encapsulation de substances bioactives (huiles essentielles, extraits de plantes, métabolites fongiques, etc.) permet de préserver l'intégrité biologique des produits et garantissant ainsi la viabilité des ingrédients actifs pendant de longues périodes (Zabot, G. L., et al 2022). Cependant, de nombreuses études ont exploré l'encapsulation des substances bioactives de la grenade en encapsulant son extrait et ses différents composants. Certaines de ces études sont présentées dans les paragraphes suivants,

L'étude de Šavikin, K., et al en 2021 visait à créer une méthode de produire des extraits d'écorce de grenade stables en conservant leurs composés bioactifs. La technologie de séchage par atomisation a été appliquée pour l'encapsulation en utilisant des supports à base d'hydrates de carbone (maltodextrine, MD) et à base de protéines (protéines de lactosérum, WP) à différentes concentrations, et l'impact du type et de la concentration du support sur la stabilité et la qualité de la poudre encapsulée finale a été analysé. Les résultats de l'étude montrent que les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque l'extrait de PP a été microencapsulé avec le support à base d'hydrates de carbone (MD) et qu'il a donné une teneur plus élevée en punicaline, punicalagine, acide gallique et acide ellagique que ceux obtenus avec le support à base de protéines WP. Les résultats globaux ont démontré que la microencapsulation à base d'hydrates de carbone peut être utilisée efficacement pour protéger la stabilité de la poudre et les caractéristiques phytochimiques.

Goula, A. M et al en 2012 ont mis au point une nouvelle méthode d'application des graines de grenade dans l'industrie alimentaire, qui consiste à extraire l'huile des graines et à l'encapsuler par séchage par atomisation. Le lait écrémé en poudre a été utilisé comme agent d'encapsulation. Le rapport entre le matériau du noyau et celui de la paroi, la concentration des solides d'alimentation, la température de l'air d'entrée et le débit de l'air de séchage ont été les facteurs étudiés en respectant l'efficacité d'encapsulation. Les résultats de cette étude indiquent la formulation de microcapsules évaluées en termes de teneur en humidité, de taille des particules, de densité apparente et d'hygroscopicité.

Les polyphénols de grenade sont de puissants antioxydants et agents chimiopréventifs, mais leur biodisponibilité est faible et leur demi-vie courte. Sur la base de ces informations, Shirode, A. B *et al.* en 2015 ont émis l'hypothèse que l'encapsulation des polyphénols de grenade dans des nanoparticules biodégradables à libération prolongée pourrait contourner ces limitations. Ils ont donc développé, caractérisé et évalué la bioactivité de nouvelles formulations de nanoparticules de poly(d,l-lactique-co-glycolique)-poly(éthylène glycol) (PLGA-PEG) chargées d'extrait de grenade ou de polyphénols individuels tels que le punicalagin ou l'acide ellagique à l'aide de la méthode d'évaporation de solvant en émulsion double. Les résultats indiquent la formulation de nanoparticules monodispersées et sphériques d'un diamètre moyen de 150-200 nm. Les nanoparticules obtenues ont été testées pour leur capacité de chimioprévention du cancer du sein. Les données démontrent que l'administration de polyphénols de grenade par la nanotechnologie renforce leurs effets anticancéreux sur les cellules cancéreuses du sein.

En 2022 Sanhueza, L.*et al.* ont étudié la faisabilité de l'encapsulation de l'extrait de peau de grenade dans des émulsions doubles utilisant différents types d'huiles (ricin, soja, tournesol, miglyol et orange) par émulsification directe sur membrane et agitation mécanique. Les résultats de cette étude révèlent que l'émulsification directe sur membrane a conduit à des émulsions plus stables pendant le stockage, et que la taille des gouttelettes, les valeurs de portée, la morphologie et l'efficacité de l'encapsulation étaient meilleures pour les émulsions doubles que pour l'agitation mécanique. Les auteurs ont conclu que la technique des émulsions doubles utilisant le Miglyol ou l'huile de tournesol comme phase huileuse peut être considérée comme un système alimentaire approprié pour encapsuler la punicalagine.

I.2.5 Les technique de la micro/nano encapsulations

Dans les paragraphes suivants, nous aborderons brièvement les techniques les plus utilisées pour la micro/nano encapsulation des constituants alimentaires. Il convient de mentionner que certains critères peuvent être pris en compte avant de choisir la technique d'encapsulation, cette dernière doit être capable de développer un système d'encapsulation permettant une capacité de charge élevée, une grande efficacité d'encapsulation, une stabilité du système d'encapsulation avec une durée de conservation élevée, une biocompatibilité et les caractéristiques de libération requises ainsi que la biodisponibilité du composé actif (Aguiar et al., 2016 ; de Souza Simões et al., 2017).

A. Le séchage par pulvérisation (spray drying)

Le séchage par atomisation est la technologie la plus utilisée pour la microencapsulation et comprend quatre étapes principales. Tout d'abord, une dispersion est préparée en dissolvant les matériaux de paroi dans l'eau tout en maintenant l'agitation et en contrôlant la température. Ensuite, le matériau à encapsuler est ajouté, ainsi qu'un émulsifiant si nécessaire. Le mélange est ensuite homogénéisé et injecté à travers une buse d'atomisation, formant de petites gouttelettes. Au cours de la troisième étape, ces gouttelettes entrent dans une chambre de séchage où l'air chaud facilite l'atomisation. Enfin, le solvant s'évapore, déshydratant les microparticules, qui sont ensuite recueillies sous forme de poudre sèche (Sousa, V. I et al 2022).

Cette méthode présente plusieurs avantages : elle s'adapte à une variété d'agents d'encapsulation, est économique et fait preuve de souplesse dans la manipulation de différents types de matériaux. En outre, elle peut être facilement mise à l'échelle pour répondre à des besoins de production plus importants (Choudhury, N., et al 2021).

D'autre part, les principales limitations de cette technique proviennent du matériau de la paroi, qui doit posséder une bonne solubilité dans l'eau. En outre, certains matériaux peuvent être sensibles aux températures élevées utilisées pendant le processus d'atomisation. En outre, la production de microcapsules sous forme de poudre fine peut entraîner une agglomération, ce qui peut nécessiter une étape de traitement supplémentaire. (Sousa, V. I et al 2022).

B. La lyophilization (freeze drying)

La lyophilisation est un procédé simple utilisé pour déshydrater les matériaux sensibles à la chaleur et les substances aromatiques. Le concept essentiel de cette méthode de séchage est la sublimation, qui permet à l'eau de passer directement de l'état solide à l'état de vapeur, sans passer par la phase liquide. Dans un premier temps, le matériau à encapsuler est dissout dans l'eau puis congelée. Ensuite, la pression est abaissée tout en appliquant de la chaleur, ce qui permet à l'eau gelée de se sublimer directement de l'état solide à l'état gazeux.

Cette méthode est facile à mettre en œuvre et permet d'obtenir des échantillons lyophilisés plus résistants à l'oxydation, mais qui peuvent être moins efficaces pour la microencapsulation. Toutefois, le procédé présente certains inconvénients, notamment une consommation d'énergie élevée, des temps de traitement longs et des coûts de production élevés (Sousa, V. I et al 2022).

C. L'enrobage sur lit fluidisé (fluidized bed coating) :

L'enrobage en lit fluidisé est reconnu comme l'une des techniques d'enrobage les plus efficaces, car il permet de mélanger, de granuler et de sécher les ingrédients dans un seul récipient, ce qui minimise le temps de traitement.

Dans cette méthode, les particules solides du matériau de base sont suspendues dans un flux d'air tout en maintenant une température et une humidité contrôlées. Une fine couche de matériau d'enrobage est ensuite pulvérisée sur ces particules en suspension, s'accumulant progressivement au fil du temps. Pour obtenir des résultats optimaux, le matériau de revêtement doit avoir une viscosité suffisante pour être pulvérisé, et le système de pompage doit être capable de former un film cohérent et thermiquement stable. (Sousa, V. I et al 2022).

D. L'extrusion

La technologie de l'extrusion est une méthode efficace pour produire des microcapsules très denses. Dans ce processus, les matériaux du noyau et de la paroi sont combinés de manière à ce que le matériau de la paroi entoure le noyau lorsqu'ils sont extrudés à travers des buses concentriques, ce qui donne des gouttelettes. Divers outils de déversement peuvent être utilisés,

notamment des pipettes, des seringues, des buses vibrantes, des buses de pulvérisation, des découpeurs à jet ou des disques vibrants.

La solidification se produit soit par refroidissement, soit par l'utilisation d'un bain gélifiant approprié, dans lequel les gouttelettes se solidifient en formant un complexe. Cette méthode est particulièrement avantageuse pour l'encapsulation de substances volatiles et instables, et elle tend à produire des encapsulés de plus grande taille que d'autres techniques. Cependant, elle est plus efficace avec une sélection limitée de matériaux de paroi (Choudhury, N., et al 2021, Mehta, N et al 2022)

E. Emulsification

La technique des émulsions est habituellement appliquée à l'encapsulation de composés bioactifs dans des solutions aqueuses par la production de nanoémulsions. Les nanoémulsions sont des dispersions colloïdales composées de deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, et dont la taille des gouttelettes varie de 50 à 1 000 nm (Sanguansri et Augustin 2006).

En général, les émulsions sont composées d'huile, d'eau et d'un stabilisateur. Dans le cas d'une émulsion huile dans eau, l'huile est appelée phase dispersée et l'eau phase continue, c'est ce qu'on appelle émulsion huile dans eau (O/W), en revanche, lorsque l'eau est dispersée dans l'huile, on parle d'émulsion eau dans huile (W/O). Tandis que le stabilisateur agit comme une interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse, créant une couche protectrice autour des gouttelettes d'huile. (Bakry et al. 2016 ; Saifullah et al. 2016). Elles offrent un grand potentiel pour encapsuler une forte concentration de nutraceutiques solubles dans l'huile ou de compléments alimentaires bioactifs dans une large gamme de denrées alimentaires. (P. N. Ezhilarasi 2013).

F. l'émulsification-évaporation de solvant

La technique d'émulsification-évaporation du solvant implique l'émulsification de la solution de polymère dans une phase aqueuse et l'évaporation du solvant du polymère induisant la précipitation du polymère sous forme de nanosphères (Reis et al. 2006).

Le produit à encapsuler est dispersé dans une solution organique non miscible à l'eau, constituée de polymère et de solvant organique. L'émulsification de ce mélange se fait par une phase aqueuse contenant un stabilisant. Pour produire des particules de petite taille, on utilise souvent l'homogénéisation à grande vitesse ou l'ultrasonisation. La taille des capsules peut être

contrôlée en ajustant le taux d'agitation, le type et la quantité d'agent dispersant, la viscosité des phases organiques et aqueuses et la température (Ezhilarasi, P. N., et al 2013).

G. La complexation par inclusion

La complexation par inclusion est définie comme l'encapsulation de l'association supramoléculaire d'un ligand (ingrédient encapsulé) dans un substrat contenant une cavité (matériau d'enveloppe) par liaison hydrogène, force de van der Waals ou effet hydrophobe induit par l'entropie (Ezhilarasi et al. 2013). Les entités moléculaires présentant des cavités appropriées au niveau moléculaire sont rarement disponibles Dans le domaine l'industrie alimentaire, (Ezhilarasi et al. 2013). En général, les complexes d'inclusion moléculaire sont des systèmes d'encapsulation à base de cyclodextrines (Duchêne & Bochot, 2016). En raison de leur faible coût et de leurs meilleures fonctionnalités, les dérivés de la β cyclodextrine (β -CDs) constituent un meilleur choix pour le développement de complexes d'inclusion. (Kfoury et al., 2014).

H. La coacervation (Gélation ionique)

Afin d'éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques ou des énergies élevées, Calvo et al.1997 ont proposé une nouvelle approche appelée gélation ionique ou coacervation (Calvo et al.1997). La coacervation est une technique simple, distinctive, prometteuse et l'une des plus appliquées dans la nano-encapsulation en raison des charges utiles très élevées réalisables (jusqu'à 99 %) et des possibilités de libération contrôlée en fonction du stress mécanique, de la température ou de la libération prolongée. Gouin (2004)

Elle est constituée de trois étapes principales, (i) le développement de phases non miscibles pendant le mélange du matériau de base, du matériau d'enrobage et de la phase liquide continue (ii) la formation d'une couche encapsulante autour du composé actif en maintenant plusieurs paramètres, notamment le pH, la force ionique, la concentration des matériaux d'enrobage, le poids moléculaire et la température de la solution, et (iii) enfin la solidification des capsules par des techniques de chauffage, de désolvation ou de réticulation (Bakry et al., 2016). La technique de coacervation est classée comme simple ou complexe selon le nombre de biopolymères appliqués dans le processus. Le processus peut être qualifié de coacervation simple (un seul type de polymère) ou de coacervation complexe (deux types de polymères ou plus) selon Tolstoguzov et al. (2003) et De Kruif et al. (2004). Ce dernier type a de meilleures fonctionnalités que la coacervation simple et constitue le meilleur choix dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Yuan et al. 2017 ; de Souza Simões et al. 2017).

I. La nanoprécipitation

Nanoprécipitation ou La précipitation anti-solvant est une technique intéressante dans le processus d'encapsulation, en particulier pour la production de nanoparticules à base de polysaccharides et/ou de protéines. Il s'agit d'un procédé simple et peu coûteux, (Joye & McClements, 2014). La technique de nanoprécipitation est effectuée par la création d'une phase organique et d'une phase aqueuse dont la phase organique contient un solvant qui doit être miscible ou partiellement miscible dans la phase aqueuse ; le polymère (synthétique ou naturel), qui sera utilisé pour créer la matrice polymère des nanoparticules, doit être soluble dans le solvant et donc insoluble dans la phase aqueuse. L'ingrédient actif utilisé doit être soluble dans le solvant, et il doit avoir une interaction avec la matrice polymérique à former, et la phase aqueuse sera constituée uniquement d'eau et d'un surfactant (stabilisateur, tensioactif). Au cours du processus, une phase organique est ajoutée goutte à goutte à la phase aqueuse sous agitation magnétique modérée. Une autre option consiste à ajouter rapidement la phase aqueuse à la phase organique, induisant une précipitation instantanée, principalement à l'échelle nanométrique (Chambon, S. ;2014).

I.2.6 les Matériaux utilisés pour l'encapsulation

Le choix du bon matériau d'encapsulation est l'un des facteurs les plus importants pour la réussite du processus d'encapsulation des composés bioactifs, car il influence l'efficacité de l'encapsulation et la stabilité de la capsule. Le matériau d'enrobage idéal doit présenter les caractéristiques suivantes : il doit être inerte par rapport au noyau ; il doit pouvoir sceller et maintenir le noyau à l'intérieur de la capsule ; il doit assurer une protection maximale du noyau contre les conditions défavorables ; il ne doit pas avoir un goût désagréable dans le cas des aliments ; et il doit être applicable et peu coûteux. Bratovcic, A., (2019). Ces matériaux d'encapsulation ont été classés en polysaccharides, protéines, lipides et composés synthétiques (Fathi, Mozafari 2012 ; Jain et al. 2016).

A. Polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères naturels de carbohydrates constitués de plusieurs monosaccharides avec des liaisons glycosidiques, et que l'on trouve en abondance dans diverses sources, notamment végétales, animales, algales et microbiennes. Les variations des caractéristiques moléculaires des polysaccharides, telles que la solubilité, la capacité d'émulsification, la digestibilité et la capacité de rétention d'eau, sont principalement dues aux variations de leur structure chimique. (Fathi, Martín, 2014).

B. Les lipides

Les graisses et les huiles sont connues sous le nom de lipides, qui se composent de lipides polaires (par exemple, monoglycérides, phospholipides) et de lipides non polaires (par exemple, triacylglycérol, cholestérol) (Đorđević et al. 2016). Ils se caractérisent par une excellente fonctionnalité en matière d'émulsification, de formation de film et d'encapsulation de composés actifs. Ils sont moins toxiques et possèdent de nombreuses potentialités d'application industrielle (Fathi, Mozafari, & Mohebbi, 2012). Les phospholipides sont de bons composés tensioactifs et biocompatibles et conviennent à la stabilisation, à la protection et à la libération contrôlée de composés actifs (Đorđević et al ; 2016). La présence des amphiphiles naturels dans les phospholipides permettent plusieurs fonctionnalités importantes, à savoir l'auto-assemblage, la capacité d'émulsification et la mouillabilité, qui les rendent capables d'encapsuler des composés bioactifs hydrophobes et hydrophiles (Marsanasco et al, 2011 ; Zhao et al, 2017).

C. Polymères synthétiques

Les polymères artificiels sont obtenus par modification chimique de polymères naturels et sont les plus utilisés pour l'encapsulation par rapport aux polymères naturels. Ils se caractérisent par leur pureté, leur composition chimique modifiable grâce à la grande variété de monomères utilisés, des propriétés mécaniques, viscoélastiques ou tensioactives plus contrôlables, et le contrôle de la taille et de la masse molaire grâce à des méthodes de synthèse macromoléculaire appropriées (GültekİN HE et al 2013 ; Badri W et al 2017).

D. Protéines

Les protéines sont généralement considérées comme des matériaux sûrs ayant une grande importance nutritionnelle. Les protéines sont généralement obtenues à partir d'animaux et de plantes. Les protéines animales les plus couramment utilisées dans l'encapsulation sont les protéines de lactosérum, la caséine, la gélatine et le collagène, tandis que les protéines d'origine végétale sont les protéines de soja, la zéine et la gliadine (Tarhini et al, 2017). Elles sont insolubles dans des conditions acides, et facilement dissoutes à un pH alcalin (Chen et al, 2006). Les protéines possèdent d'excellentes fonctionnalités de formation de film, de gélification, d'émulsification de mousse et de capacité de rétention d'eau qui en font des supports effectifs pour les composés bioactifs tels que les graisses, les huiles, les acides gras et les saveurs (Chen et al., 2006 ; Jia et al., 2016).

Le tableau suivant représente les quatre classes de matériaux utilisés pour la nanoencapsulation avec des exemples de chaque classe.

Tableau I.5 quelques matériaux biopolymères utilisés pour la nano-encapsulation. (Ali Tahir et al, 2021)

Matériau des parois			
Polysaccharides	Lipides et cires	Protéines	Composés synthétiques
<ul style="list-style-type: none"> •gomme arabique •amidons modifiés •maltodextrines •alginates •pectine •carraghénane •dérivés de la cellulose •chitosan •cyclodextrines •particules d'amidon 	<ul style="list-style-type: none"> •huiles végétales hydrogénées •cire d'abeille •léithine •triglycérides à chaîne moyenne •béhénate de glycéryle 	<ul style="list-style-type: none"> •gélatine •protéines de lactosérum •caséinate de sodium •protéines de soja •caséines de gluten •zéine •fibroïne de soie 	<ul style="list-style-type: none"> •paclitaxel •mPEG₅₀₀₀-b-p •Polyacrylonitrile •Polycaprolactone •acide poly lactique

Parmi les biopolymères, la gélatine constitue une classe polyvalente et a connu récemment un grand succès en tant que vecteur de médicaments et de molécules bioactives. Différentes formes de vecteurs, telles que les hydrogels, les conjugués médicament/polymère, les micro/nanoparticules, les cocktails et les coques, ont été fabriquées et utilisées pour des applications médicales (Naidu, B. V et al 2011).

1.2.7 La Gélatine

Les gélatines sont des protéines dénaturées obtenues à partir de protéines de collagène animal par hydrolyse partielle à l'aide d'un acide ou d'un alcalin, ou par modification structurelle par dégradation enzymatique ou thermique. Deux types de gélatine sont disponibles dans le commerce : la gélatine A et la gélatine B, selon la méthode utilisée pour la préparer. La gélatine A est extraite de la peau de bœuf, de porc ou de poisson par hydrolyse acide, tandis que la gélatine B est obtenue à partir d'os de bœuf, de porc ou de poisson par hydrolyse alcaline (Hani et al, 2017 ; Ninan et al, 2011).

En général, les gélatines présentent de bonnes caractéristiques fonctionnelles en termes de biocompatibilité, de biodégradabilité, de capacité de rétention d'eau, de capacité de formation de film et d'anticarcérogénicité ; ce sont donc de bons matériaux pour l'encapsulation (Dang et

al. 2017). Cependant, les gélatines sont rapidement solubles dans l'eau, ce qui entraîne une libération rapide des composés actifs en solution aqueuse (Dang et al. 2017).

A. Composition chimique de la gélatine

D'après les analyses, la gélatine contient des pourcentages massiques suivants : 26,4 à 30,5% de glycine ; 14,8 à 18% de proline ; 13,3 à 14,5% d'hydroxyproline ; 11,1 à 11,7% d'acide glutamique ; et 8,6 à 11,3% d'alanine. Les autres acides aminés sont en faibles pourcentages comme la tyrosine avec un pourcentage de 0,2% seulement (Rosenbloom, J., et al, 1973). Le tableau ci-dessous présente les valeurs des acides aminés pour les deux types de gélatine A et B :

Tableau I.6 Nombre d'acides aminés ($\times 1000$ résidus) présents dans les deux types de gélatine (Terrien.A, 2015)

L'acide aminé	Gélatine type A	Gélatine type B
Alanine	112	117
Arginine	49	48
Aspartine	16	00
Acide aspartique	29	46
Cistéine	00	00
Acide glutamique	48	72
Glutamine	25	00
Glycine	330	335
Hystidine	4,0	4,2
Hydroxyproline	91	93
Hydroxylysine	6,4	4,3
Isoleucine	10	11
Leucine	24	24,3
Lysine	27	28
Méthionine	3,6	3,9
Phénylalanine	14	14
Proline	132	124
Sérine	35	33
Thréonine	18	18

Tryptophane	00	00
Tyrosine	2,6	1,2
Valine	26	22

B. Propriétés physicochimiques des gélatines

Le tableau suivant résume les propriétés physicochimiques essentielles des deux types de gélatine A et B.

Tableau I.7 Propriétés physicochimiques des gélatines de types A et B(Ahmady, A.et al 2021).

Propriétés physicochimiques	Type A	Type B
Acidité/alcalinité (solution aqueuse de gélatine à 1 % p/v à 25° C)	3.8–5.5	5–7.5
Densité (g/cm ³)	1.32	1.23
Point isoélectrique	7–9	4.7–5.4
Solubilité	La gélatine absorbe 5 à 10 fois l'eau de son poids et gonfle. Elle est soluble dans l'eau au-dessus de 40°C et forme une solution colloïdale qui se transforme en gel lors du refroidissement à 35-40°C. La gélatine est soluble dans la glycérine, les acides et les alcalins mais pratiquement insoluble dans l'acétone, le chloroforme et l'éthanol (95 %). , méthanol et éther.	

I.2.8 Caractéristiques physicochimiques des micro/nano particules

La taille des particules, la morphologie, la charge de surface et l'efficacité d'encapsulation sont les principaux paramètres à déterminer pour caractériser les micro/nano particules. Les analyses utilisées pour ces caractérisations sont mentionnées dans la partie suivante.

A. Taille

➤ **La diffusion dynamique de la lumière**

L'outil le plus courant pour analyser la taille des nanoparticules est la diffusion dynamique de la lumière (DLS dynamic light scattering). Le principe de base de cette méthode est d'observer le mouvement des particules et de mesurer leur mouvement brownien. La vitesse des particules est inversement proportionnelle à la taille de la particule et est appelée coefficient de diffusion translationnelle. La DLS calcule principalement la fluctuation qui se produit sur le trajet de la lumière traversant l'échantillon en raison du mouvement brownien des particules. La méthode DLS est très sensible et capable de mesurer la taille des particules jusqu'au niveau de 0,001 μm . Ses principaux avantages sont la rentabilité et la rapidité des résultats. De plus, les propriétés de la solution ne sont pas détériorées par le faisceau. Cependant, cette technique est très rudimentaire, effectue des mesures indirectes et ne peut être utilisée que pour les liquides et les gels. (Anandharamkrishnan, C. 2014).

➤ **Granulométrie laser**

D'après la Pharmacopée Européenne 7.0 dans le chapitre « 2.9.31 Analyse de la taille des particules par diffraction laser ». La granulométrie laser est une technique créée dans les années 1970. C'est une technique de choix pour mesurer des objets dont la taille est comprise approximativement entre 100 nm et 1000 μm . Cet appareil permet de déterminer la distribution granulométrique d'objets dispersés au sens large. Le principe de cette technique repose sur le fait que les particules diffusent la lumière dans toutes les directions, l'intensité de la diffusion dépendant de la taille des particules. Les particules plus grosses diffusent la lumière sous des angles plus petits et produisent une intensité de diffusion plus forte. L'appareil applique ensuite un modèle mathématique afin de rendre des résultats corrects.

B. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'une particule à encapsuler un principe actif est évaluée par deux paramètres ; l'efficacité d'encapsulation (EE%) et le taux de charge (DL, Drug loading). L'EE% est défini comme étant la quantité de la substance active présente dans les NP par rapport à la quantité initiale introduite dans la formulation.

$$EE\% = \frac{\text{quantité de l'extrait dans les particules}}{\text{quantité initiale de l'extrait}} \times 100$$

Le DL correspond à la masse de la substance active encapsulée par rapport à la masse de nanoparticules (Rigaux G, 2015).

$$DL\% = \frac{\text{masse de l'extrait dans les particules}}{\text{masse de nanoparticules préparées}} \times 100$$

Ces deux paramètres dépendent du procédé de formulation. Différentes méthodes d'analyse sont utilisées pour les déterminer telles que la spectroscopie ultraviolet-visible, la chromatographie en phase liquide, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Rigaux G 2015).

C. Charge de surface

Le potentiel zêta est la mesure de la charge globale qu'une particule acquiert dans un milieu spécifique et donne une indication de la stabilité potentielle d'un système colloïdal (Tiede et al. 2008). Elle explique également l'interaction électrostatique et la mobilité d'une solution colloïdale. L'interaction de répulsion électrostatique est utilisée pour mesurer et contrôler la stabilité de la solution. Elle explique les raisons de l'apparition de la dispersion, de l'agrégation ou de la floculation et peut être utilisée pour améliorer les conditions de la solution colloïdale. Les forces de Van der Waals sont présentes sur une courte distance et dominent la charge électrique et provoquent l'agrégation en solution (Anandharamakrishnan, C. 2014).

Tableau I.8 Stabilité des dispersions pour différentes valeurs de potentiel zêta (Arulprakasajothi et al 2018.).

Potentiel zêta (mV) i	Stabilité du colloïde
0 à ±5	Coagulation ou floculation rapide
±10 à ±30	Stabilité faible
±30 à ±40	Stabilité modérée
±40 à ±60	Stabilité bonne

Chapitre II

Matériel et méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Préparation de la matière végétale

La grenade (*Punica granatum L*), a été récoltée dans la région de Sétif en septembre-octobre 2017. Les fruits sont d'abord lavés puis l'écorce a été récupérée manuellement, La peau jaune du fruit est séchée à température ambiante et à l'obscurité durant 60 jours pour éviter la photo-oxydation, puis finement broyés à l'aide d'un moulin à café, de telle façon à obtenir une poudre avec des particules de taille uniforme.



Figure II.1 La peau jaune sèche et broyer

II.2 Préparation de l'extrait

Pour l'extraction des polyphénols par macération, nous avons opté pour le protocole décrit par (Çam and Hışıl, 2010) en y apportant quelques modifications : 20 g de la poudre (*Punica granatum*) est pesé puis ajouté dans un erlenmeyer de 500 mL a un volume de 200 mL de solvant. Cette solution est maintenue à l'abri de la lumière sous agitation pendant 24 h à température ambiante. On Laisse le milieu se décanter pendant 10 minutes puis on procède à la filtration en utilisant un tulle et morceau de Cotton. Le surnageant de l'eau distillé a été lyophilisé pendant 72 H pour éliminer les molécules d'eau. Par ailleurs, le surnageant de méthanol et éthanol /eau a été concentrés sous vide à 40 C° à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis le produit obtenu est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

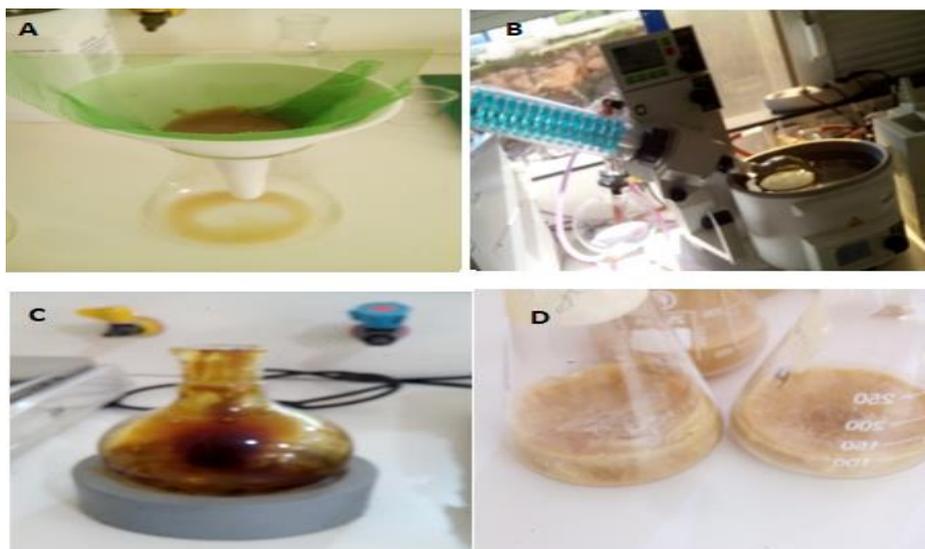


Figure II.2 les étapes d'extraction : (a) La filtration, (b) La concentration sous vide à l'aide d'un évaporateur, (c) l'extrait après évaporation, (d) extrait aqueux après lyophilisation.

II.3 Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en polyphénols a été déterminée par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu décrite par (Singleton et Rossi, 1965). Selon une méthode de dosage sur microplaque, Brièvement :

- Dans une microplaque, nous avons placé 20 μl de chaque extrait avec 100 μl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1:10) et 75 μl de solution de carbonate de sodium (75 g/L).
- Après 2 heures d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm dans le lecteur de microplaques.
- Le teneur des polyphénols est exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par g d'extrait.

II.4 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été quantifiée selon la méthode décrite par (Topçu et al. 2007). Brièvement:

- Dans une microplaque, Un volume de 50 μl de l'extrait végétal a été incubé avec 130 μl de méthanol, 10 μl de CH_3COOK , et 10 μl d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ pendant 40 min et l'absorbance a été lu à 415 nm.

- Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (QE/g extrait).

II.5 Dosage des Tanins hydrolysables

Les tannins hydrolysables ont été déterminés par la méthode décrite par (Çam et Hışıl 2010).

- 1 mL de chaque extrait dilué 10 fois et 5 mL de KIO_3 à 2,5% sont mélangés et vortexés pendant 10 secondes.
- L'absorbance du mélange de couleur rouge est déterminée à 550 nm.
- Les résultats sont exprimés en mg d'acide tannique équivalent par g d'extrait sec.

II.6 Analyses LC-MS/MS (chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem)

Les analyses LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) ont été réalisées à l'aide d'un UPLC-ESI-MS-MS Shimadzu 8040 Ultra-Haute sensibilité avec technologie UFMS et équipé d'une pompe binaire Nexera XR LC-20AD.

La chromatographie a été réalisée comme suit : 5 μ L d'un échantillon de 500 ppb ont été injectés dans la colonne Restek Ultra C18 3 μ m 150x4.6 mm en utilisant un gradient de phase mobile linéaire de 0.3 mL/min de l'éluant A (eau, 0.1% d'acide formique) et de l'éluant B (méthanol). La procédure d'éluion en gradient était la suivante : 0.1min à 1 min A 80% ,1 min à 30min A 20%,30 min à 40min A 0%, 40 min à 45min A 0%, 45 min à 60min A 80%. Pour l'optimisation des standards de polyphènes, nous avons utilisé l'injection directe sans colonne. Les conditions ESI étaient les suivantes : Gaz CID, 230 KPs ; dynode de conversion, -6,00 Kv ; température DL, 250 °C ; débit de gaz de nébulisation, 3,00 L/min ; bloc thermique, 400 °C ; débit de gaz de séchage, 15,00 L/min.

Les composés phénoliques ont été identifiés sur la base de leurs valeurs R_t et de leurs spectres de masse, ainsi que par comparaison des spectres avec ceux des étalons authentiques disponibles. L'attribution de la structure des composés pour lesquels aucun étalon n'était disponible a été basée sur une recherche systématique des ions moléculaires à l'aide de chromatogrammes de masse d'ions extraits et en comparant ces derniers avec les données de la littérature.

II.7 Études de simulation

L'optimisation de la géométrie de la punicalagine- β , de la punicalagine- α , de la punicaline, de l'acide gallique, de l'acide tannique et la modélisation de leurs complexes avec

l'eau, l'éthanol et le méthanol ont été réalisées à l'aide de l'algorithme MOPS dans le champ de force combiné MM3/MERA avec une prise en compte continue de l'influence du solvant selon le modèle MERA (Potemkin, 2009b; Savkov, 2021). La prédiction de l'activité biologique et du métabolisme a été réalisée à l'aide de modèles basés sur les algorithmes CiS et CoMin (Potemkin and Grishina, 2018).

A. Algorithme MOPS

L'idée principale de la méthode MOPS repose sur l'hypothèse que les changements de conformation dans la structure se produisent en raison de mouvements vibratoires. (Potemkin, 2009a, 2019, Savkov, 2021). Par conséquent, les directions des mouvements atomiques peuvent être déterminées en résolvant le problème spectral direct, à savoir former l'équation :

$$GF\mathbf{L}=\mathbf{L}\Lambda,$$

Où F est la matrice des constantes de force, les dérivées secondes de l'énergie par rapport à la coordonnée, G – représente la matrice de masse inverse, Λ et L – sont les valeurs propres et vecteurs propres (modes vibratoires) de la matrice $A = GF$. Les éléments de la matrice diagonale Λ sont les carrés des fréquences de vibration, de rotation et de translation. Le vecteur L indique la direction du mouvement des atomes.

MOPS trouve le complexe le plus stable, qui correspond à l'énergie potentielle minimale. Les étapes suivantes sont utilisées dans MOPS :

1. La géométrie du complexe initial est supposée. L'énergie du complexe initial est minimisée.
2. Le hessien de l'énergie potentielle - matrice F , Λ et L de la matrice $A=GF$ du complexe sont calculés.
3. Le mouvement des atomes du complexe s'effectue selon les modes vibrationnels. Le mouvement s'arrête lorsque l'énergie potentielle maximale la plus proche est atteinte.
4. L'énergie potentielle maximale est dépassée, puis l'énergie du complexe est minimisée en coordonnées cartésiennes.

Le complexe est préservé si l'énergie de la nouvelle structure est inférieure à celle de la structure d'origine. Les étapes 2 à 4 sont répétées pour la structure de plus faible énergie. L'énergie potentielle et la matrice F des complexes ont été calculées en utilisant la mécanique moléculaire combinée (MM3) et le champ de force MERA (Potemkin, 2009b).

L'énergie totale des complexes est égale à la somme de l'énergie totale MM3 (EMM3) et de l'énergie MERA (E_{MERA}) : $E_{\text{total}} = E_{\text{MM3}} + E_{\text{MERA}}$.

B. Modèle MERA

MERA (Model of Effective Radii of Atoms) (Potemkin, 2009b, 2019; Savkov, 2021) est un modèle non paramétrique. L'idée principale de la méthode : les atomes sont représentés comme des sphères en expansion. Les sphères voisines empêchent l'expansion de la sphère atomique. L'expansion s'arrête lorsque les pressions externes et internes des sphères atomiques sont égalisées. L'énergie d'interaction totale (E_{ij}) est calculée à l'aide de l'équation 1.

$$E_{\text{MERA}} = \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{j>1}^N E_{ij}, \quad E_{ij} = p_{ij} \left[-2U_{ij} \left(\frac{R_{ij}^e}{R_{ij}} \right)^6 + U_{ij} \left(\frac{R_{ij}^e}{R_{ij}} \right)^{12} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \right] \quad (1)$$

La probabilité de contact (p_{ij}) est calculée à l'aide de l'équation 2.

$$p_{ij} = \frac{n_{ij} S_i \exp(-E_{ij} / kT)}{1 + \sum_{l=1}^N \exp(-E_{il} / kT)} \quad (2)$$

Où U_{ij} est la profondeur du potentiel ; R_{ij}^e est la distance d'équilibre ; q_i et q_j sont les charges des atomes i et j ; ϵ_0 est la permittivité du vide ; n_{ij} est le nombre de coordination du i ème atome par rapport au j th atome ; S_i est la zone accessible au solvant du j th atome.

C. Algorithmes QSAR 3D CiS et CoMin

L'algorithme 3D QSAR Cinderella's Shoe (CiS) ((Potemkin and Grishina, 2008, 2018) classe les structures sur la base de l'extérieur moléculaire (champ moléculaire) représentées comme la somme des potentiels de Coulomb et de van der Waals déterminés sur la surface moléculaire. Ensuite, les paramètres du pseudo récepteur (l'ensemble des sphères atomiques avec rayons et charges) sont déterminés en utilisant le principe de complémentarité. L'utilisation d'un champ auto-cohérent permet d'obtenir l'arrangement optimal des composés dans le pseudo récepteur (l'énergie est constante, les forces d'interactions intermoléculaires sont égales à zéro). Les énergies d'interaction, les forces, les constantes de force des molécules avec le pseudo récepteur sont des descripteurs de l'algorithme.

L'algorithme 3D QSAR CoMin (Continual Molecular Interior analysis) classe les structures sur la base de l'intérieur moléculaire (fonctions quantiques, par exemple distribution de la densité électronique, "matière atomique", potentiels, etc. (Potemkin et al., 2008, 2018).

L'algorithme superpose les structures de l'ensemble de données d'apprentissage. Le processus est exécuté jusqu'à ce que la différence minimale des fonctions quantiques aux jonctions du réseau généralisé soit atteinte pour toutes les molécules de l'ensemble de données. Les valeurs des fonctions quantiques aux jonctions sont les descripteurs de l'algorithme.

Ensuite, le réseau neuronal à réaction linéaire (LNN), le réseau neuronal à neurones sigmoïdes (NNSN) ou le modèle de régression linéaire (LRM) sont utilisés pour trouver les relations entre l'activité biologique et les descripteurs CiS ou CoMin. La valeur de l'activité biologique (BA) est ensuite convertie en probabilité (p) à l'aide d'une fonction de désirabilité $p = \exp(-\exp(a-b \times BA))$ Potemkin et al., 2008. Pour prédire l'activité biologique des molécules à partir d'un ensemble de données prédictives, les molécules sont orientées dans un pseudo récepteur (CiS) ou superposées au réseau généralisé (CoMin). Ensuite, les descripteurs sont calculés et la bioactivité est prédite à l'aide de modèles précédemment trouvés.

II.8 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été réalisée in vitro en utilisant des réactions colorimétriques quantitatives avec un lecteur de microplaques (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire).

A. Pouvoir de piégeage des radicaux libres DPPH•

L'activité antioxydante des extraits évaluée par le radical libre DPPH• (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été mesurée par la méthode décrite par (Blois 1958) à différentes concentrations.

- 40 µl de chaque extrait ont été ajoutés à 160 µl de solution de DPPH• préparée dans du méthanol.
- Le contrôle négatif a été préparé en remplaçant les extraits par 40 µl de méthanol. Par ailleurs, le BHA a été utilisé comme étalon.
- Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.
- Le pourcentage d'activité de piégeage du radical DPPH• de chaque échantillon a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Échantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100.$$

A_{Control} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{Échantillon}}$ est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon. Les résultats ont été établis en tant que concentration d'inhibition de 50 % ($IC_{50} = \mu\text{g/ml}$), ce qui signifie que la concentration de l'échantillon fournit une activité de 50 %.

B. Activité de piégeage de l'ABTS+

L'activité de piégeage des extraits contre le radical libre ABTS⁺ (2, 2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6- acide sulfonique) a été évaluée selon la méthode de (Re et al. 1999).

- La solution de cation ABTS a été préparée comme suit : 2,45 mM de persulfate de potassium ont été ajoutés à 7 mM de solution d'ABTS⁺ dans l'eau, puis incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h et l'absorbance a été ajustée avec H₂O à 0,700±0,020 à 734 nm.
- 160 µl de la solution précédente ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon et de standards en trois exemplaires.
- Pour le contrôle négatif, nous remplaçons l'extrait par du méthanol tandis que pour les standards nous avons utilisé du BHT et du BHA.
- Tous les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance a été lue à 734 nm et le pourcentage d'inhibition a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Échantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

A_{Control} est l'absorbance du blanc et A_{Échantillon} est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon.

Les résultats ont été établis en tant que concentration d'inhibition de 50 % (IC₅₀ = µg/ml), ce qui signifie que la concentration de l'échantillon fournit une activité de 50 %.

C. Essai GOR' (radical libre galvinoxl)

L'activité de piégeage du radical libre galvinoxl de nos trois extraits a été testée selon la méthode décrite par (Shi, Noguchi, et Niki 2001).

- 40 µL de différentes concentrations des trois extraits ont été ajoutés à 160 µL d'une solution méthanolique de Galvinoxyl à 0,1 mM.
- Le contrôle négatif a été évalué en remplaçant l'extrait par du méthanol et le BHT a été utilisé comme étalon.
- Les mélanges ont été incubés pendant 120 min dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été lue à 428 nm. L'équation suivante a été utilisée pour calculer le piégeage du radical galvinoxyle :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

D. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC)

Pour la capacité antioxydante réductrice du cuivre, nous avons suivi la méthode décrite par (Apak et al. 2004).

- 50 μL de solution de CuCl_2 (10 mM) ont été mélangés avec 50 μL de la solution de néocuprine (7,5 mM), 60 μL de solution tampon d'acétate d'ammonium (NH_4Ac , 1 M, $\text{pH} = 7,0$) et 40 μL de différentes concentrations des trois extraits.
- Les extraits ont été remplacés par du méthanol pour le contrôle négatif où le BHT et le BHA ont été utilisés comme étalons.
- Les échantillons ont été incubés pendant 1 heure à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 450 nm et les résultats ont été exprimés en $A_{0,5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

E. Essai du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été réalisé selon la méthode décrite par (Oyaizu 1986). Ce test a été réalisé en deux parties.

- Avant l'incubation, nous avons mélangé un volume de 10 μL d'échantillon à différentes concentrations avec 40 μL de solution tampon phosphate (0,2 M, $\text{pH} 6,6$), 50 μL de solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%, w/v) puis nous avons incubé le tout pendant 20 min à 50 °C.
- Ensuite, 50 μL d'acide trichloracétique (TCA, 10%), 40 μL d'eau distillée et 10 μL de solution de FeCl_3 (0,01% w/v) ont été ajoutés.
- L'acide ascorbique, l'acide tannique et l' α -Tocophérol ont été utilisés comme contrôle positif à différentes concentrations. L'absorbance par rapport au blanc (méthanol) a été lue à 700 nm.

F. Test de la phénanthroline

Le dosage de la phénanthroline a été évalué selon la méthode de (Szydłowska-Czerniak et al. 2008).

- 10 μL des trois extraits à différentes concentrations ont été mélangés avec 50 μL de FeCl_3 (0,2%), 30 μL de phénanthroline (0,5%) et 110 μL de méthanol.
- Pour le contrôle négatif, nous avons utilisé du méthanol tandis que pour le contrôle positif, nous avons utilisé du BHT et du BHA.

- Les mélanges ont été incubés pendant 20 min à 30 °C et l'absorbance a été mesurée à 510 nm.
- Les résultats ont été donnés comme A_{0,50} qui correspond à la concentration donnant 0,5 absorbances.

II.9 Effet anti-inflammatoire des extraits in vitro

L'effet anti-inflammatoire in vitro des extraits est déterminé à l'aide du test d'inhibition de la dénaturation de la BSA selon le protocole de Hamoudi et al. (2021). Brièvement,

- 500 µl de BSA à 0,2 % (albumine sérique bovine) préalablement préparée dans un tampon tris-HCl (20 mM, pH 6,8) sont ajoutés à 500 µl de différentes concentrations d'extraits ou d'aspirine (10mg/ml).
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min puis à 65°C pendant 10 min.
- Après refroidissement, les absorbances sont mesurées à 660 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Échantillon}}) / A_{\text{Control}}] \times 100.$$

II.10 Activité antibactérienne

Pour l'activité antibactérienne, nous avons utilisé la méthode de diffusion de Well.

- Des plaques de milieu gélosé Muller Hinton ont été ensemencées avec des cultures d'inoculum microbien âgées de 18 à 24 heures avec une densité optique de 0,08 à 0,1.
- Les puits (6 mm de diamètre) ont été découpés dans le milieu agar à l'aide de pointes de pipette stérilisées, puis des extraits de plantes dans un volume de 50 µl ont été versés dans les puits.
- Les plaques inoculées ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures et les zones d'inhibition ont été mesurées en mm.
- Trois répétitions ont été préparées pour chaque micro-organisme. Les bactéries pathogènes/contaminantes alimentaires à Gram positif utilisées dans cette étude étaient *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, et les bactéries à Gram négatif étaient *Escherichia coli* ATCC 7839, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

➤ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La méthode de dilution en bouillon est une procédure simple permettant de tester un petit nombre d'isolats, même un seul isolat. La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension de bactérie de concentration appropriée est testée contre différentes concentrations d'un agent antimicrobien.

La MIC est déterminée selon le protocole décrit par Balagurunathan, 2020,

-La concentration d'antimicrobiens est ajustée à la concentration correcte d'intérêt, dans notre cas, on va tester le *Staphylococcus aureus ATCC 6538P* en choisissant 1mg/ml comme concentration initiale. Puis en mélangeant l'antimicrobien d'origine avec le milieu.

-Prenez huit puits d'une microplaques d'une capacité de 200µl et marquez de 1 à 8.

-Ajoutez environ 1 ml de la solution d'extrait a concentration 1mg/ml dans le premier puits et 500 µl d'eau distillée dans les puits restants. Transférez ensuite 500 µl de l'échantillon du premier puits au deuxième tube et poursuivez la dilution jusqu'au huitième puit.

-Suspendre les colonies fraîchement cultivées de cultures bactériennes dans 2 ml de bouillon nutritif stérile et ajuster la turbidité à 0,5 normes McFarland.

-Dans une nouvelle ligne de puits, ajouté 80 µl de bouillon nutritif (MHB) dans chacun des puits de p1 à p8, 100 µl dans p 11 et 90 µl dans p12.

-Ajoutez 10µl de la culture bactérienne dans les puits de1 a 8 et p12.

-10µl de chaque dilution de l'extraits doivent être ajouté au puits 1 à 8

-Considérer les puits 11 et 12 comme contrôle négative et contrôle positive, respectivement.

Incuber tous les tubes à 37 °C pendant 18 à 24 h,

-Ce test a été réaliser pour les trois extraits, et chaque extraits subit 3 répétition.

La CMI est généralement déterminée par la turbidité, Un milieu trouble signifiera que la culture a poussé et donc que la concentration n'est pas assez importante ; à l'inverse, un milieu transparent sera la preuve que la culture n'a pas poussée.

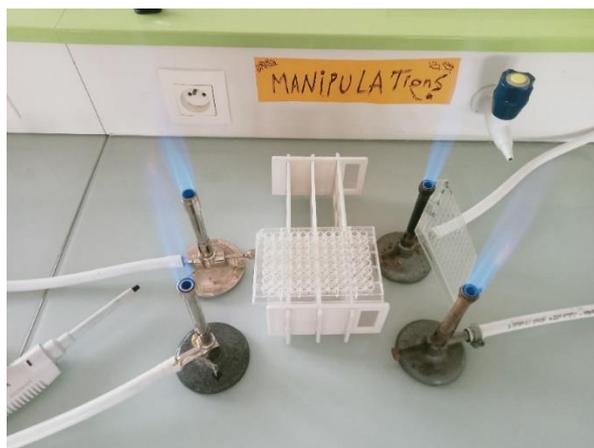


Figure II.3 la méthode de travail et de stérilisation pour déterminer la CMI.

II.11 Analyse statistique

Les données ont été enregistrées sous forme de moyennes \pm écart-type de trois mesures. L'analyse de la variance a été réalisée par une analyse de la variance à sens unique (ANOVA). Les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par le test de Tukey, les p -valeurs inférieures à 0,05 étant considérées comme significatives.

II. 12 Encapsulation des extraits de la peau de grenade

II.12.1 Procédé de préparation des nanoparticules vides de gélatine

Les nanoparticules sont préparées au moyen de la technique de la nanoprécipitation, ou la diffusion du solvant vers le non-solvant conduit à la formation instantanée d'une suspension de nanoparticules. Alors, la phase aqueuse obtenue en dissolvant de la gélatine dans de l'eau à 60°C jusqu'à la dissolution totale pour obtenir une solution de 1%, après refroidissement, La phase organique l'éthanol est ajoutée lentement à température ambiante et sous agitation magnétique modérée jusqu'à turbidité de la suspension, Le solvant organique est évaporé ultérieurement à l'aide de d'un rotavapor R-124 de Buchi®. La solution obtenue a été diluée avec l'eau distillée pour obtenir 100 ml, puis lyophiliser et conserver à 4°C.

II.12.2 Synthèse des nanoparticules a base des extraits de la peau de grenade

Les nanoparticules sont préparées en se basant sur les mêmes conditions de la préparation des nanoparticules vides optimales. Pour ce faire, une solution de chaque extrait de à une concentration de 10 mg/ml a été préparée dans l'eau distillée puis ajoutée à la solution de gélatine à 1%. On ajoute 90 ml d'éthanol au mélange extrait/ gélatine puis la préparation précédente est maintenue sous agitation magnétique (500 rpm) à température ambiante. Le

solvant organique est évaporé ultérieurement à l'aide d'un rotavapor R-124 ® Buchi , le reste de la suspension a été dilué et lyophilisé pour obtenir des nanoparticules poudre

II.12.3 Caractérisation des nanoparticules des extraits de la peau de grenade

A. Potentiel Zéta

Le taux de mouvement des particules sous l'influence d'un champ électrique oscillant externe a été mesuré avec un Zetamètre Horiba nanopartica (SZ-100, USA).

Le potentiel zéta des particules obtenues est mesuré dans le milieu de préparation l'éthanol et dans l'eau distillé ou ils sont placés dans une cellule de matière plastique. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C

B. Analyse granulométrique par laser

L'analyse granulométrique au laser a été utilisée pour déterminer la distribution granulométrique des nanoparticules. Le granulomètre à diffraction laser de Zetamètre Horiba nanopartica (SZ-100, USA) a été utilisé pour l'analyse, fournissant des distributions de taille de particules rapides et précises. Il est capable de mesurer des gammes de tailles de particules allant du nanomètre au millimètre. Les échantillons sont passés sous forme de suspensions de nanoparticules préparées dans de l'éthanol, ces échantillons sont placés dans une cellule en plastique, puis la lecture est effectuée.

C. Efficacité d'encapsulation

Les suspensions contenant les extraits sont soumises à une centrifugation à 15000 tr/min pendant 30 min. Le surnageant est éliminé et la quantité d'extrait encapsulée est mesurée après ajout de l'eau distillée. La solution résultante a été filtrée et analysée par un spectrophotomètre ultraviolet UV-1800 (Shimadzu, Japon) et l'absorbance au longueur d'onde 364 nm a été déterminé. Le pourcentage d'efficacité d'encapsulation (EE%) et le pourcentage de chargement en principe actif (DL%) sont calculés en utilisant les équations mentionnées dans le chapitre I, Les spectre UV et les droites d'étalonnages sont présentés dans l'Annexe E.

D. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La gélatine, les extraits et les particules vides et chargées des extraits sont analysées à l'aide d'un spectromètre FTIR (spectromètre Thermo Scientific FTIR avec logiciel IR MONIC Solution). Une lyophilisation est effectuée avant l'analyse des nanoparticules (NPs) liquides ou les spectres sont enregistrés dans une plage de 400 à 4000 cm^{-1} .

E. Microscopie à force atomique (Atomic force microscopy AFM)

Le microscope à force atomique (AFM atomic force microscope) est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Pour réaliser cette analyse, les échantillons sont séchés à l'air libre sur des boîtes de Petri afin d'obtenir des films contenant des particules de chaque extrait encapsulé et analyser par un Microscope à force atomique (AFM) Asylum Research an Oxford Instruments company de Type MFP-3D Classique en mode contacte.

F. L'analyse par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X des échantillons a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre de type XPERT-PRO. Les mesures ont été effectuées dans un intervalle angulaire (2θ) de 10 à 79°, avec un pas de scan de 0,1 s, utilisant un rayonnement Cu K-alpha à 1,54 Å. L'irradiation a été effectuée à un voltage de 40 kV et un courant de 30 mA.

G. La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique capable de produire des images et des analyses élémentaires en haute résolution de la surface d'un échantillon. Dans notre cas les échantillons sont lyophilisés. Le MEB utilisé est un Thermo fisher Apreo 2 C, doté d'une source électronique type FEG-Schottky : canon à émission de champ (cathode chaude) et équipé de la colonne électronique Ultra Haute Résolution Gemini®, optimisée pour l'amélioration des performances à basse tension, permettant l'analyse d'échantillons à l'échelle nanométrique.

Chapitre III

Résultats et discussion

III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Rendement de l'extraction

L'eau, le méthanol et l'éthanol/eau (50 :50) ont été choisis comme solvants dans pour l'extraction de l'écorce jaune de grenade. La macération de la poudre d'écorce jaune de grenade dans l'eau, le méthanol et l'éthanol/eau (50:50) a permis d'obtenir un extrait de couleur brun foncé. Le rendement des différents extraits est présenté dans le tableau III.1. L'extrait hydroéthanolique a montré le rendement d'extraction le plus élevé (50,62%) suivi par l'extrait méthanolique (36,5%) et l'extrait aqueux (30,4%). Cette variation peut être attribuée aux différences de polarité des solvants et à la solubilité de la poudre de la plante dans les différents solvants. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Malviya, Jha, et Hettiarachchy (2014), qui montrent que l'extraction de l'écorce totale de grenade avec un mélange l'éthanol/eau (50:50) a donné le rendement le plus élevé (16,28 %) suivi du méthanol (environ 10 %) puis de l'extrait d'eau (5,74 %), qui a présenté le rendement le plus faible. Nos rendements d'extraction sont cependant plus élevés que ceux rapportées par ces auteurs.

Cette grande différence peut être attribuée au type de la variété de grenade variété (Ganesh d'Inde vs la variété Algérienne), à la méthode de préparation de la poudre d'écorce de grenade et les conditions d'extraction. Par ailleurs, nos résultats confirment ceux de Zaki et al. (2015), qui ont observé que le rendement de l'extrait de méthanol des deux variétés Manfalouty et Wardey, était supérieur à celui des extraits aqueux. De même, une étude d'Abid et al. (2017), a montré que l'extraction de l'écorce de grenade à l'eau produisait le rendement le plus élevé en extrait total suivi de l'éthanol et de l'acétone, ce qui est probablement lié à l'hydrosolubilité de la majorité des composés.

III.2 Teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins hydrolysables

Compte tenu de l'importance des composés phénoliques en tant que produits bioactifs, la quantification de la teneur en composés phénoliques totaux, en tanins hydrolysables et en flavonoïdes a été évaluée et les résultats sont présentés dans le tableau III.1. La teneur totale en composés phénoliques de l'écorce de grenade extraite au méthanol est de $259,37 \pm 13,66$ mg GAE/g, représentant la valeur la plus élevée. En comparaison, l'extraction à l'eau donne $205,58 \pm 8,21$ mg GAE/g, tandis que l'extrait hydroéthanolique affiche la teneur la plus faible, soit $166,84 \pm 43,60$ mg GAE/g.

Une étude antérieure (Negi et Jayaprakasha 2003), a rapporté une valeur de TPC de l'écorce de grenade méthanolique de 460 mg (+)-catéchine /g qui est beaucoup plus élevée que celle obtenue dans cette étude. Toutefois, l'extrait aqueux dans cette même étude présente un TPC de 140 mg (+) -catéchine/g, qui est plus faible que celui observé dans notre travail. Toutefois, l'extrait aqueux présente un TPC (140 mg (+) -catéchine /g), qui est plus faible que celui observé dans ce travail. Cependant, Elfalleh et al. (2012) ont rapporté des valeurs inférieures à celle observées pour les extraits méthanolique et aqueux, avec des teneurs en composés phénoliques de $85,60 \pm 4,87$ GAE mg/g, $53,65 \pm 4,13$ GAE mg/g respectivement. Dans une autre étude réalisée par Wissam et al. (2012), les extraits aqueux ont montré le rendement en polyphénols totaux le plus élevé, suivi de l'éthanol à 50 %.

De plus, la quantité de flavonoïdes dans nos extraits reste relativement faible par rapport à la teneur en composés phénoliques totaux, où les valeurs obtenus pour les extraits hydroéthanolique, méthanolique et aqueux sont respectivement de $64,19 \pm 11,38$ mg QE/g , $63,20 \pm 10,02$ mg QE/g et $51,35 \pm 22,15$ mg QE/g. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Çam et Hışıl (2010), qui ont trouvé pour les extraits méthanolique et aqueux des teneurs en flavonoïdes de $18,1 \pm 0,5$ mg CE/g et $6,2 \pm 0,2$ mg CE/g, respectivement. De même, la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique testé par Khalil, Khan, et Shabbir (2018) est inférieure à celle observée dans notre étude.

Reconnaissant que les tanins hydrolysables soient les phénoliques dominants dans la peau de grenade, sa teneur a été quantifiée dans la peau jaune de grenade pour chaque solvant, les tanins hydrolysables de l'extrait méthanolique était la valeur la plus élevée par ($221,32 \pm 0,00$ mg TAE/g) suivie par l'extrait hydroéthanolique ($187,22 \pm 0,00$ mg TAE/g) que l'extrait aqueux par $149,44 \pm 0,00$ mg TAE/g). Le résultat rapporté dans une étude précédente par (Galaz et al. 2017) qui est plus élevé que le nôtre, où ils ont trouvé $305,5 \pm 17,4$ mg TAE/g. En outre (Çam et Hışıl 2010) a trouvé méthanolique et aqueux extrait contient $260,2 \pm 12,6$ et $82,6 \pm 5,6$ mg TAE/g) respectivement.

Les résultats indiquent que le méthanol donne les valeurs les plus élevées pour les polyphénols totaux, de flavonoïdes et les tanins hydrolysables qui sont en accord avec les travaux de Jalili et al. (2020), Elfalleh et al. (2012) et Çam et Hışıl (2010). Bien que, Jalal et al. (2018) n'ont observé aucune différence significative entre les extraits aqueux et les extraits méthanoliques dans l'extraction des composés phénoliques de la peau de grenade.

Comme décrit ci-dessous, ces variations pourraient être dues aux conditions d'extraction et aux solvants utilisés, et probablement aussi à la variabilité associée à la différence de stade de maturité des cultivars et de la zone géographique d'origine (Gullon et al. 2016) ; (Pagliarulo et al. 2016). En effet, les niveaux de polyphénols totaux augmentent au début de la croissance de la peau, mais diminuent ensuite généralement au cours de la maturation (Saad et al. 2012) ; (Kharchoufi et al. 2018). En résumé, les résultats présentés soulignent que le contenu phénolique total est nettement plus élevé que des flavonoïdes, les tanins hydrolysables représentant environ 90 % du contenu phénolique de l'écorce de grenade. Ces observations sont confirmées par les analyses LC-MS/MS, qui ont permis d'identifier 19 composants principaux dans l'écorce de grenade jaune, parmi lesquels les tanins hydrolysables et les acides phénoliques prédominent.

Tableau III.1 Rendement d'extraction, phénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux hydrolysables de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique.

Extrait	Rendement %	Polyphénole totaux (mg GAE/g)	flavonoïdes (mg QE/g)	Tannins hydrolysables (mg TAE/g)
Aqueux	30,4	205.58± 8.21 ^{a,b}	51,35 ± 22.15 ^a	149,44± 0,00 ^c
Méthanolique	36,5	259.37 ± 13.66 ^a	63,20± 10.02 ^a	221,32± 0,00 ^a
hydroéthanolique	50,62	166.84 ± 43.60 ^b	64,19±11.38 ^a	187,22±0,00 ^b

Les valeurs avec des exposants différents (a, b, c, d ou e) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes (p < 0,05).

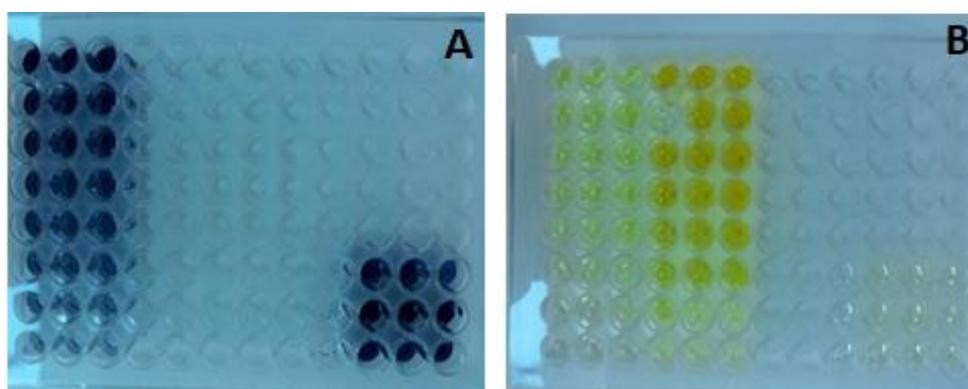


Figure III.1 résultats de dosage des polyphénole totaux (A) et flavonoïdes(B) sur microplaque.

III.3 Caractérisation des composés phénoliques par LC-MS

L'écorce de grenade est riche en polyphénols, et les trois extraits ont été analysés par UPLC-ESI-MS-MS pour permettre l'identification des différents composés phénoliques. Dans cette étude, 22 polyphénols et flavonoïdes ont été examinés dans les trois extraits en utilisant vingt-deux étalons pour la comparaison des temps de rétention. Parmi ces composés, 15 ont pu être identifiés. Les résultats sont exprimés en pourcentage de surface, ce qui signifie la proportion de chaque composé par rapport au total des composés extraits. Les résultats sont présentés dans le tableau III.2.

Dans les extraits aqueux et méthanoliques, l'acide maléique (47,534 min) représente la surface maximale avec 72,1 % et 59,80 % respectivement, alors que dans l'extrait hydroéthanolique, il ne représente que 8,2428 %.

Dans cet extrait hydroéthanolique, l'acide coumarique (1,349 min) domine, avec 88,69 %, tandis que dans l'extrait méthanolique, il ne représente que 17,00 % et n'est pas détecté dans l'extrait aqueux. La rutine (40,531 min) est présente à 16,4 %, 11,07 % et 0,96 % dans les extraits aqueux, méthanolique et hydroéthanolique, respectivement. L'acide folique (38,528 min) constitue 6,88 %, 2,7 % et 1,01 % des surfaces des extraits méthanolique, aqueux et hydroéthanolique.

Enfin, l'acide chlorogénique (32,522 min) représente également une proportion significative dans les trois extraits, avec des valeurs de 2,6 %, 1,97 % et 0,34 %, respectivement. Le Lawson, keampferol, l'acide ascorbique, l'acide salysilic et l'acide férulique ne sont pas détectés dans les trois extraits, alors que l'acide caféique (6.057min) et le thymol (0.951 min) ne sont présents que dans l'extrait hydroéthanolique avec 0.0002% et 0.2026% respectivement.

Une observation intéressante est l'absence d'acide gallique dans les trois extraits malgré son identification comme composé bioactif majeur dans l'écorce de grenade par El-Hadary et al (2020) et Kumar et al (2022).

Nos résultats concorde avec ceux de Balaban et al (2022), qui n'ont également pas détecté l'acide gallique dans leurs extraits selon les analyses TLC et HPLC. En outre, l'acide maléique a été détecté dans l'écorce de grenade selon l'analyse HPLC.

La vanilline (8.403 min), la chrysin (21.85 min), la quercétine (22.97 min), la viniférine (23.891 min), le bêta-carotène (32.656 min), l'hespirine (37.771 min), l'hydroxy coumarine (47.835 min) et la naringénine (47.723) ont été détectés dans les trois extraits avec des surfaces minimales mentionné dans le Tableau III.2.

La présence de certains composés antérieurs tels que le chlorogène, la vanilline, la rutine, la quercétine, la naringénine et l'hespirtine dans l'extrait de peau de grenade est confirmée dans l'étude réalisée par El-Hadary et al 2020. De plus, plusieurs études ont confirmé la présence de nombreux autres composés phénoliques dans les fruits de grenade, détectés par analyse HPLC.

Ali et al. (2014) ont démontré la présence de l'acide chlorogénique, de l'acide coumarique et de la rutine dans l'extrait méthanolique de la peau de grenade. De plus, Cai et al. (2004) et Mansour et al. (2018) ont révélé la présence de quercétine et d'acide vanillique dans l'écorce de grenade. Les différences remarquables dans le pourcentage de la surface des mêmes composants d'un extrait à l'autre peuvent être dues à la polarité du solvant qui affecte leur solubilité. (Balaban, et al 2022).

Tableau III.2 Liste des composés phénoliques détectés à partir des trois extraits par comparaison avec des standards authentiques par Hplc.

Nom	T de rét (min)	% de la surface		
		Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait hydroethanolique
Thymol	0.951	0,00	0,00	0.2026
Acide coumarique	1.349	0,00	17.00	88.6907
Acide caffeique	6.057	0,00	0,00	0.0002
Vanillin	8.403	0.7	0.58	0.0100
Chrysin	21.85	3.5	1.23	0.3208
Quercitine	22.97	1.4	0.97	0.1444
Viniferin	23.891	0.0	0.01	0.0011
Acide chlorogénique	32.522	2.6	1.97	0.3418
beta carotene	32.656	0.3	0.10	0.0106
Hespiritin	37.771	0.1	0.10	0.0198
Acide folique	38.528	2.7	6.88	1.0114
Rutine	40.531	16.4	11.07	0.9561
Hydroxy comarin	47.835	0.2	0.09	0.0128
Acide maleique	47.534	72.1	59.80	8.2428
Naringenin	47.723	0.1	0.05	0.0070

Au total, 48 composés phénoliques ont été détectés, dont 25 entre eux ont été identifiés (tableau 2). Après l'analyse des spectres MS, ces composés phénoliques sont classés en différentes catégories : 14 tanins hydrolysables, 5 acides phénoliques, 3 flavonoïdes, 2 anthocyanines et 1 proanthocyanidine. Ces résultats sont résumés dans le tableau III.3, et représentés dans les chromatogrammes de la figure III.2.

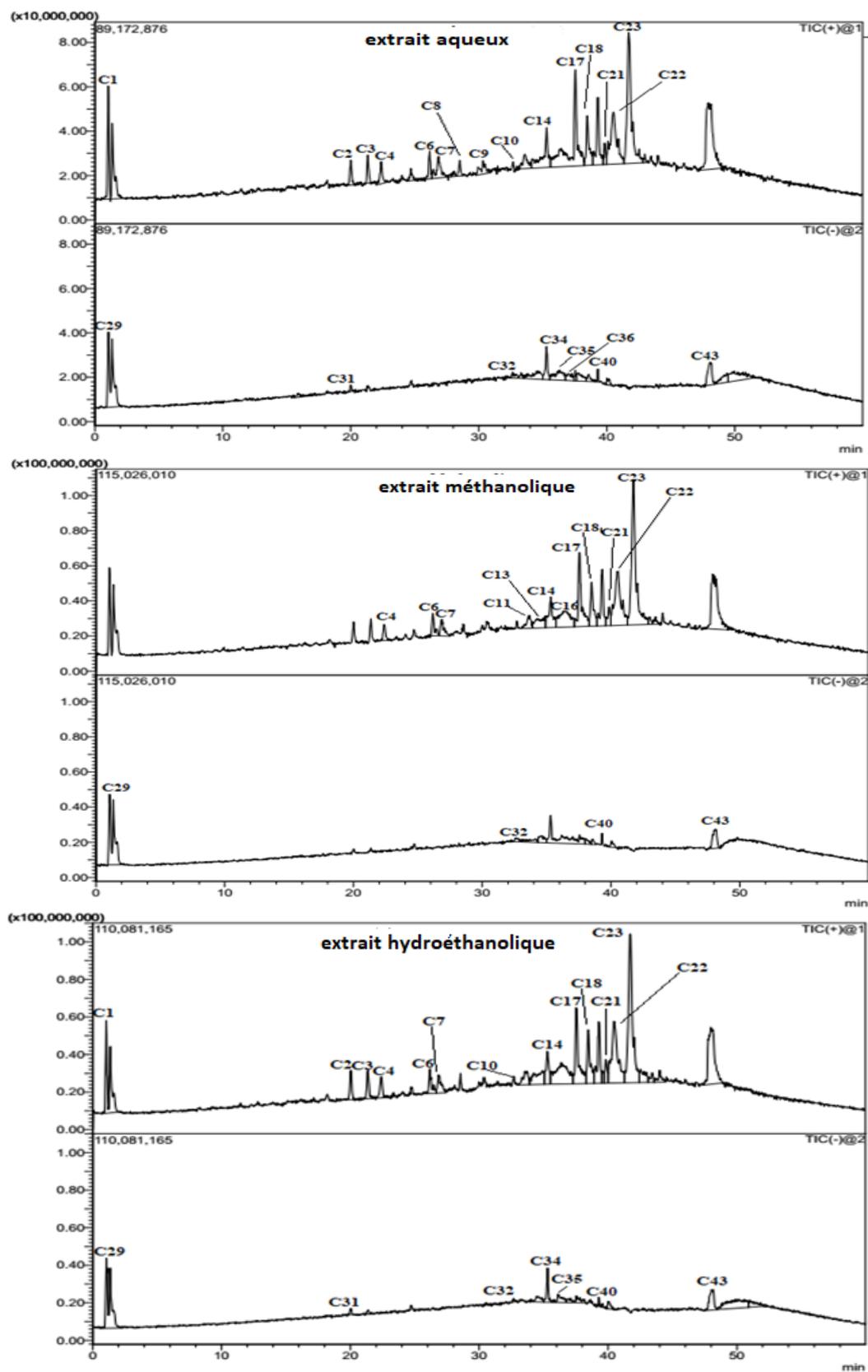


Figure III.2 Chromatogrammes LC-MS/MS des extraits aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de la peau jaune de grenade.

Tannins hydrolysables

C1 (1,053min) présente un ion moléculaire à 303 m/z avec des ions fragments à 165,181, 215 et 247 m/z et est caractérisé comme étant de l'acide ellagique. C4 (22.365min) avec un ion moléculaire à 475 m/z et des ions fragments à 181,227 et 321 m/z, a également été également identifié comme étant l'acide ellagique-désoxyhexoside, comme le rapportent plusieurs études Gosset-Erard et al (2021) ; Feng et al (2022) ; Liu et al (2022). Selon plusieurs études (Taleghani et al., 2021 ; Russo et al., 2018 ; Ambigaipalan et al., 2016, Aguilar-Zárate et al., 2017), qui a produit un ion moléculaire à 331 m/z et des ions fragments à 299 et 181m/z a été caractérisé comme galloyl-hexoside, C8 (28,514 min), qui a produit un ion moléculaire à 331 m/z et des ions fragments à 299 et 181 m/z, a été caractérisé comme un galloyl-hexoside. De même, C9 (30.323 min) et C10 (33.596) ont été identifiés comme des dérivés du galloyl-hexoside. C9 a produit un ion moléculaire à 617 m/z, avec des fragments à 181, 301 et 383 m/z, résultat rapporté dans une étude précédente (Fischer et al., 2011). Quant à C10, il a généré un ion moléculaire à 635 avec des fragments à 181 ,365 ,280 m/z, comme indiqué dans plusieurs études (Feng et al., 2022 ; Taleghani et al., 2021 ; Liu et al., 2018).

C16 (36,495 min) et C23 (41,715 min) ont été identifiés comme des dérivés de la punicalagine, produisant un ion moléculaire à 1085 m/z et un fragment commun à 185 m/z. C16 a été identifié comme Punicalagin A et C23 punicalagine B. Ces deux composés sont les plus importants et les plus abondants dans le fruit de la grenade, ce qui explique la présence rapportée dans de nombreuses études. (Liu et al., 2022 ; Taleghani et al 2021; Russo et al 2018; Ambigaipalan et al 2016 ; Aguilar-Zárate et al 2017 ; Fischer et al 2011; Abdulla et al 2017; Al-Rawahi et al 2013).

C18 (38.471 min) a été identifié comme gallotannine, car il a montré un ion moléculaire à 804 m/z, un résultat rapporté par Sentandreu et al. (2013). Dans cette étude, les auteurs ont également observé qu'un dérivé de punicalagine génère à un ion moléculaire à 1101 m/z qui correspond à C22 (40.516 min) dans notre étude. Les composés précédemment mentionnés ont été détectés en mode positif, tandis que les composés suivants en mode négatif. C29 (1.067 min) avec un ion moléculaire à 519 m/z et des ions fragments à 378 331 273 211 m/z a été identifié comme un dérivé de l'acide ellagique, ce qui est également rapporté par Al-Rawahi et al (2013). C31(19.984 min) a été identifié comme digalloyl -HHDP-hexoside (pedunculagin), parce qu'il a produit un ion moléculaire à 758, avec des fragments à 741 723 249 et 205. Cette

identification est également mentionnée dans plusieurs études, telles que celles de Liu et al 2018 et Abdulla et al 2017.

C35 (36.310) et C36 (36. 975 min) ont présenté le même ion moléculaire à 393 m/z avec des fragmentations à 249 et 325 m/z, correspondent au digalloyl-HHDP-hexoside (dérivé de l'acide ellagique) comme rapporté par le Parisi et al (2022). C43 (48.094 min), avec un ion moléculaire à 701m/z, correspond au Di-HHDP-Galloloylglucose-pentose, tel que mentionné par Aguilar-Zárate et al (2017). Les composés C4, C18, C22, C23, C29 et C43 sont présents dans tous les extraits. C1, C10, C31 et C35 sont présents dans les extraits aqueux et hydroéthanoliques, tandis que C8, C9 et C36 n'ont trouvés que dans l'extrait aqueux. Enfin, C16 a été identifié uniquement dans l'extrait méthanolique.

Acides phénoliques

Cinq acides phénoliques ont été identifiés dans nos extraits, en mode positif. C11 (33.668 min) a présenté un ion moléculaire à 677 avec des ions de fragmentation à 365,185 et 280 m/z, correspondent à l'acide Ticaffeoylquinique, comme rapporté par Kramberger et al. (2020). C14 (35.292 min) et C17(37.545 min) ont produit le même ion moléculaire à 684 m/z, correspondant à un glycoside dimère d'acide caféique, comme mentionné par He et al. (2011). Il s'agit d'un glycoside dimmer d'acide caféique. Les résultats de l'analyse HPLC utilisant des étalons authentiques ont confirmé la présence de ce composé. En mode négatif, C32 (32.626 min) a été identifié comme un dérivé de l'acide férulique par He et al. (2011) un ion moléculaire à 515 m/z et des fragments à 205,347 et 265 m/z, comme rapporté par He et al. (2011). C34 (35,276 min) montré un ion moléculaire à 339 m/z, correspondant à l'acide p-coumarique glucuronide, tel que rapporté par Al-Rawahi et al. (2013). Tous les acides phénoliques identifiés sont présents dans les trois extraits, à l'exception du composé C34, absent dans l'extrait méthanolique.

Flavonoïdes

C6, C7 et C21 représentent les flavonoïdes identifiés dans nos extraits. C6 (26.147min) avec un ion moléculaire à 274 m/z, a été identifié comme la génistéine selon Man et al. (2022). C7(26.854 min) présentant un ion moléculaire à 290 m/z et des ions de fragmentation à 246 et 179 m/z, a été identifié comme l'épicatéchine, un composé mentionné dans de nombreuses études, comme celle de Taleghani et al. (2021), et Russo et al. (2018). C21 (39,835 min) a produit un ion moléculaire à 595m/z avec des fragmentations à 412, 306, 284 et 181 m/z qui

correspond au kaempférol-3-O-rutnside (Feng et al 2022). Les flavonoïdes identifiés sont détectés en mode positif et présents dans les trois extraits.

Anthocyanes

Seules deux anthocyanes sont identifiées dans nos extraits en mode positif, qui sont C3(21.323min) et C13 (34.206 min). C3, avec un ion moléculaire à 815 m/z et des fragmentations à 419,455 et 181 m/z a été identifié comme le (epi)gcat-cyd-3,5-dihexoside Sentandreu et al. (2013). Ce composé est présent à la fois dans les extraits aqueux et hydroéthanoliques. C13 correspond également au (epi)cat-cyd-3,5-dihexoside (Sentandreu et al 2013) avec un ion moléculaire à 898 m/z et des fragments à 589, 758, 331 et 181m/z. Ce composé est détecté uniquement dans l'extrait méthanolique.

Proanthocyanidine

En mode négatif et dans les extraits aqueux et méthanoliques, C40 (38.580 min) a été identifié comme le trimère A de la procyanidine, basé sur son ion moléculaire 861m/z et à la fragmentation à 225 799 725 m/z comme rapporté dans plusieurs études (Man et al 2022), (Ambigaipalan et al 2016).

Les analyses chromatographiques et la spectroscopie de masse ont révélé que l'acide ellagique der C29 est le composé prédominant dans les trois extraits, constituant 29,024 %, 41,346 % et 33,545 % de la surface dans les extraits aqueux, méthanolique et hydroéthanolique, respectivement. En outre, la punicalagine b s'est révélée être un autre constituant majeur, représentant 16,835 %, 3,823 % et 18,956 % dans les extraits aqueux, méthanolique et hydroéthanolique, respectivement.

Notamment, l'acide ellagique (C1), le dérivé de punicaline (C22) et le dérivé d'acide ellagique (C35) ont également été identifiés comme des composés significatifs dans tous les extraits. Ces résultats sont confirmés par les travaux d'Abid et al. (2017), et Russo et al. (2018), dont l'analyse phytochimique a révélé une teneur élevée en ellagitanins, avec les dérivés de punicalagine étant les principaux composés. Ces composés, qui appartiennent à la classe des tanins hydrolysables, soulignent collectivement la prévalence des tanins hydrolysables en tant que polyphénols les plus abondants dans l'écorce jaune de la grenade.

Tableau III.3 Analyse HPLC-ESI-MSMS des extraits de peau jaune de grenade.

Pic	Temp de rét	[M+H] ⁺	Ms ²	Identification	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait hydroéthanolique
1	1.053	303	165 181 215 247	Acide Ellagique	+	-	+
2	19.994	702	340 362 680	Non identifié	+	-	+
3	21.323	815	419 455 181	(epi)gcat-cyd-3,5-dihexoside	+	-	+
4	22.365	475	181 227 321	Acide Ellagique – deoxyhexoside	+	+	+
5	24.696	365	317 352	Non identifié	+	-	-
6	26.147	274	274	Genistein	+	+	+
7	26.854	290	246 179	Epi catechine	+	+	+
8	28.514	331	299 181	galloyl-hexoside	+	-	-
9	30.323	617	181 383 301	dihydrogalloyl-HHDP-hexo	+	-	-
10	33.596	635	181 365 280	galloyl-HHDP-Hexoside	+	-	+
11	33.668	677	365 185 280	acide Ticafeoylquinique	-	+	-
12	34.077	855	181 331 713 809	Non identifié	-	-	+
13	34.206	898	181 331 758 589	(epi)cat-cyd-3,5-dihexoside	-	+	-
14	35.292	684	363 379 595 639 181	Acide Caffeique glycoside dimmer	+	+	+
15	36.371	1046	181 302 473 869	Non identifié	-	-	+
16	36.495	1085	186 339 399 517 1002	HHDP-gallagyl-hexoside(Punicalagin α)	-	+	-
17	37.545	684	415 353	Acide Caffeique glycoside dimmer	+	+	+
18	38.471	804	413 390 323	Gallotannin	+	+	+
19	39.298	740	381 398	Non identifié	+	+	+
20	39.646	751	407 181 363	Non identifié	-	-	+

21	39.835	595	412 306 284 181	kaempferol-3-O-rutnside	+	+	+
22	40.516	1101	541 1085	Punicalin derivative	+	+	+
23	41.715	1085	510 185	Digalloyl-galloyl-hex Punicalagin B	+	+	+
24	42.976	1023	911 664 688	Non identifié	+	-	+
25	43.424	985	227 489 537	Non identifié	-	-	+
26	43.463	1005	537	Non identifié	-	+	+
27	44.000	1059	607	Non identifié	-	-	+
28	47.970	409	377 279 250 181	Non identifié	+	-	+
Pic	Temp de rét	[M-H]⁻	Ms²	Identification	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait hydroéthanolique
29	1.067	519	378 331 273 211	Derevativr d'acide ellagique	+	+	+
30	15.907	1532	359	Non identifié	+	-	-
31	19.984	785	741 723 249 205	digalloyl -HHDP-hexoside (pedunculagin)	+	-	+
32	32.626	515	205 347 265	Derivative de acide feurique	+	+	+
33	34.705	379	311 232	Non edentifié	+	+	+
34	35.276	339	339	acide p-coumarique glucuronide	+	-	+
35	36.310	393	249 325	digalloyl-HHDP-hexoside (derevative de acide Ellagique)	+	-	+
36	36.975	393	249 218 325	digalloyl-HHDP-hexoside	+	-	-
37	37.543	1493	667	Non identifié	+	+	+
38	37.797	407	339 277 205	Non identifié	+	-	-
39	38.022	1485	217	Non identifié	-	+	-

40	38.580	861	225 799 725	procyanidine trimer A	+	+	-
41	39.276	1381	723	Non identifié	-	-	+
42	40.020	1542	1027	Non identifié	+	+	+
43	48.094	701	305 633 571	Di-HHDP- Galloloylglucose)- pentose	+	+	+
44	49.384			Non identifié	+	-	-
45	49.952			Non identifié	+	-	-
46	50.012	1578	233	Non identifié	-	-	+
48	51.352	1578	233	Non identifié	-	-	+

III.4 Modélisation des complexes

La modélisation de la punicalagine- β , de la punicalagine- α , de la punicaline, de l'acide gallique, de l'acide tannique, ainsi que leurs complexes avec l'eau, l'éthanol et le méthanol a donné les résultats suivants. L'acide gallique forme une liaison hydrogène avec l'eau avec une longueur de contact de 1,98 Å (figure III.3 (A)). La punicalagine- β (figure III.3 (B)) et la punicalagine- α (figure III.3 (C)) interagissent avec l'eau en formant deux liaisons hydrogène, avec des distances intermoléculaires de 2,02 Å, 2,14 Å et 2,03 Å, 2,14 Å, respectivement. La punicaline (figure III.3 (D)), comme l'acide gallique, forme une interaction avec une longueur de contact de 1,99 Å. Enfin, le complexe de l'acide tannique avec l'eau (figure III.3 (E)) présente deux liaisons hydrogène avec des longueurs de 1,99 Å et 2,00 Å.

Dans le complexe de la punicalagine- β avec l'éthanol, ainsi que dans le complexe avec l'eau, la formation de deux liaisons hydrogène est observée, cependant, dans ce cas, la distance intermoléculaire est de 2,09 Å et 2,66 Å. De même, la punicalagine- β interagit avec le méthanol, deux liaisons hydrogène sont formées avec une distance de 2,09 Å et 2,66 Å. Dans le complexe de l'acide tannique avec le méthanol, une liaison hydrogène est formée avec une longueur de contact de 1,99 Å. Une valeur similaire est observée dans le complexe de l'acide tannique avec l'eau.

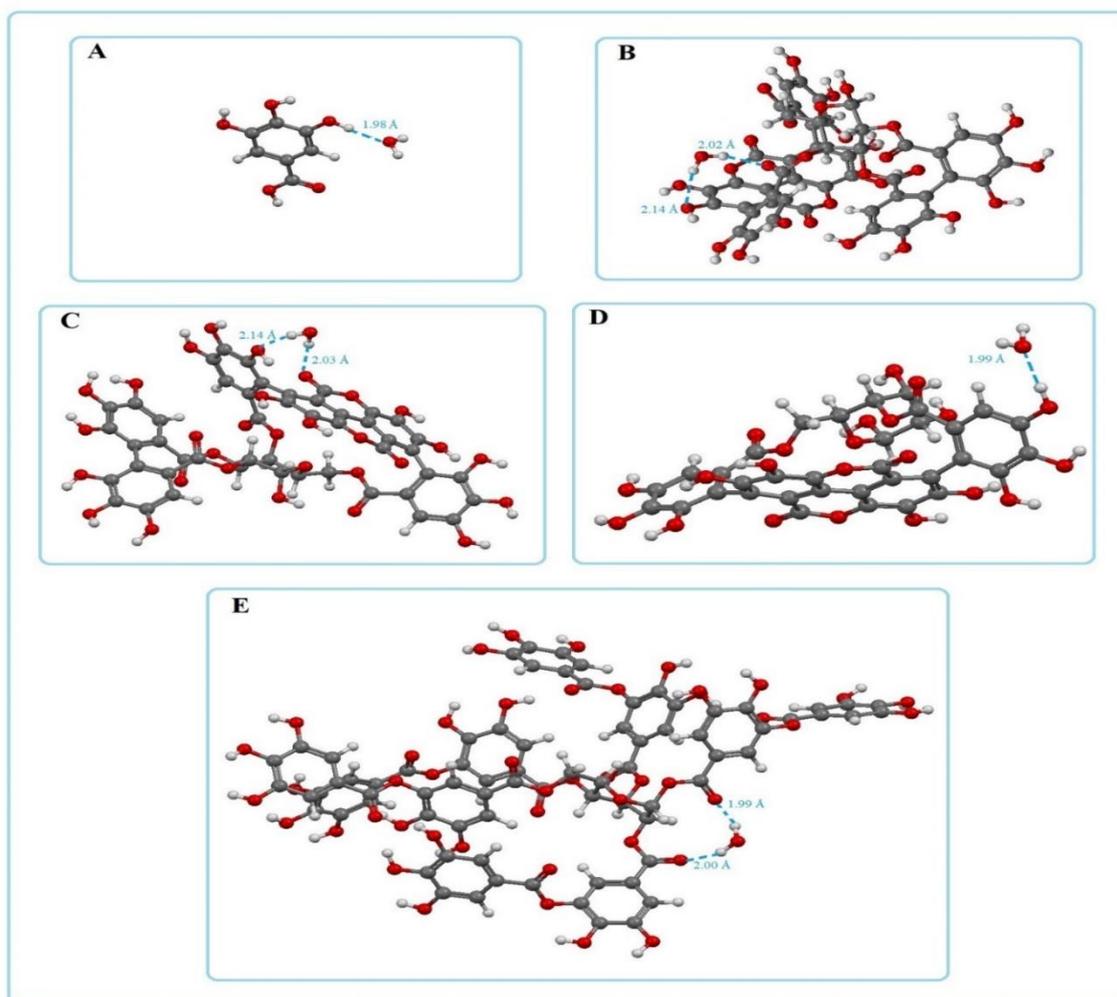


Figure III.3 Structure des complexes de l'acide gallique (A), de la punicalagine- β (B), de la punicalagine- α (C), de la punicaline (D), de l'acide tannique (E) avec l'eau.

A-Analyse des caractéristiques énergétiques des complexes

L'analyse des énergies totales des complexes calculées par la méthode MERA a montré que les complexes les plus stables sont formés entre l'acide gallique, la punicalagine- β , la punicaline, l'acide tannique et l'éthanol, suivis par les complexes avec le méthanol et l'eau (Tableau 4.). Dans le cas de la punicalagine- α , le complexe le plus avantageux est formé avec l'éthanol, suivi de l'eau et du méthanol. Ce comportement de la punicalagine- α dans les solvants ne change pas significativement la situation lorsqu'on considère un mélange de composés. Ainsi, d'un point de vue énergétique, l'éthanol est le meilleur solvant pour l'extraction de l'écorce de grenade jaune, le méthanol est moins efficace, suivi de l'eau, ce qui concorde très bien avec les données expérimentales.

Tableau III.4 Energie totale (E, kJ/mol) des complexes d'acide gallique, de punicalagine- β , de punicalagine- α , de punicaline, d'acide tannique avec l'éthanol, l'eau et le méthanol.

Composé	E, kJ/mol		
	Ethanol	Eau	Methanol
Acide gallique	-423.76	-359.16	-381.04
punicalagin- β	-2049.69	-2011.34	-2021.99
punicalagin- α	-2086.66	-2046.63	-2037.56
Punicalin	-1641.19	-1514.84	-1597.77
Acide tannique	-3364.64	-3257.36	-3276.92

B. Prédiction de l'activité biologique et du métabolisme

Pour les composés étudiés, les probabilités d'activité antioxydante, antibactérienne et de métabolisme ont été calculées. L'activité biologique est exprimée sur une échelle entre 0 et 1, 0 correspond à une probabilité d'activité biologique très faible et 1 à une probabilité élevée. Les résultats des activités biologiques prédites sont présentés dans le tableau 5.

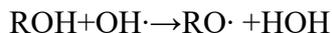
Tableau III.5 Probabilités prédites (P) du métabolisme (M), de l'activité antibactérienne (AB) et de l'activité antioxydante (AOX) pour les composés étudiés.

BA	Solvent	P					
		Acide gallique	Punicalagin- β	Punicalagin- α	Punicalin	Acide tannique	Moyen P
AOX	Ethanol	0.95	0.90	0.87	0	0.50	0.64
	Eau	0.30	0.70	0.49	0.82	0.44	0.55
	Methanol	0.74	0.66	0.77	0.41	0.67	0.65
AB	Ethanol	0.57	0.44	0.03	0.38	0.91	0.47
	Eau	0.22	0.33	0.54	0.21	0.47	0.35
	Methanol	0.53	0.76	0.48	0.67	0.37	0.56
M (2D6)	Ethanol	0.43	0.17	0.73	0.61	0.18	0.42
	Eau	0.066	0.43	0.31	0.88	0.47	0.43
	Methanol	0.000037	0.26	0.66	0.95	0.029	0.38
M (3A4)	Ethanol	0.75	0.70	0.75	0.56	0.98	0.75
	Eau	0.96	0.78	0.89	0.69	0.98	0.86
	Méthanol	0.87	0.63	0.90	0.63	0.97	0.8

L'analyse des résultats a montré que certains des composés étudiés se caractérisent par une probabilité élevée (0,7-1) ou modérée (0,4-0,6) d'activité biologique, tandis que d'autres composés ont une probabilité faible (0-0,3). Étant donné que l'analyse de l'activité antioxydante est effectuée à partir de solutions et que les structures forment de fortes liaisons hydrogène avec les solvants, les probabilités d'activité biologique des complexes avec l'eau, l'éthanol et le méthanol ont été calculées. La probabilité d'activité biologique des complexes dépend du solvant. Les complexes d'acide gallique avec l'éthanol et le méthanol ont une forte probabilité d'activité antioxydante de 0,95 et 0,74, et le complexe avec l'eau a une faible probabilité de 0,30. Les complexes de punicalagine- β et de punicalagine- α avec l'éthanol sont caractérisés par la valeur la plus élevée de l'activité biologique (0,90 et 0,87). Le complexe de punicalagine- β avec l'eau (0,70) et le complexe de punicalagine- α avec le méthanol (0,77) ont également une forte probabilité d'activité antioxydante. Le complexe de punicaline avec l'eau est caractérisé par une activité biologique élevée (0,82), tandis que le complexe avec le méthanol présente une probabilité modérée de 0,41, et le complexe avec l'éthanol une probabilité de 0. L'acide tannique présente la meilleure activité antioxydante en combinaison avec le méthanol (0,67), une valeur de probabilité plus faible est observée en combinaison avec l'éthanol (0,50), puis avec l'eau (0,44). La détermination de l'activité biologique expérimentale étant réalisée pour un extrait contenant un mélange de composés, nous avons déterminé la valeur moyenne de la probabilité d'activité biologique pour un mélange de complexes. Il a été établi que les mélanges de complexes avec l'éthanol et le méthanol sont caractérisés par une probabilité presque égale (0,64 et 0,65) d'activité biologique, une valeur plus faible d'activité antioxydante (0,55) est observée pour les complexes avec l'eau.

L'analyse des fragments pharmacophores, ballasts et antipharmacophores des complexes a montré que dans le cas des plus actifs d'entre eux (par exemple, « gallic acid - EtOH », « punicalagin- β -EtOH », « punicalagin- α -EtOH », « punicalagin-H₂O »), au moins 3 groupes OH (y compris le groupe OH du fragment COOH) des complexes, ou des atomes d'anneaux aromatiques associés à des groupes OH, ont un effet pharmacophore sur l'AOX, tandis que d'autres complexes moins actifs ont soit moins de groupes OH dans la zone pharmacophore, soit ces groupes ont un effet pharmacophore moins prononcé, soit les groupes OH constituent principalement la partie lestée du phytocomposant. Il est bien connu que les groupes OH, par exemple les groupes OH de la vitamine E décrits dans (Lü, 2010), jouent un

rôle très important dans l'activité antioxydante ; ils peuvent interagir avec les radicaux libres $\text{OH}\cdot$ de la manière suivante :



Les groupes OH attachés à un anneau aromatique sont particulièrement actifs car le système radicalaire conjugué est très stable en raison de la distribution de l'électron libre dans l'ensemble du système aromatique.

En outre, les complexes les plus actifs se caractérisent par l'interaction du solvant avec les groupes O ou OH du pharmacophore, avec formation d'une liaison hydrogène et stabilisation possible du radical $\text{RO}\cdot$ (Figure III.4).

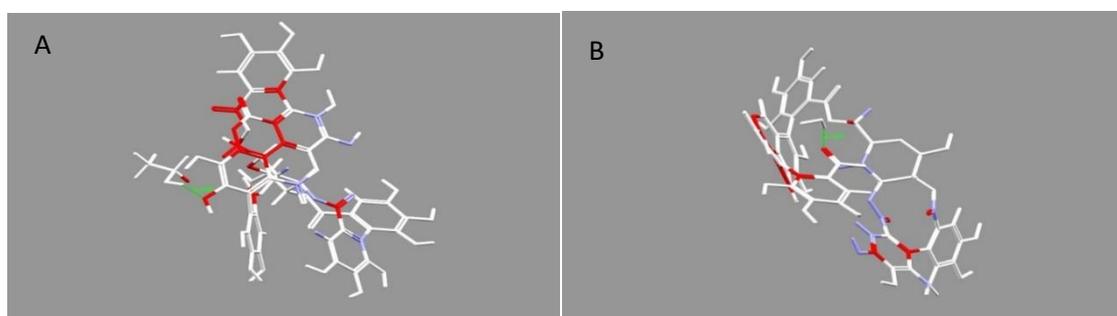


Figure III.4 a) punicalagine- α complexée à EtOH (*le pharmacophore O du groupe OH interagit avec le H de OH du solvant*), b) punicalagine- α complexée à H_2O (*le O du groupe CO interagit avec le solvant*). (Couleur rouge - fragments pharmacophores, blanc - partie lestée, bleu - fragments antipharmacophores, la ligne pointillée verte représente la liaison hydrogène avec le solvant).

Dans le cas des complexes moins actifs, le solvant forme des liaisons hydrogène avec l'oxygène du groupe CO, qui n'a pas d'hydrogène pour interagir avec le radical $\text{OH}\cdot$ (Figure III.4 -b).

L'analyse de l'activité antibactérienne a montré que le complexe de l'acide tannique avec l'éthanol a une valeur de probabilité élevée (0,91), tandis que les complexes avec l'eau et le méthanol sont caractérisés par une probabilité modérée de 0,47 et 0,37, respectivement. L'acide gallique est plus actif dans le complexe avec l'éthanol (0,57), moins actif dans le complexe avec le méthanol (0,53) et l'eau (0,22). Les complexes de punicalagine- β et de punicaline avec le méthanol ont des probabilités élevées d'activité antibactérienne (0,76 et 0,67), les complexes avec l'éthanol sont caractérisés par une activité modérée (0,44 et 0,38), les complexes avec l'eau sont caractérisés par une faible probabilité (0,33 et 0,21). Pour les complexes avec l'eau,

la probabilité d'action antibactérienne la plus élevée est observée pour la punicalagine- α (0,54). Le complexe de punicalagine- α avec le méthanol a une probabilité de 0,48, et le complexe avec l'éthanol a une faible valeur d'activité biologique de 0,03. Une analyse des probabilités moyennes pour un mélange de composés avec des solvants a montré que les complexes avec l'eau sont caractérisés par une probabilité de (0,35), tandis que les probabilités des complexes avec l'éthanol et le méthanol sont de 0,47 et 0,56.

Les caractéristiques des complexes antibactériens hautement actifs présentés dans le tableau 5 sont les parties pharmacophores situés sur les parties hydroxyaromatiques périphériques des phytocomposants, les fragments de monosaccharides situés au centre des structures. Les fragments de l'anneau dihydrobenzopyrane, les fragments d'ester et les groupes carboxyles sont classés comme parties antipharmacophores des molécules.

L'étude du métabolisme a montré que les complexes avec le méthanol, l'éthanol et l'eau sont caractérisés par une probabilité modérée de métabolisme sur l'isoforme 2D6 0,38, 0,42, 0,43, respectivement. Une situation différente est observée pour l'isoforme 3A4 : les complexes sont caractérisés par une probabilité moyenne élevée de métabolisme, alors qu'une valeur plus élevée est observée pour les complexes aqueux (0,86), une valeur de probabilité plus faible est observée pour les complexes avec le méthanol (0,8) et l'éthanol. (0,75).

L'analyse des structures caractérisées par un haut niveau d'activité sur l'isoforme 3A4 a montré que les pharmacophores comprennent des fragments d'esters, des fragments non substitués de systèmes aromatiques, des fragments d'alkyles et des groupes hydroxyles. Les résultats sont cohérents avec les données expérimentales (Dresser, 2000). On sait que ces fragments sont principalement soumis à des modifications au cours du métabolisme de l'isoforme 3A4.

Ainsi, il a été constaté que les mélanges de complexes d'acide gallique, de punicalagine- β , de punicalagine- α , de punicaline, d'acide tannique avec de l'éthanol, du méthanol, de l'eau ont dans tous les cas des valeurs élevées ou modérées d'activité antioxydante, antibactérienne et de métabolisme. Chaque complexe est caractérisé par son activité biologique. L'activité de l'extrait dépendra des molécules qu'il contient, ainsi que de leur rapport. Parallèlement, la probabilité moyenne d'activité antioxydante et antibactérienne des complexes avec l'éthanol et le méthanol est supérieure à celle des complexes avec l'eau. Cependant, la toxicité connue du méthanol et de l'éthanol limite l'utilisation des extraits obtenus. À cet égard, on peut supposer

que l'eau est un solvant efficace pour l'écorce de grenade jaune et que ses extraits aqueux sont des médicaments antioxydants et antibactériens prometteurs.

III.5 Activité antioxydante

Les activités antioxydantes des extraits de plantes ne peuvent pas être évaluées à l'aide d'une seule méthode (Gioti et al. 2009). Il est donc important d'effectuer plusieurs tests antioxydants plutôt qu'un seul afin d'obtenir une meilleure estimation de la capacité antioxydante, car il est connu que le mécanisme antioxydant dans les matrices biologiques est assez complexe (Antolovich et al. 2002).

Dans la présente étude, six tests in vitro (DPPH, ABTS+, GOR, CUPRAC, FRAP et phénanthroline) ont été utilisés comme méthodes complémentaires pour évaluer l'activité antioxydante potentielle de l'écorce jaune de grenade, sur la base des mécanismes de piégeage des radicaux libres et d'oxydo-réduction. Les résultats de l'activité antioxydante sont présentés dans le tableau III.6 et exprimés en termes d'IC₅₀ et de A_{0,5}, où les IC₅₀ et A_{0,5} les plus faibles reflètent un pouvoir antioxydant plus élevé (Selcuk et Erkan 2015).

Tableau III.6 Activité antioxydante de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de l'écorce jaune de grenade par DPPH, ABTS+, essai de piégeage de GOR, CUPRAC, pouvoir réducteur et essai de phénanthroline.

	DPPH IC ₅₀ µg/mL	ABTS IC ₅₀ µg/mL	GOR IC ₅₀ µg/mL	CUPRAC A _{0.5} µg/mL	pouvoir réducteur A _{0.5} µg/mL	phenanthroline A _{0.5} µg/ml
Aqueux	12.42±0.52 ^{b, c}	7.05±0.12 ^b	6.03±1.12 ^b	7.40±0.79 ^c	16.00±4.02 ^d	10.23±1.95 ^b
Méthanolique	16.30±0.22 ^b	8.37±0.43 ^a	5,83±0,12 ^b	10.33±0.17 ^{a, b}	34.22±1.74 ^c	24.10±1.44 ^a
Hydro- éthanolique	9.90±1.08 ^{c, d}	8.42±0.06 ^a	7.69±0.25 ^a	11.78±0.49 ^a	48.88±1.31 ^b	24.29±2.30 ^a
BHT	22.32±1.19 ^a	1.59±0.03 ^c	3.32±0,18 ^c	9.62±0.87 ^b	152.24±2.43 ^a	2.24±0.17 ^c
BHA	5.73±0.41 ^d	1.03±0.00 ^c	5,38 ±0,06 ^b	3.64±0.19 ^d	8.41±0.67 ^e	0.93±0.07 ^c
A-Ascorbique	NT	NT	NT	NT	6.77±1.15 ^e	NT
A-Tannique	NT	NT	NT	NT	5.39±0.91 ^e	NT
α-Tocopherol	NT	NT	NT	NT	34.93±2.38 ^c	NT

Les valeurs IC₅₀ et A_{0,5} ont été calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne±SD (n=3). Les valeurs avec des exposants différents (a, b, c, d ou e) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes (p < 0,05). NT : non testé.

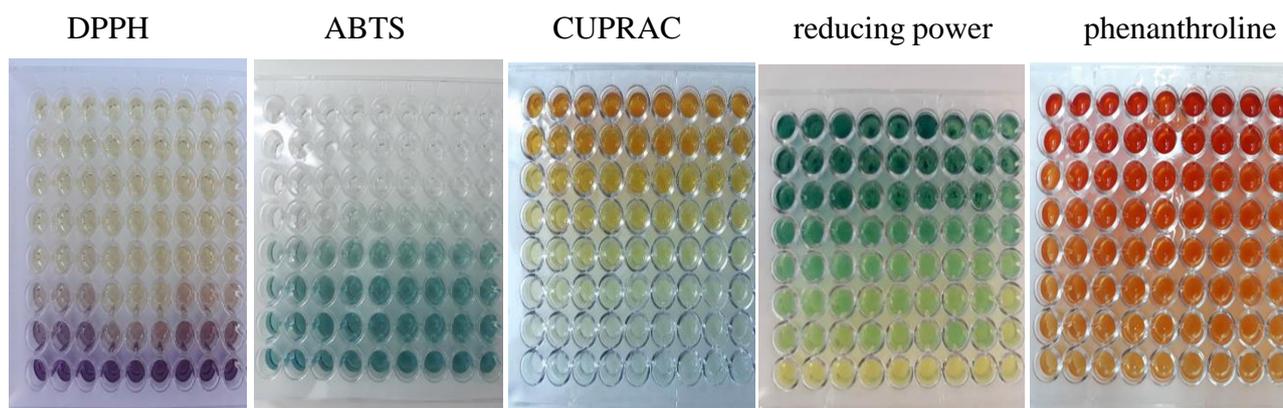


Figure III.5 Résultats de quelques activités antioxydantes sur microplaque.

Selon les résultats DPPH, l'extrait hydroéthanolique présente l'activité la plus élevée ($IC_{50} = 9,90 \pm 1,08 \mu\text{g/mL}$), cette valeur est proche de celle du BHA ($IC_{50} = 5,73 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$) contrairement au BHT ($22,32 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$) qui sont utilisés comme normes. Viennent ensuite les extraits aqueux et méthanoliques ($IC_{50} = 12,42 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ et $IC_{50} = 16,30 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$ respectivement). Pour l'essai de piégeage de l'ABTS, l'extrait aqueux a donné la meilleure activité ($IC_{50} = 7,05 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) alors que les extraits méthanolique et hydroéthanolique donnent approximativement des valeurs égales ($IC_{50} = 8,37 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$ et $IC_{50} = 8,42 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ respectivement). Chaque fois que le BHT et le BHA représentent une forte activité ($IC_{50} = 1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ et $IC_{50} = 1,03 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ respectivement) par rapport à nos extraits. Cette fois, pour l'activité de piégeage du GOR, l'extrait méthanolique indique la meilleure activité ($IC_{50} = 5,83 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) très proche du BHA, de l'extrait aqueux et hydroéthanolique ($IC_{50} = 5,38 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 6,03 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 7,69 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ respectivement) et plus faible que le BHT ($IC_{50} = 3,32 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$).

Dans l'essai CUPRAC, l'extrait aqueux a également indiqué une activité plus élevée ($A_{0,5} = 7,40 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) que les extraits méthanolique, hydroéthanolique et le BHT ($A_{0,5} = 10,33 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5} = 11,78 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ et $A_{0,5} = 9,62 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ respectivement) à chaque fois que ces résultats sont inférieurs à ceux du BHA qui a donné ($A_{0,5} = 3,64 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$).

Les résultats du dosage du pouvoir réducteur montrent que l'extrait aqueux est le plus actif ($A_{0,5} = 16,00 \pm 4,02 \mu\text{g/mL}$) suivi de l'extrait méthanolique ($A_{0,5} = 34,22 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$) et de l'extrait hydroéthanolique ($A_{0,5} = 48,88 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$). Cependant, l'acide tannique, l'acide ascorbique et le BHA ont montré la meilleure activité ($A_{0,5} = 5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5} = 8,41 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$ respectivement) par rapport à nos extraits, tandis

que l' α -Tocophérol et le BHT donnent ($A_{0,5}= 34.93\pm 2.38 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5}= 152.24\pm 2.43 \mu\text{g/mL}$ respectivement).

Pour le test de la phénanthroline, l'extrait aqueux a également montré l'activité antioxydante la plus élevée ($A_{0,5}=10.23\pm 1.95 \mu\text{g/mL}$) suivi par les extraits méthanolique et hydroéthanolique ($A_{0,5}=24.10\pm 1.44 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5}=24.29\pm 2.30 \mu\text{g/mL}$ respectivement). En revanche, en comparaison avec les standards, notre extrait a exprimé une activité antioxydante plus faible que celle du BHT et du BHA ($A_{0,5}= 2.24\pm 0.17 \mu\text{g/mL}$, $A_{0,5}=0.93\pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ respectivement).

Les résultats du test DPPH représentés dans (Hadjadj et al. 2018) montrent que l'extrait hydroéthanolique a donné une activité antioxydante relativement plus élevée $4,64\pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ par rapport à nos résultats. La même étude montre que le résultat ABTS $3,63\pm 0,07$ est plus élevé que le nôtre. Au contraire, l'extrait éthanolique de peau de grenade étudié dans (Pal et al. 2017), représente une activité antioxydante relativement plus faible dans le test DPPH ($IC_{50} = 16,78 \mu\text{g/ml}$) par rapport à nos trois extraits, alors que pour l'activité de piégeage ABTS de la même étude, l'extrait a montré une activité antioxydante hebdomadaire par ($IC_{50}=587,36 \mu\text{g/mL}$).

Les résultats présentés par (Zahin, Aqil, et Ahmad 2010) indiquent que la fraction de méthanol est la plus puissante, suivie par les fractions d'éthanol, d'acétone et d'acétate d'éthyle pour la FRAP et le CUPRAC, alors que dans notre cas, l'extrait aqueux est l'antioxydant le plus puissant. (Y. Li et al. 2006) ont constaté que l'extrait de peau obtenu par l'utilisation d'un mélange composé de méthanol, d'éthanol, d'acétone et d'eau présentait une valeur FRAP significativement plus élevée que ceux obtenus à l'aide de solvants individuels, à savoir le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. Le résultat du test d'activité phénanthroline réalisé par Chaabna, N., en 2023 sur l'extrait d'éther diéthylique de peau de grenade a montré une activité supérieure à celle de nos extraits ($A_{0,5}=1,04 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$). En ce qui concerne le dosage de la GOR, aucune étude n'a été réalisée.

De nombreuses études ont confirmé qu'un contenu phénolique plus élevé dans les extraits correspond à une plus grande activité antioxydante (Gil et al. 2000) ; (X. Li et al. 2015) ; (Singh et al. 2014), (Masci et al. 2016). Nos résultats n'ont pas confirmé cela, où nous avons trouvé que la valeur la plus élevée de TPC a été donnée par l'extrait méthanolique, tandis que l'extrait aqueux était l'antioxydant le plus puissant dans quatre tests de 6. Selon les résultats et la faible différence entre les valeurs de TPC de nos extraits, nous pouvons considérer qu'ils

sont égaux. Par conséquent, la différence dans les résultats de l'activité antioxydante peut être due à la nature des composés chimiques présents dans chaque extrait brut et à leur spécificité par rapport aux méthodes employées.

Les groupes fonctionnels des polyphénols en particulier des acides phénoliques et des flavonoïdes sont les responsables de son effets antioxydants. Sihag, S et al (2022). Dans les résultats de l'étude in silico, au moins 3 groupements OH (y compris le groupement OH du fragment COOH) des extraits, ou des atomes de noyaux aromatiques associés à des groupements OH, ont un effet pharmacophorique sur l'activité antioxydante, c'est le cas des molécules identifiées riches en groupement OH qui appartiennent aux tannins hydrolysables. En conclusion et selon les résultats de l'étude comparative et de l'étude de laboratoire, l'activité antioxydante intéressante est probablement due à la quantité élevée de phénoliques et de flavonoïdes et surtout de tannins hydrolysables (punicalagine a, punicalagine b et punicalain).

III.6 Activité anti-inflammatoire des extraits in vitro

L'activité anti-inflammatoire des extraits in vitro de la peau jaune de grenade a été évalué par la méthode de dénaturation des protéines (BSA) dont les résultats sont exprimés dans la Figure III.6.

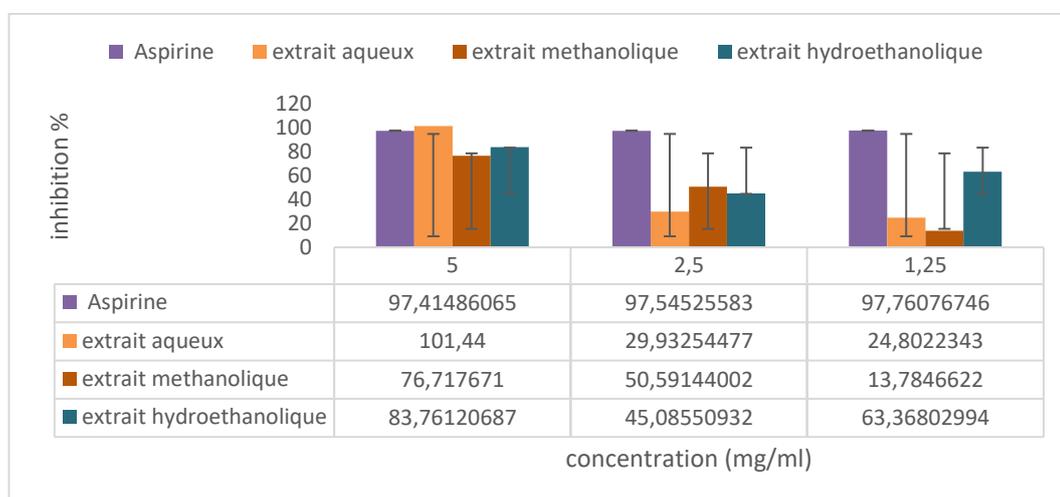


Figure III.6 Activité anti-inflammatoire des extraits de peau jaune de grenade in vitro.

La dénaturation des protéines est un processus au cours duquel les protéines changent de structure en perdant leur structure secondaire et tertiaire en raison de l'altération des liaisons hydrogène, hydrophobes, électrostatiques et disulfures. Par conséquent, la majorité des protéines perdent leurs activités biologiques et conduisent à la production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïdale (Banerjee et al 2014, Aichour et

al 2018). Ainsi, les produits naturels qui pourraient inhiber la dénaturation des protéines seraient un candidat possible pour le développement de médicaments anti-inflammatoires.

Dans cette étude, les trois extraits ont été comparés à un médicament standard, l'Aspirine, dont le pourcentage d'inhibition est d'environ 97 % aux trois concentrations, à 1,25 hydro- l'extrait éthanolique donne le meilleur pourcentage d'inhibition (63,36 %) suivi de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique (24,80 % et 13,78 % respectivement) ; à 2,5 mg/ml, l'extrait méthanolique et l'extrait hydroéthanolique donnent respectivement 50,59 % et 45,08 %, ce qui est plus inhibiteur que l'extrait aqueux qui donne 29,93 %. À la concentration de 5mg/ml, les trois extraits donnent leur meilleur pourcentage d'inhibition, l'extrait aqueux 101,44%, l'extrait hydro-éthanolique 83,76% et l'extrait méthanolique 76,71%.

Nos extraits sont plus performants que ceux de Maqsood Rashid et al. En 2018 où ils ont testé des extraits de fleurs de *Punica granatum* L., le pourcentage maximum d'inhibition de 71,24% de l'extrait méthanolique à une concentration de 500 g, suivi par l'extrait aqueux de 68,49% à la même concentration où l'Aspirine a montré une inhibition maximale de 75,66% à une concentration de 100 g/ml par rapport au contrôle. Cette grande différence dans les résultats nous permet de conclure que l'écorce jaune de grenade est plus efficace que la fleur dans son activité anti-inflammatoire. De même, l'extrait méthanolique donne le meilleur pourcentage d'inhibition par rapport à l'extrait aqueux dans l'activité inflammatoire in vivo de l'écorce de *Punica granatum* qui a été évaluée par (Douaouri et al 2018). En utilisant des doses de 250 et 500 mg/kg d'extraits méthanoliques et aqueux et administrés par voie orale dans l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les souris, contre le diclofénac (50 mg/kg) est un médicament standard aux deux concentrations, l'extrait méthanolique a montré la meilleure activité où à 500 mg/kg le pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte de l'extrait méthanolique était égal à celui du diclofénac.

C'est largement connu que L'écorce de grenade est extrêmement riche en tanins hydrolysables, en particulier en punicalagines, qui sont reconnues par leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Mastrogiovanni et al., 2019). Cette information a été confirmée par Du et al. (2019), dont les résultats indiquent que l'écorce de grenade possède un puissant effet anti-inflammatoire, la punicalagine étant le principal composant efficace. Dans la présente étude, et selon la quantification et l'identification des constituants de la peau jaune de grenade, la classe des tanins hydrolysables est parmi le polyphénol le plus abondant dans l'écorce jaune de grenade, y compris les punicalagines a et b, ces résultats montrent que les

tanins hydrolysables étudiés font partie des composés responsables de l'activité anti-inflammatoire.

III.7 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a un rapport avec la taille de la zone d'inhibition ou il est proportionnel à la sensibilité de l'organisme à l'antibiotique testé. Cela signifie que plus la zone d'inhibition est grande, plus la bactérie est sensible à un extrait particulier et la bactérie peut être classée comme résistante ou sensible à un extrait particulier.

Le tableau III.7 présente les résultats des tests de différentes concentrations (1, 2 et 4 mg/ml) d'extraits aqueux, méthanoliques et hydro-éthanoliques contre diverses souches bactériennes, notamment *Escherichia coli* ATCC 7839, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pour toutes les concentrations et tous les extraits, aucune inhibition n'a été observée pour *Escherichia coli* ATCC 7839. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P montre une inhibition à différentes concentrations et extraits avec des zones d'inhibition allant de 11,5 mm à 24 mm.

Enterococcus faecalis ATCC 19433 ne présente aucune inhibition aux concentrations les plus faibles pour tous les extraits. Cependant, à des concentrations plus élevées, 2 mg/ml pour l'extrait méthanolique et 4 mg/ml pour l'extrait hydro-éthanolique. En outre, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ne présente pas d'inhibition aux concentrations les plus faibles pour tous les extraits. Cependant, à des concentrations plus élevées, une inhibition est observée pour l'extrait hydro-éthanolique à 8,5 mm et à une concentration de 4 mg/ml.

Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que les extraits aqueux, méthanolique et hydro-éthanolique ont une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, tandis que les extraits méthanolique et hydro-éthanolique ont une activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis*. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, seul l'extrait hydro-éthanolique présente une activité. *Escherichia coli* est résistant à tous les extraits et concentrations testés.

La grenade a un large spectre d'effets antimicrobiens, qui a un effet inhibiteur apparent contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. De nombreuses études ont montré que l'activité antimicrobienne de l'extrait de peau de grenade était plus puissante que celle des autres parties, et qu'elle avait un effet antibactérien sur différents contaminants alimentaires/bactéries pathogènes, notamment *Escherichia coli*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium italicum*, et *Bacillus subtilis* Chen, J. et al (2020)

Hazem et al (2021) ont évalué l'activité antibactérienne de l'extrait d'exocarpe de cuir contre *Escherichia coli* et d'autres bactéries pathogènes/contaminantes alimentaires. Leurs résultats confirment les nôtres, où seule la concentration la plus élevée de l'extrait (10 mg/mL) a montré un effet bactéricide significatif contre *E. coli* ; les essais antimicrobiens ont montré, dans certains cas, un effet antimicrobien prometteur par rapport aux médicaments synthétiques.

Elisabete M.C. Alexandre a testé les propriétés antimicrobiennes des extraits contre plusieurs pathogènes alimentaires tels que *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Le dépistage initial de l'activité antimicrobienne a montré que la majorité des souches pathogènes semblaient sensibles aux extraits. *P. aeruginosa* a montré la zone d'inhibition la plus élevée et a été plus sensible aux extraits de pelure que la plupart des autres micro-organismes (Alexandre et al 2019).

Tableau III.7 Activité antibactérienne de l'extrait aqueux, méthanolique et hydroéthanolique de l'écorce jaune de grenade (n inh=non inhibé, n det= non détecté)

	Concentration	<i>Escherichia coli</i> ATCC 7839	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Extrait Aqueux	1 mg/ml	N inh	11.5mm	N inh	N inh
	2 mg/ml	N inh	15mm	N inh	N inh
	4 mg/ml	N inh	19.5mm	N inh	N inh
Extrait Méthanolique	1 mg/ml	N inh	17.5mm	N inh	N inh
	2 mg/ml	N inh	19mm	11mm	N inh
	4 mg/ml	N inh	24mm	14mm	N inh
Extrait Hydroéthanolique	1 mg/ml	N inh	12mm	N inh	N inh
	2 mg/ml	N inh	15.5mm	N inh	N inh
	4 mg/ml	N inh	18.5mm	11mm	8,5mm

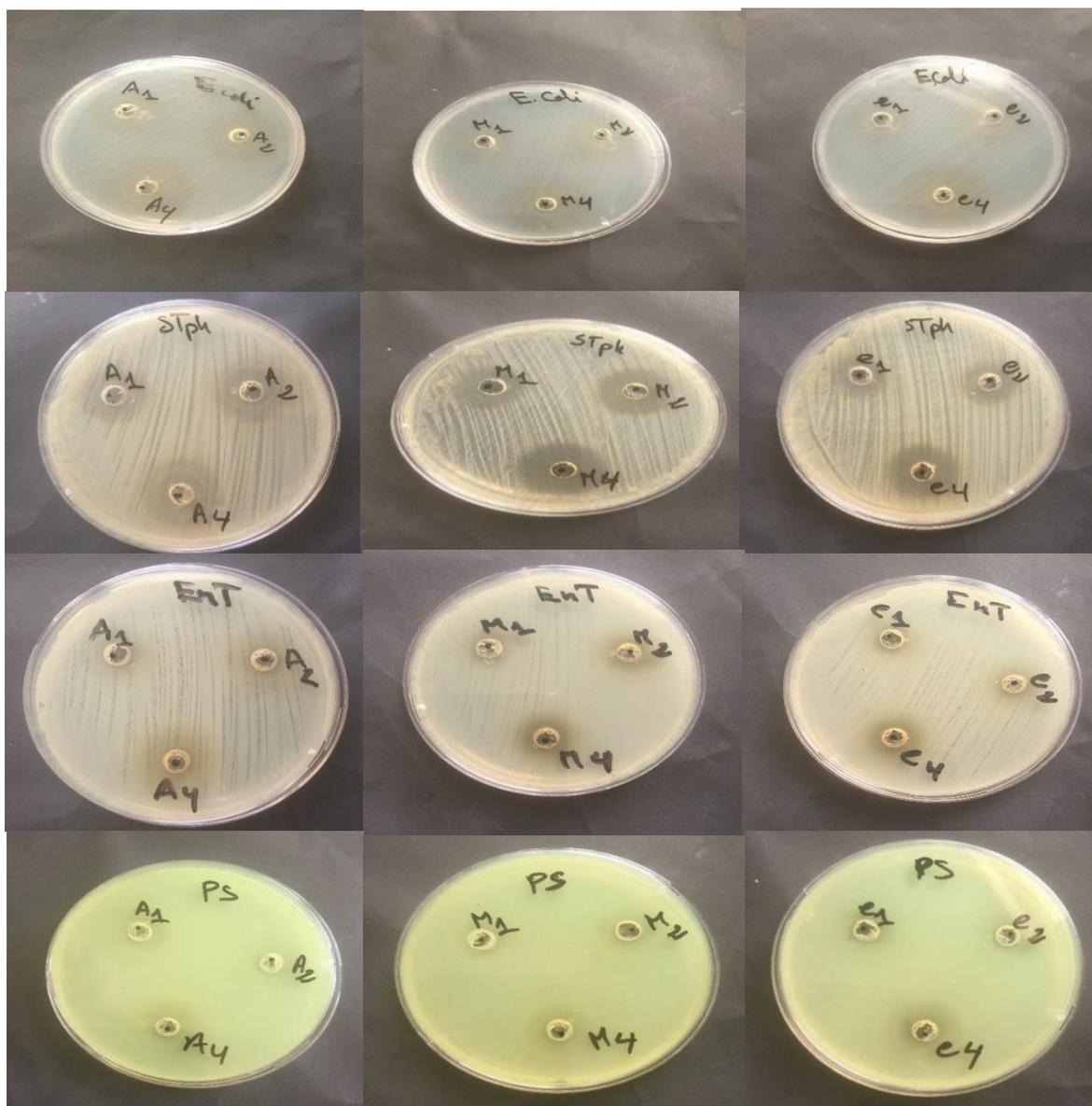


Figure III.7 photos représentent la zone d'inhibition des extraits (A= aqueux, M= méthanolique, E= hydroethanolique) contre les bacteries utilisées. (E.Coli = *Esherishia coli* ,Stph= *Staphylococcus aureus* ,Ent= *Enterococcus feacalis* , PS= *Pseudomonas aeruginosa*).

➤ **Detrmination de la concentration minimale inhibitrice**

D'après les résultats de l'activité antibactérienne, les trois extraits ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, de sorte que la CMI ne peut être déterminée que pour cette bactérie.

D'apres l'observation visuel des microplaques, tous les puits montre une turbidité se qui signifie l'absence de l'activité antibacteriene, en conclusion ,1 mg/ml est la concentration

minimale inhibitrice de nos trois extraits contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. comme montre la figure III.8 que represente les photos desresultats du test MIC.

Nos résultats sont prometteurs si on les compare à ceux de (Yaser Nozohour 2018), où la CMI de l'écorce de grenade contre *Staphylococcus aureus* s'est avérée être de $25,0 \pm 0,0$ mg/ml. Aussi Nos résultats sont également plus forts que ceux de (Naziri, Z et al 2012) qui montrent une CMI de $15,6 \pm 0,0$ pour l'écorce de grenade acide et de $7,8 \pm 0,0$ pour l'écorce de grenade douce contre *Staphylococcus aureus*. Ces résultats peuvent s'expliquer par la richesse et l'appétence de la peau jaune de la grenade, ou par la nécessité de modifier la gamme de concentration de notre étude et d'utiliser une concentration plus élevée (superieur a 1 mg /mL).



Figure III.8 : une photo des microplaques represente le resultats de le CMI.

III.8 Résultats de la caractérisation des nanoparticules chargées des extraits de peau de grenade

III.8.1 Caracterisation des nanoparticules vides et chargées d'extraits

La méthode de nanoprécipitation a été choisie pour réaliser une encapsulation des extraits de peau de grenade à l'échelle nanométrique. Cette approche permet d'obtenir des nanoparticules avec des caractéristiques spécifiques. Les figures suivantes présentent les suspensions de particules obtenues après la phase de nanoprécipitation, ainsi que les poudres résultant de la lyophilisation.



Figure III.9 Suspensions de particules obtenues après nanoprecipitation de gélatine (G) et des extraits méthanolique (M), aqueux (A) et hydroéthanolique (E)



Figure III.10 Poudres obtenues après la lyophilisation des suspensions de de gélatine (G) et des extraits méthanolique (M), aqueux (A) et hydroéthanolique (E).

La variation de couleur entre la poudre de nanoparticules de gélatine et les autres poudres des extraits indique l'incorporation correcte des extraits dans la gélatine, aussi est un indicateur clé qui peut fournir des informations sur la nature des composés encapsulés, leur stabilité, leur qualité. En général, la couleur du produit final encapsulé peut être influencée par l'interaction entre le principe actif et la matrice d'encapsulation, ainsi que par l'acidité ou l'alcalinité du milieu. Dans le cadre de notre étude, Les extraits de peau de grenade encapsulés présente un couleur jaune marronné en raison des anthocyanines qu'ils contiennent. Cette coloration varie en fonction du type extrait (aqueux, hydroéthanolique ou méthanoliques), ce qui cela est lié à leur composition chimique, leur structure, ainsi que sur leur état physique ou leur stabilité.

Dans la section suivante, nous allons examiner l'efficacité de l'encapsulation des extraits par la gélatine et procéder à une analyse de la taille des particules obtenue. Les résultats suivants va nous permet de vérifier si la méthode de nanopréciipitation a bien rempli ses objectifs en matière de taille et de distribution des nanoparticules.

A. Potetiel zeta

Les résultats de potentiel zêta obtenu sont résumés dans le tableau suivant, et permettent de discuter la charge superficielle des particules ainsi que de leur stabilité colloïdale dans différents milieux et de leur stabilité colloïdale. Dans le milieu éthanolique, Le potentiel zêta des particules des extraits aqueux et hydro éthanolique indique une charge légèrement positive (3.8 mV et 3.1 mV), ce qui suggère une répulsion modérée entre les particules. Bien que cette répulsion empêche une agrégation significative, elle ne garantit pas une stabilité colloïdale optimale. Par contre, Le potentiel zêta des particules de l'extrait méthanolique et des particules de gélatine, avec des valeurs de 6.1 mV et 7.7 mV respectivement, est légèrement plus élevé, indiquant que les particules dans ce solvant possèdent une charge nette positive plus marquée, favorisant ainsi une meilleure répulsion entre les particules.

En revanche, dans le milieu aqueux, les particules des extraits aqueux et hydroéthanolique présentent un potentiel zêta négative, avec des valeurs absolues de -17,4 mV et de -7.3mV respectivement. Ces valeurs indiquent une forte répulsion électrostatique, ce qui favorise une bonne stabilité colloïdale surtout pour les particules de l'extrait aqueux. Cette répulsion permet de maintenir les particules bien dispersées et d'éviter leur agrégation, rendant ainsi le milieu aqueux plus stable pour ces particules. Par contre, les valeurs de potentiel zêta des particules de l'extrait méthanolique et la gélatine ont diminué par rapport au milieu éthanolique, avec des valeurs de 0.7 mV et 0.6 mV respectivement. Ce qui suggère, que ces particules sont plus susceptibles de s'agglomérer facilement, en raison de la faible électrostatique entre elles. Sur la base de ces résultats, on peut conclure que les particules ont tendance à s'agglomérer et manquent de stabilité en suspension. Pour assurer leur stabilité colloïdale, Le cas échéant, il convient d'utiliser l'eau comme le solvant pour les particules d'extrait aqueux et hydroéthanolique, car elle favorise une meilleure dispersion et une stabilité accrue dans ces systèmes.

Tableau III.8 Les résultats de potentiel zêta des nanoparticules obtenues

Solvant	Potentiel zeta mV			
	Nps de l'extrait Aqueux	Nps de l'extrait Méthanolique	Nps de l'extrait Hydroéthanolique	Nps de gélatine
Éthanol	3.8	6.1	3.1	7.7
Eau	-17.4	0.7	-7.3	0.6

B. Analyse granulométrique par laser

La figure III.11 présente la distribution de la taille des particules pondérée en fonction de la fréquence %. Cette analyse permet de fournir des informations utiles sur l'existence de particules de grande taille ou d'agrégats au sein du système de nanoparticules.

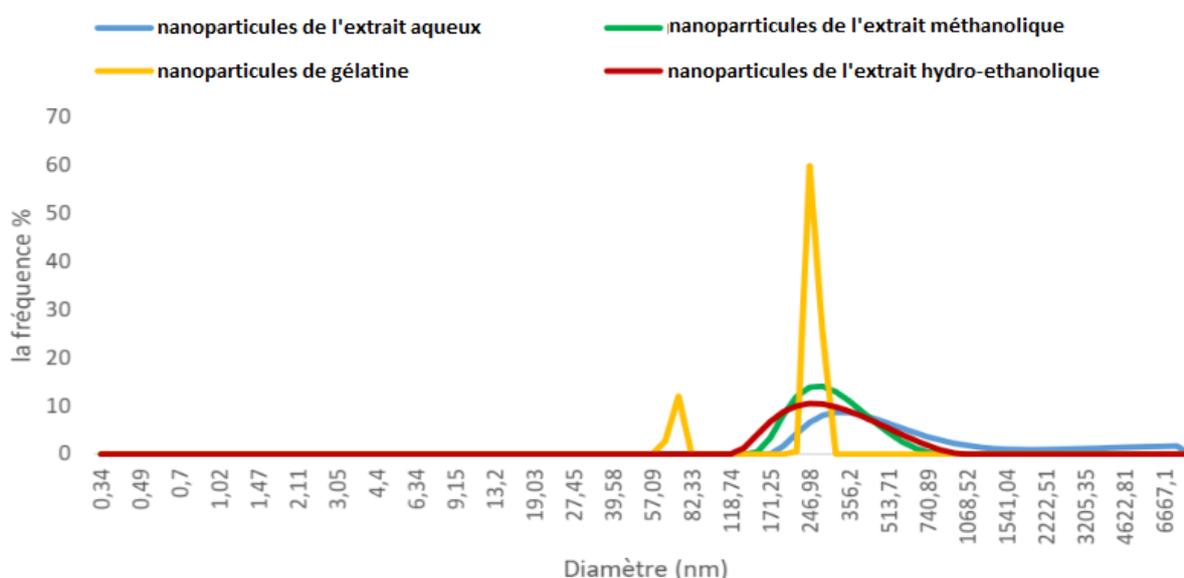


Figure III.11 Analyse granulométrique des suspensions des nanoparticules de gélatine et des trois extraits.

Comme le montre cette figure III.11, les Nanoparticules de gélatine vides présentent deux distributions de fréquence distinctes, ce qui signifie la présence de deux groupes distincts de particules dans l'échantillon, chacun avec une taille caractéristique différente. Le premier pic correspond à des particules fines (67.1nm) tandis que l'autre pic représente des particules plus grosses d'environ 241nm. La largeur étroite des deux pics indique un faible degré de polydispersité.

Les nanoparticules chargées avec les différents extraits de peau de grenade présentent également une distribution de taille large et unimodale. Cela signifie qu'elles aient une gamme de tailles relativement large, mais avec une distribution de tailles concentrée autour d'une taille dominante. En d'autres termes, il s'agit d'une distribution unimodale avec une polydispersité plus élevée. Le tableau III.9 présente les valeurs numériques de l'analyse de la taille des particules par Zetamètre Horiba nanopartica.

Tableau III.9 diamètre moyen et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules de gélatine et des trois extraits.

Nanoparticules	Diamètre moyenne (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)
Extrait aqueux	486.1	0.880	3.8
Extrait hydroéthanolique	151.2	3.262	3.1
Extrait méthanolique	331.3	1.481	6.1
Gélatine	183.1	0.390	7.7

L'indice de polydispersité (PDI) indique le niveau d'homogénéité de la dispersion, compris entre 0 et 1. Si cette valeur est proche de 0, cela signifie que les particules de la dispersion sont homogènes dans leur taille. Si la valeur Indice de polydispersité (PDI) est > 0,5, cela signifie la présence de particules de taille non uniforme (Hady, E. 2022 et al).

Le diamètre moyen des nanoparticules issues de l'extrait de grenade hydroéthanolique est le plus petite (151,2 nm), ce qui suggère une meilleure dispersion ou une capacité de cet extrait à favoriser la formation de particules plus petites suivie les nanoparticules vide de gélatine par 183, nm. En comparaison, les nanoparticules issues de l'extrait méthanolique présentent une taille moyenne intermédiaire de 313,3 nm, reflétant une structure potentiellement plus compacte que celles produites avec l'extrait aqueux 486.1 nm, mais moins compacte que celle de l'extrait hydroéthanolique.

Les nanoparticules de gélatine vides présentaient un indice de polydispersité (PDI) de 0.390, démontrant ainsi une grande stabilité cinétique, ce qui empêche leurs agrégations, confirmer ainsi par sa valeur de potentiel zêta de 7.7 mV. Par ailleurs, les nanoparticules d'extrait aqueux présentent un indice de polydispersité PDI de 0.880 et un potentiel zeta de 3.8 mV indiquant une faible stabilité, ce qui peut entraîner une agrégation des particules de taille non uniforme.

Les nanoparticules issues des extraits méthanolique et hydroéthanolique présentent une un indice de polydispersité PDI de 1,481 et 3.262 respectivement, ce qui indique également la présence de particules de taille non uniforme. Cette polydispersité peut être un indice d'existence de grosses particules ou d'agrégats dans le système de nanoparticules. L'indice de polydispersité PDI élevé des nanoparticules de l'extrait hydroethanolique peut être expliquer par son faible potentiel zêta de 3.1mV indiqui une faible stabilité, ce qui peut entrainer une agrégation des particules. Pour les nanoparticules de l'extrait méthanolique, sa valeur du potentiel zêta de 6.1 mV, légèrement élevé et donc présente une meilleure stabilité que les deux extraits précédents, mais reste relativement faible. La valeur grande de son indice de polydispersité PDI (1.481) est probablement due à l'existence de grosses particules.

Zahed, N., et al en 2024 a nanoencapsulé avec la gomme de graines de *Lepidium perfoliatum* et le maltodextrine l'extrait d'anthocyanine de de la peau de grenade extraire par la CO₂ supercritique. La taille moyenne des particules était de 308 nm, ce qui est similaire aux nanoparticules issues de l'extrait méthanolique dans notre étude. Hashem, N. M., en 2023 a également nanoencapsulé le composé synbiotique de l'écorce de grenade dans de l'alginate, les résultats de la taille des particules étaient supérieurs aux nôtres, où la taille de ces particules était de 544,5 nm. La nanoencapsulation de l'ellagitannine purifiée de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade dans la gélatine a révélé des d'une taille de 149,37 nm (Li, Z et al 2011). Ce résultat est proche de celui des nanoparticules hydroéthanoliques.la différence entre cette résultats et notre de l'extraits aqueux est probablement due au méthode de nano encapsulation utilisé, ou Li, Z et al ont choisis l'auto-assemblage pour obtenir les nanoparticules ellagitannine -gelatine .

C. L'efficacité d'encapsulation

Après avoir analysé les données obtenues par spectroscopie UV-Visible des extraits et des particules encapsulées, les résultats du taux d'encapsulation (EE %) et du taux de chargement (DL %) des trois extraits encapsulés aqueux, méthanolique et hydroéthanolique) sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.10 Efficacités d'encapsulation et le taux de chargement (drug loading) en principe actif des trois extraits encapsulés

Les nanoparticules des extraits	EE%	DL%
Aqueux	19.11	59.71
Methanolique	16.21	55.89
Hydroethanolique	15.90	51.29

L'extrait aqueux montre un taux d'encapsulation le plus élevé (19.11 %), ce qui suggère que l'encapsulation dans la matrice a permis de retenir une quantité significative des composants de l'extrait de grenade. Le taux de chargement (59.71%) est également le plus élevé parmi les trois extraits, indiquant une bonne capacité de la matrice à incorporer l'extarit dans les particules . Cela peut être dû à une bonne solubilité de l'extrait dans le solvant aqueux, facilitant ainsi l'encapsulation. Pour l'extrait méthanolique, le taux d'encapsulation est légèrement plus bas (16.21%) par rapport à l'extarit aqueux, mais reste relativement élevé. Le taux de chargement est également significatif (55.89%), ce qui indique une quantité relativement importante de composants d'extaits de grenade incorporées. Ce résultat pourrait etre attiribué aux propriétés de solubilité spécifiques de l'extait méthanolique, bien qu moins optimales de celle de l'extrait aqueux. Par ailleurs, l'extait hydroéthanolique présente des résultats similaires à ceux de l'extrait méthanolique, avec un efficacité d'encapsulation légèrement inferieur (15.90%) et un taux de chargement en principe actif de 51.29 %. Bien que ce taux soit légèrement plus bas, il reste une plage acceptable. La composition du solvant hydroéthanolique peut affecter la solubilité et l'interaction avec la matrice d'encapsulation, entraînant un taux d'encapsulation légèrement inférieur à celui des extraits aqueux et méthanoliques. En comparant ces résultats avec ceux de la taille des nanoparticules, on constate une forte corrélation entre la taille des nanoparticules obtenues, leur efficacité d'encapsulation ainsi que leur taux de chargement pour les trois extraits. Nos résultats sont différents comparés à l'étude réalisée par Li, Z., et al en 2011 qui sert a nanoencapsulé l'ellagitanninns de grenade dans la gélatine, ces resultats montre que l'efficacité d'encapsulation était 53.074.2% et le taux de chargement du punicalagin A and punicalagin B dans les particules etaits 94.270.4% and 83.870.5 %, respectivement. Ces resultats sont plus forts que notre. Cette difference est probablement dus aux conditions d'encapsulation, à la quantité d'extrait et de gélatine, au choix du solvant et au temps d'incubation. Tous ces paramètres peuvent altérer le rendement, l'efficacité et le taux de chargement de l'encapsulation.

D. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Afin d'étudier les interactions chimiques entre les extraits et la gélatine, une analyse par FTIR a été réalisée. Généralement, les résultats de l'interaction entre principe actif et le polymère se manifestent par la forme d'une formation de nouvelles bandes d'absorption et/ou d'élargissement des bandes d'absorption dans les spectres (Yenilmez, E. 2017). Les résultats sont présentés dans les figures III.12, III.13, III.14.

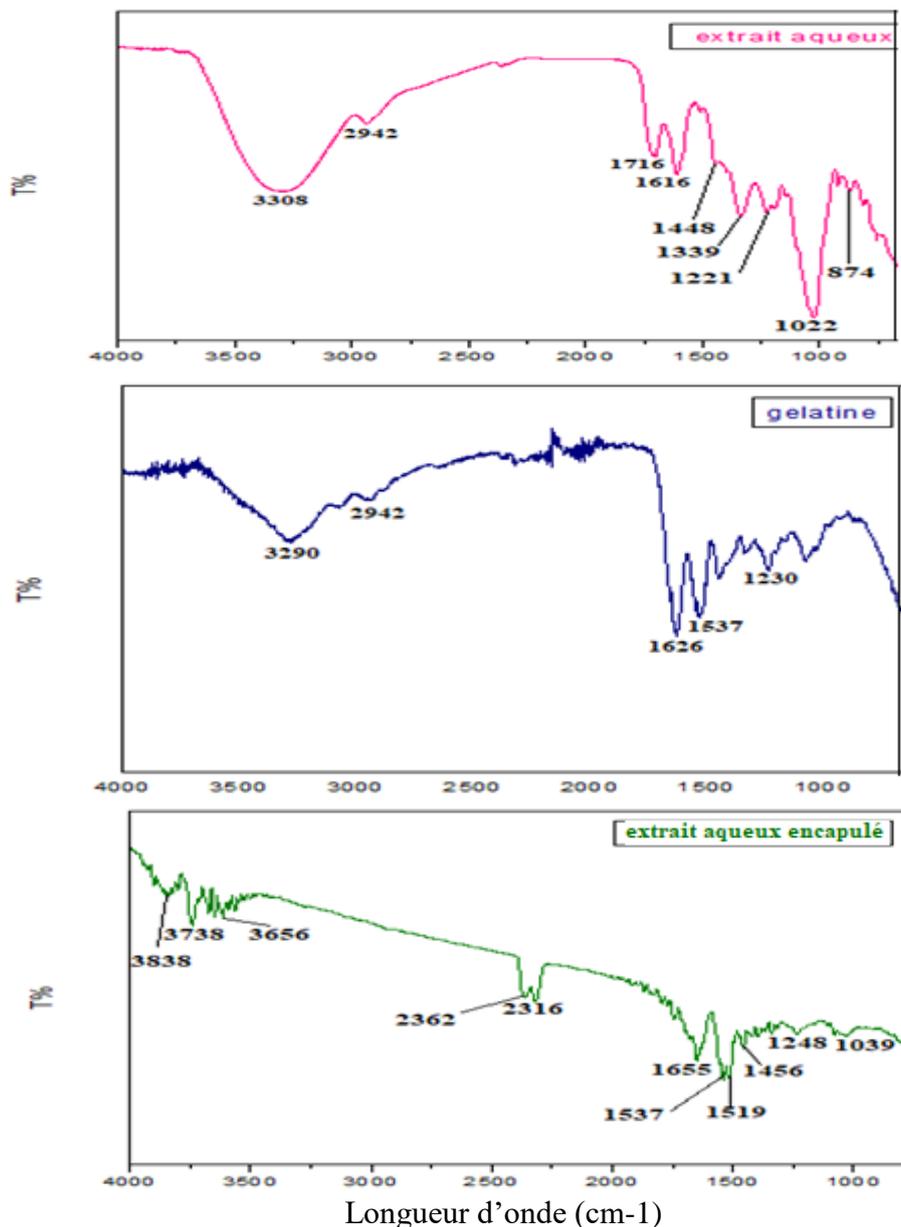


Figure III.12 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait aqueux brute et encapsulé.

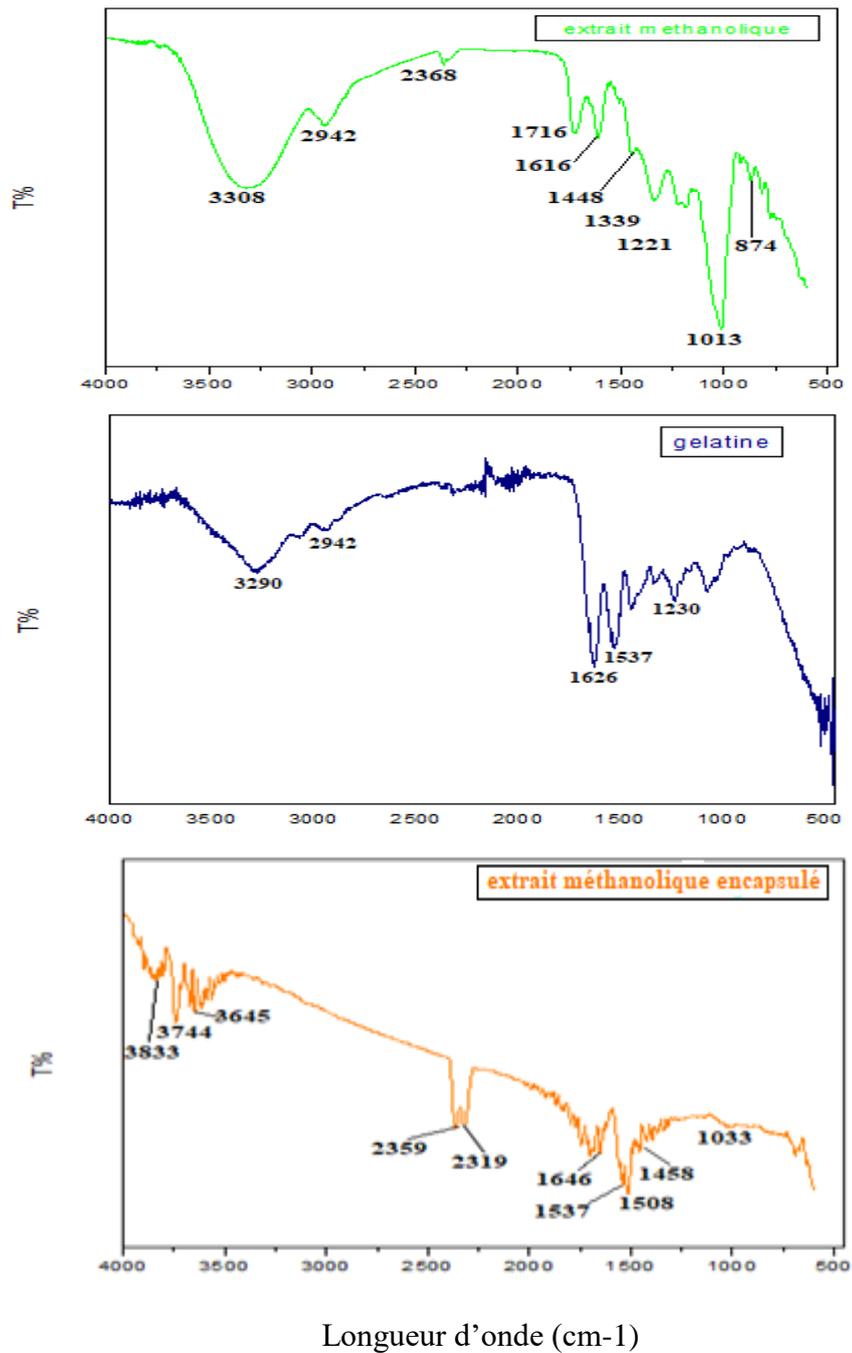


Figure III.13 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait methanolique brute et encapsulé .

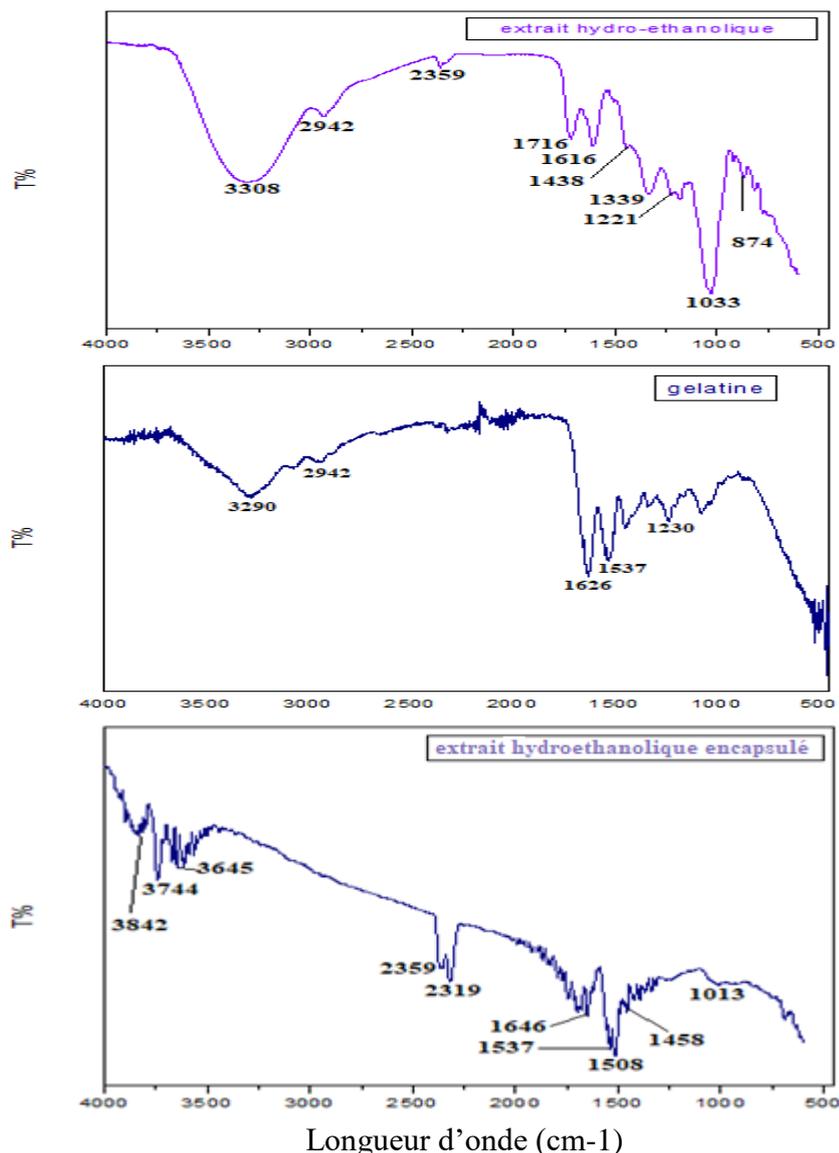


Figure III.14 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour la gélatine et l'extrait hydro-ethanolique brute et encapsulé .

Les résultats du FTIR pour les trois extraits montrent que les spectres sont presque superposables et contiennent presque les mêmes pics. La bande large autour de 3308 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation d'une liaison O-H (hydroxyle), présents en grande quantité dans les polyphénols. La bande apparaissant autour de 2942 cm^{-1} correspond à une bande d'absorption caractéristique des liaisons C-H (hydrocarbures). En revanche, les deux bornes 1716 cm^{-1} et 1616 cm^{-1} sont probablement dues aux vibrations des liaisons C=O des molécules présentes dans les extraits, comme les flavonoïdes.

Par ailleurs, celle apparaissant à 1448 cm^{-1} est attribuée à l'allongement C=C des groupes carbonyles, tandis que les bandes d'absorption autour de 1221 cm^{-1} et 1022 cm^{-1} sont

associées aux vibrations des liaisons C-O-C. Le pic à 1339 cm^{-1} est probablement attribué à la liaison C-H (fonction ester). Nos résultats sont en accord avec la littérature (Soltanzadeh, M., et al 2021); (Vinay, C. H., et al 2018).

Le FTIR de la gélatine montre des pics caractéristiques à 3290 cm^{-1} qui est associée aux vibrations des liaisons hydrogène des groupes NH (Bande d'amide A), le pic à 2942 cm^{-1} liée aux vibrations des groupes CH_2 (Bande d'amide B). Le pic à 1662 cm^{-1} est principalement associée aux vibrations des liaisons carbonyle (C=O) des groupes amides (Bande d'amide I), 1537 cm^{-1} qui est liée aux vibrations de flexion des liaisons NH et C-H (Bande d'amide II) (Li, Z et al 2011), et finalement le pic à 1230 cm^{-1} qui est associée aux vibrations des liaisons C-N et N-H, ainsi qu'aux vibrations de flexion des liaisons C-N et N-H (Bande d'amide III) (Nejat, H et al 2017).

La comparaison par superposition du spectre des extraits, de la gélatine et des extraits encapsulés montre la formation de nouveaux pics (2359 cm^{-1} , 2319 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} , 1508 cm^{-1}) et l'apparition des mêmes pics de gélatine (1537 cm^{-1}) et d'extraits 1448 cm^{-1} ainsi que la disparition de certains pics caractéristiques des extraits et de gélatine tel que le pic du groupe hydroxyle à 3308 cm^{-1} . D'après les résultats, la principale force de liaison semble être la liaison hydrogène, ce qui est cohérent avec l'apparition de pics à 1646 et 1537 cm^{-1} et avec la disparition des groupes hydroxyles à 3308 cm^{-1} (Li, Z., et al 2011). Ces résultats signifient que les extraits sont bien encapsulés dans les particules de gélatine.

E. Microscope à force atomique AFM

Les films contenant les nanoparticules de gélatine et des extraits ont été observés sous microscope à force atomique AFM afin de visualiser et de caractériser leurs surfaces. D'après les images obtenues, les nanoparticules chargées à l'extrait aqueux présentent une taille, une forme et une dispersion presque homogène avec une surface plus claire ce qui indique une encapsulation efficace, ce résultat a été confirmé précédemment ou nous avons obtenu un taux d'encapsulation le plus élevé pour l'extrait aqueux. Par contre, les images des nanoparticules vides de gélatine et chargées par l'extrait méthanolique révèlent une densité plus élevée de particules, entraînant une surface moins claire et de taille peu uniforme. Enfin, les particules chargées avec l'extrait hydroéthanolique ne montrent aucune particule sous forme sphérique. Cette absence de particules est probablement due à la faible efficacité d'encapsulation et au taux de chargement de nanoparticules de l'extrait hydroéthanolique par rapport aux autres extraits, ce qui peut aussi être expliqué par l'absence de particules dans la surface analysée.

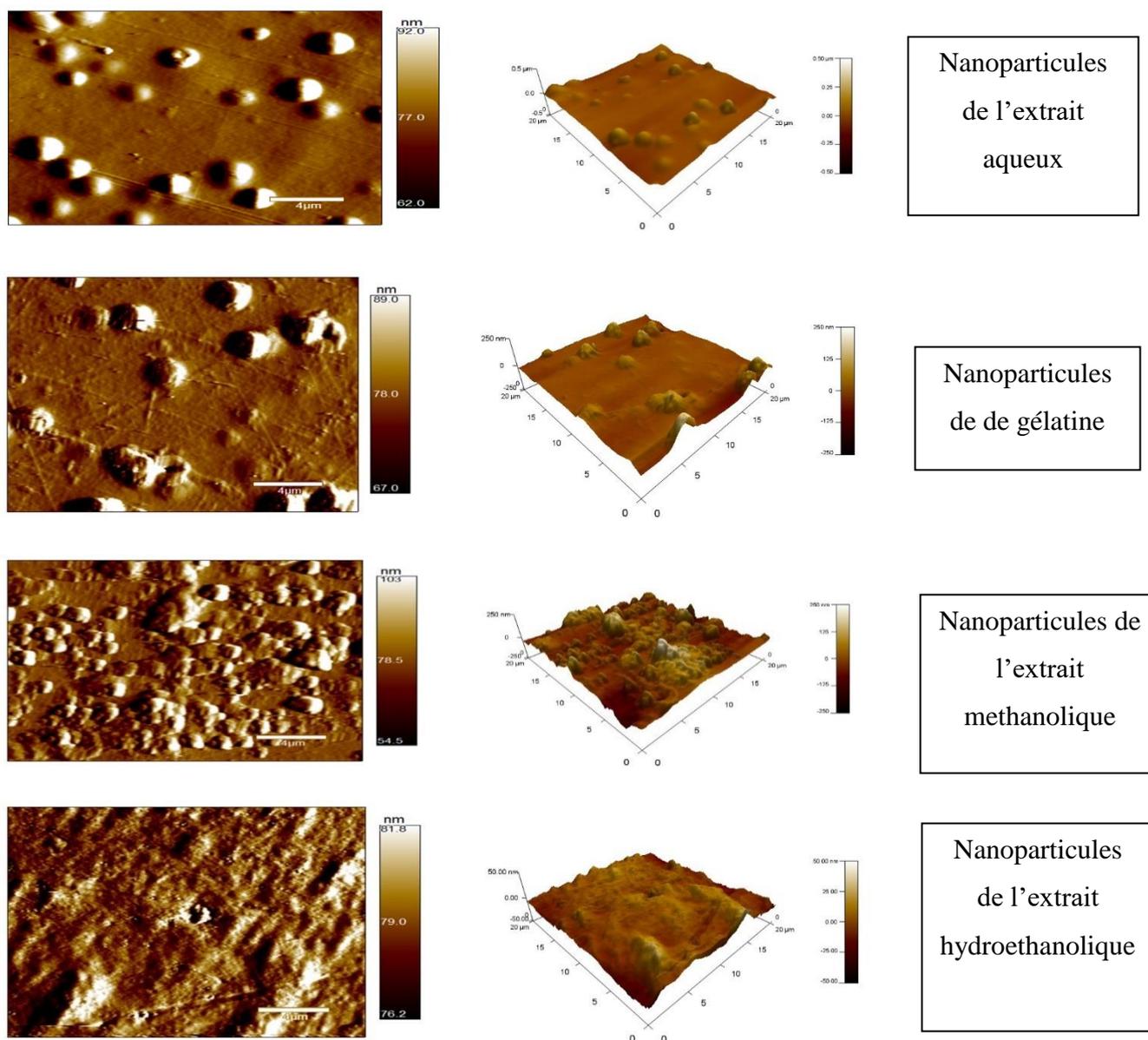


Figure III.15 photo des films chargées des nanoparticules des extraits sous un-Microscope a force atomique AFM.

F. L'analyse par diffraction des rayons X

Les résultats de diffraction des rayons X des échantillons de nanoparticules vides de gélatine, des nanoparticules de l'extrait aqueux et des nanoparticules de l'extrait hydroethanolique sont illustrés dans le diagramme dans la figure III. 16. Le diagramme des particules de gélatine après encapsulation montre des pics de diffraction à 43.55° , 50.84° et 72.54° . La forme pointue de ces pics indique une structure cristalline des particules de gélatine après encapsulation, bien qu'il soit connu que la gélatine soit principalement amorphe et que les diagrammes de diffraction des rayons X présentent généralement deux pics caractéristiques

dans la plage 2θ de 15 à 25° (Wang, J. et al., 2012), ces structures cristallines peuvent se former, notamment si la gélatine a été soumise à un traitement particulier ou à des conditions de séchage spécifiques dans notre cas, le chauffage à 60°C, le refroidissement, l'utilisation de l'éthanol comme solvant organique, et le séchage par lyophilisation.

Après l'ajout de l'extrait aqueux, l'intensité du pic de diffraction de la gélatine a diminué et un large pic est apparu autour de $2\theta = 20^\circ$. Cette évolution peut être attribuée à l'interaction entre l'extrait et la gélatine, ce qui pourrait entraîner une réduction de la proportion de gélatine présente sous forme cristalline. Ce pic large pourrait également indiquer un désordre dans la structure cristalline ou une réduction de la taille des cristallites, caractéristiques des matériaux nanométriques. De plus, il pourrait suggérer la présence d'une phase amorphe ou semi-amorphe (Nejat, H et al 2017).

Par contre, les pics de la gélatine n'ont pas été observés dans les particules chargées d'extrait hydroethanolique. A la place, on constate l'apparition d'un nouveau pic large environ $2\theta = 20^\circ$ ce qui présente un profil similaire aux matériaux nanométriques comme mentionné précédemment, aussi cela suggère la présence d'une phase amorphe ou semi-amorphe (Nejat, H et al 2017).

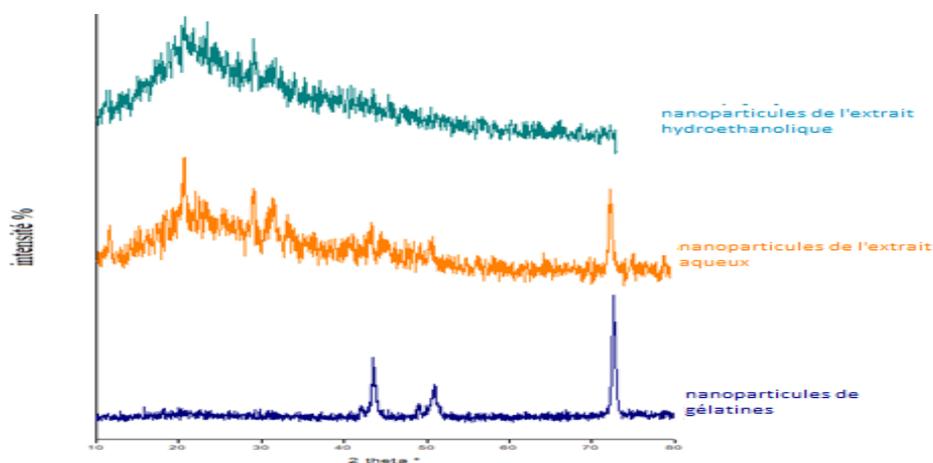


Figure III.16 Diagramme DRX des nanoparticules de gélatine et des extraits aqueux et hydro-ethanolique.

G. La microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) des nanoparticules vides présentent un faible contraste, rendant difficile l'observation détaillée de leur morphologie. Pour une meilleure résolution, un grossissement plus élevé, d'environ 100 nm, est nécessaire, ce qui permet de confirmer les valeurs obtenues par granulométrie laser. En

outre, l'analyse MEB des nanoparticules chargées avec des extraits de peau de grenade aqueux, méthanoliques et hydroéthanoliques montre qu'ils ont une morphologie sphérique et une taille nanométrique. Toutefois, une certaine agrégation est observée, ce qui est confirmé par les valeurs élevées de l'indice de polydispersité (PDI) pour les trois formulations. Une analyse complémentaire par microscopie électronique à transmission (MET) est nécessaire pour une détermination plus précise la forme de ces produits élaborés à l'échelle nanométrique.

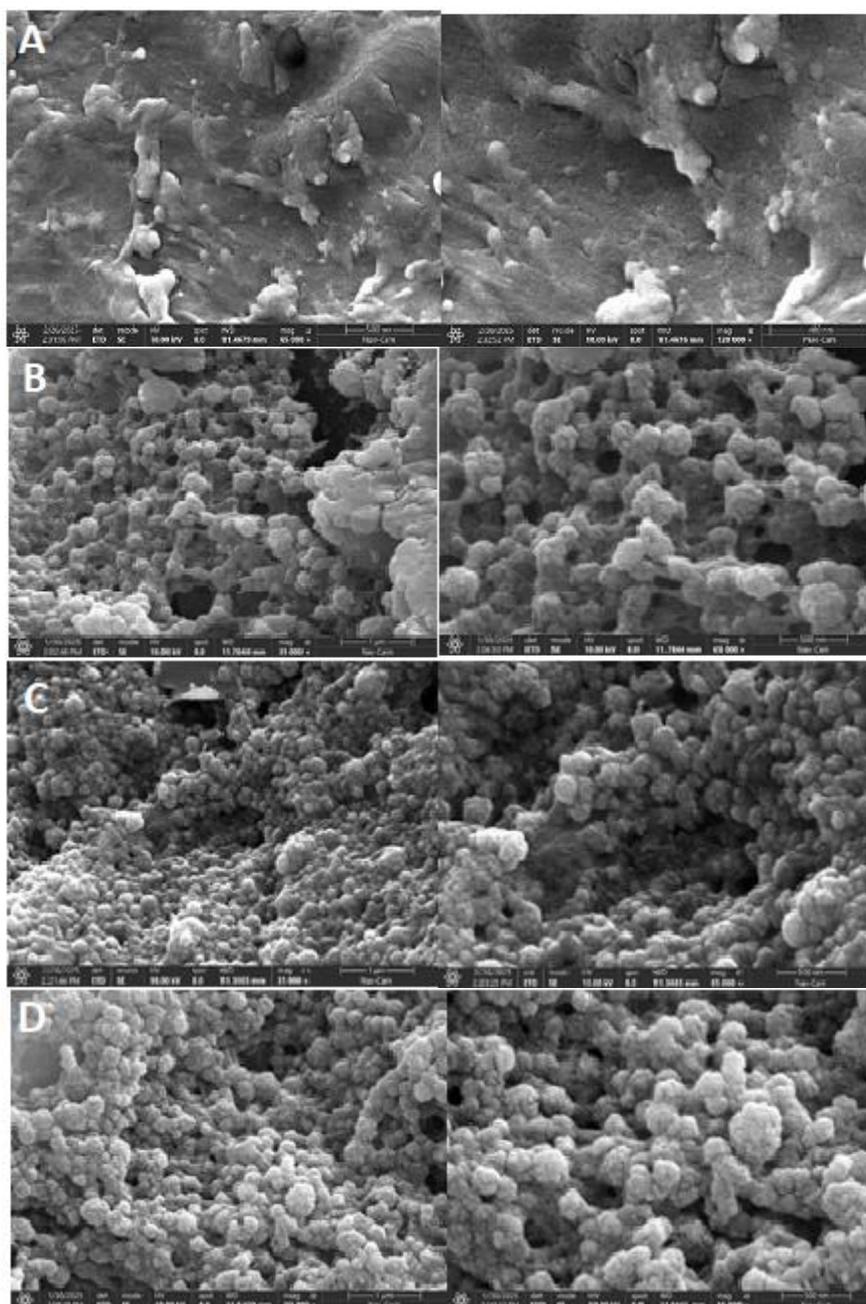


Figure III.15 images des nanoparticules (A) de gélatine, (B)chargées de l'extrait aqueux,(C) chargées de l'extrait methanolique et (D) chargées de l'extrait hydroethanolique sous un microscope électronique à balayage (MEB)

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspective

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, véritables sources de molécules biologiquement actives, Leur utilisation connaît une forte progression. Au cours de la dernière décennie, une émergence considérable dans l'emploi des médicaments à base de plantes par rapport aux substances synthétiques en raison de leur coût, de leur accessibilité, efficacité et de leur faible toxicité. Nous avons choisi de nous intéresser la grenade et plus spécifiquement à la peau du fruit de la grenade (*Punica granatum L*) en raison de ses nombreuses applications traditionnelles pour le traitement de diverses maladies.

Sur la base de données de la littérature, une stratégie a été adoptée pour élucider les étapes de la préparation de ce travail, lequel a été structuré comme suit :

La première partie de cette étude est consacrée à l'extraction des composés bioactifs de la peau jaune de grenade, ainsi qu'à la détermination de leur composition chimique. Cette section inclut également une étude de simulation de quelques composés présents dans nos différents extraits en lien avec leur activité antioxydante, l'activité anti-inflammatoire et l'activité antimicrobienne.

La deuxième section de cette partie expérimentale sera dédiée à l'encapsulation des extraits de la peau jaune de grenade par la méthode de nanoprecipitation suivie de la caractérisation des nanoparticules obtenues.

L'analyse des travaux réalisés a donné les résultats suivants :

- ✓ Le rendement d'extraction de l'extrait hydroéthanolique était le plus élevé (50,62%) suivi par l'extrait méthanolique (36,5%) et l'extrait aqueux (30,4%).
- ✓ L'extrait méthanolique présente les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux ($259,37 \pm 13,66$ mg GAE/g), de flavonoïdes ($63,20 \pm 10,02$ mg QE/g) et tanins hydrolysables ($221,32 \pm 0,00$ mg TAE/g).
- ✓ Parmi les 22 polyphénols et flavonoïdes ont été analysés par des standards authentiques, l'acide maléique (47,534 min) représente la surface maximale avec des pourcentages de 72,1 % et 59,80 % dans les extraits aqueux et méthanoliques, respectivement. Par contre dans l'extrait hydroéthanolique, l'acide coumarique La surface maximale est représentée (1.349 min) domine avec une proportion de 88.69 %.

- ✓ Parmi les 48 composés phénoliques détectés par UPLC-ESI-MS-MS, 25 ont été identifiés et classés en 14 tanins hydrolysables, 5 acides phénoliques, 3 flavonoïdes, 2 anthocyanines et 1 proanthocyanidine.

- ✓ L'analyse des énergies totales des complexes calculés par la méthode MERA a montré que les complexes les plus stables sont formés entre l'acide gallique, la punicalagine- β , la punicaline, l'acide tannique et l'éthanol, suivis par les complexes avec le méthanol et l'eau. Donc on peut conclure que l'éthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction de l'écorce de grenade jaune tandis que le méthanol est moins efficace, suivi de l'eau. Ces résultats sont en parfaite concordance avec nos données expérimentales.

- ✓ La probabilité moyenne de l'activité antioxydante et antibactérienne des complexes avec l'éthanol et le méthanol est supérieure à celle des complexes avec l'eau.

- ✓ L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le (DPPH), le (ABTS), (GOR), (CUPRAC), le pouvoir réducteur et le dosage de la phénanthroline. Parmi les méthodes testées, l'extrait aqueux a montré la capacité antioxydante la plus élevée dans quatre de ces tests, avec des valeurs d'IC₅₀ et d'A0,5 suivantes : IC₅₀ (ABTS) : $7,05 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$, A0,5 (CUPRAC) : $7,40 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$, A0,5 (pouvoir réducteur) : $16,00 \pm 4,02 \mu\text{g/ml}$, et A0,5 (test de la phénanthroline) : $10,23 \pm 1,95 \mu\text{g/ml}$.

- ✓ L'effet anti-inflammatoire in vitro des extraits de peau jaune de grenade a été évalué par la méthode de dénaturation des protéines (BSA). À la concentration de 5mg/ml, les trois extraits ont montré leur meilleur pourcentage d'inhibition : l'extrait aqueux a atteint 101,44 %, l'extrait hydroéthanolique 83,76 % et l'extrait méthanolique 76,71 %.

- ✓ Concernant l'activité antimicrobienne, la méthode de diffusion par puits a été utilisée. Les résultats indiquent que les extraits sont actifs contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P à toutes les concentrations testées, avec la meilleure inhibition observée à 4mg/ml.

- ✓ Les résultats de la spectroscopie FTIR montrent que les spectres sont similaires, suggérant la présence de composés bioactifs communs, tels que les polyphénols et les flavonoides. Les bandes caractéristiques des vibrations des liaisons O-H, C-H, C=O et C-O-C confirmant la richesse en groupes fonctionnels typiques des polyphenols dans ces extraits.
- ✓ La spectroscopie FTIR de la gélatine a permis d'identifier des amides confirmant ainsi sa structure. La comparaison des spectres des extraits encapsulés avec ceux de la gélatine et des extraits non encapsulés, a révélé l'apparition de nouveaux pics (2359 cm^{-1} , 2319 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} , 1508 cm^{-1}) et la disparition et le déplacement de certains pics caractéristiques des extraits et de la gélatine. Cela suggère la formation de nouvelles interactions entre la gélatine et les extraits probablement par des liaisons hydrogène, ce qui est renforcé par l'apparition des pics 1646 cm^{-1} et 1537 cm^{-1} , et la disparition du pic du groupe à 3308 cm^{-1} . Ces résultats confirment que les extraits sont efficacement encapsulés dans la matrice gélatineuse.
- ✓ L'observation des particules chargées des extraits encapsulés microscopie à force atomique (AFM) montre que l'extrait méthanolique présente une densité plus élevée et une surface moins uniforme, indiquant moins homogène. Pour les particules de l'extrait hydroéthanolique ne montrent pas une forme sphérique nette, ce qui suggère une encapsulation moins structurée pour cet extrait. En revanche, l'extrait aqueux semble être le plus efficace pour l'encapsulation des particules de gélatine, offrant une meilleure taille, une meilleure forme et une surface plus claire avec un taux d'encapsulation le plus élevé comparé aux autres extraits.
- ✓ Les résultats de diffraction par des rayons X révélant ainsi une bonne interaction de la gélatine avec les différents extraits.
- ✓ Nos résultats montrent que les nanoparticules issues de l'extrait hydroéthanolique avec une taille moyenne 151,2 nm et un faible potentiel zêta de 3,1 mV, présentent la meilleure homogénéité et dispersion par rapport autres extraits. À l'inverse, les nanoparticules de l'extrait aqueux affichent la taille la plus élevée de 486.1 nm et un potentiel zêta faible de 3,8 mV, indiquant une forte propension à l'agrégation. Pour les

nanoparticules méthanoliques présentent une taille moyenne intermédiaire de 313,3 nm et un potentiel zêta élevé de 6,1 mV. En comparaison, les nanoparticules vides de gélatine de taille 183.1 nm présentent une stabilité notable potentiel zêta de 7,7 mV illustrant leur résistance à l'agrégation.

- ✓ L'efficacité d'encapsulation et le taux de chargement des nanoparticules de l'extraits aqueux sont les plus grande par 19.11% et 59.71% respectivement comparé à celle des autres extraits.
- ✓ Les images obtenues par MEB des nanoparticules nous permet de montré la forme sphérique et régulière de ces dernières, et que sont de l'échelle nanométrique.

Au cours de cette thèse, nous avons exploré un aspect particulièrement intéressant de la grenade: la peau de grenade, souvent considérée comme un déchet industriel dans la fabrication du jus de grenade. Cette approche intègre une dimension environnementale qui complète les aspects chimiques et biologiques de notre étude. Nous avons mis en évidence l'importance des activités antioxydantes, antiinflammatoires et antibactériennes des extraits de peau de grenade mais aussi l'intérêt de la nanoencapsulation notamment pour améliorer leur efficacité et assurer leur protection. Afin de prolonger et approfondir ces travaux, nous recommandons également que des recherches supplémentaires soient menées. Il serait particulier de déterminer d'optimiser l'encapsulation et d'explorer d'autres activités biologiques de ces extraits après encapsulation telles que leurs propriétés antidiabétiques ou anticancéreuses. Par ailleurs, l'extension des études à des essais cliniques in vivo serait bénéfique pour approfondir la compréhension de leurs effets et leur potentiel thérapeutiques de ces extraits encapsulés.

En conclusion, ces résultats confirment que les extraits sont bien encapsulés dans les particules de gélatine, avec une meilleure efficacité d'encapsulation pour l'extrait aqueux. Cette encapsulation pourrait potentiellement améliorer la stabilité et la biodisponibilité des composés bioactifs présents dans ces extraits. Ces systèmes d'encapsulation présentent un fort potentiel pour des applications pharmaceutiques ou alimentaires ouvrant de nouvelles approches dans le développement de produits fonctionnels et thérapeutiques

Les références bibliographiques

A

Abdel-Galil, E. A., Hussin, L. M. S., & El-Kenany, W. M. (2021). Adsorption of Cr (VI) from aqueous solutions onto activated pomegranate peel waste. *Desalination and water treatment*, 211(6012467), 250-266.

Abdulla, R., Mansur, S., Lai, H., Ubul, A., Sun, G., Huang, G., & Aisa, H. A. (2017). Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 465-473.

Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of food science and technology*, 54, 2890-2901.

Adhami, V. M., Khan, N., & Mukhtar, H. (2009). Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. *Nutrition and cancer*, 61(6), 811-815.

Aguiar, J., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Microencapsulation of natural antioxidants for food application – the specific case of coffee antioxidants – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 58,21–39.

Aguilar-Zárate, P., Wong-Paz, J. E., Michel, M., Buenrostro-Figueroa, J., Díaz, H. R., Ascacio, J. A., ... & Aguilar, C. N. (2017). Characterisation of pomegranate-husk polyphenols and semi-preparative fractionation of punicalagin. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 433-438.

Ahmady, A., & Samah, N. H. A. (2021). A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 608, 121037.

Aichour, R., Benzidane, N., Arrar, L., Charef, N., & Baghiani, A. (2018). Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of Algerian *Capparis spinosa*. L. *Annual Research & Review in Biology*, 25(3), 1-12.

Akpınar-Bayızit, A., Özcan, T., Yılmaz-Ersan, L., & Yıldız, E. (2016). Evaluation of antioxidant activity of pomegranate molasses by 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) method. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7(1), 71-74.

Les références bibliographiques

Alexandre, E. M., Silva, S., Santos, S. A., Silvestre, A. J., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food research international*, 115, 167-176.

Ali, Amjad, Ying Chen, Hongsheng Liu, Long Yu, Zulqarnain Baloch, Saud Khalid, Jian Zhu, et Ling Chen. 2019. « Starch-Based Antimicrobial Films Functionalized by Pomegranate Peel ». *International Journal of Biological Macromolecules* 129 (mai): 1120-26.

Ali, S. I., El-Baz, F. K., El-Emary, G. A., Khan, E. A., & Mohamed, A. A. (2014). HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *Int J Pharm Clin Res*, 6(4), 348-355.

Ali Tahir, Rabia Shabir Ahmad, Muhammad Imran, Muhammad Haseeb Ahmad, Muhammad Kamran Khan, Niaz Muhammad, Mahr Un Nisa, Muhammad Tahir Nadeem, Adeela Yasmin, Hafiza Saima Tahir, Aliza Zulifqar & Miral Javed (2021) Recent approaches for utilization of food components as nano-encapsulation: a review, *International Journal of Food Properties*, 24:1, 1074-1096, DOI: 10.1080/10942912.2021.1953067.

Al-Rawahi, A. S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A. S., & Rahman, M. S. (2014). Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum* L.) cultivated in Oman.

Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 891(1), 183-188.

Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*, 896(1-2), 87-93.

Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(34), 6584-6604.

Anandharamakrishnan, C. (2014). *Techniques for nanoencapsulation of food ingredients* (Vol. 8, pp. 65-67). New York: Springer.

Antolovich, Michael, Paul D. Prenzler, Emiliós Patsalides, Suzanne McDonald, et Kevin Robards. 2002. « Methods for testing antioxidant activity ». *Analyst* 127 (1): 183–198.

Apak, Reşat, Kubilay Güçlü, Mustafa Özyürek, et Saliha Esin Karademir. 2004. « Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (26): 7970-81. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.

Artik, N., Murakami, H., & Mori, T. (1998). Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC.

Arulprakasajothi M, Elangovan K, Chandrasekhar U, et al. Performance study of conical strip inserts in tube heat exchanger using water based titanium oxide nanofluid. *Therm Sci* 2018; 22: 477–485.

B

Badri W, Miladi K, Agha Q, et al. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2017; 516: 238–244.

Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., et al. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143–182.

Balaban, M., Koç, C., Sar, T., & Akbas, M. Y. (2022). Screening for bioactive compound rich pomegranate peel extracts and their antimicrobial activities: extraction methods for increased antibacterial and antifungal properties. *Johnson Matthey Technology Review*, 66(1), 81-89.

Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., & Jerrine, J. (2020). *Protocols in actinobacterial research*. New York: Springer US.

Banerjee S, Chanda A, Adhikari A, Das A, Biswas S.(2014). Evaluation of Phytochemical Screening and Anti Inflammatory Activity of Leaves and Stem of Mikania scandens (L.) Wild. *Ann Med Health Sci Res*,4(4),532-6

Bayramova, A., & Isayeva, N. (2022). History and Prospects of Using Punica granatum L. *Bulletin of Science and Practice*.

Ben Abdennebi, M. A. (2012). Le grenadier tunisien (Punica granatum) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK.

Les références bibliographiques

Ben-Ghzaïel T. *Synthèse, caractérisation et étude des propriétés magnétiques et diélectriques de nanocomposites Polyaniline/hexaferrite pour l'absorption des microondes*. Thèse de Doctorat, Université Paris-Saclay, 2020.

Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., & Kumar, K. S. (2013). Medicinal uses of Punica granatum and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5), 28-35.

Blois, Marsden S. 1958. « Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical ». *Nature* 181 (4617): 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.

Bratovcic, A., & Suljagic, J. (2019). Micro- and nano-encapsulation in food industry. *Croatian journal of food science and technology*, 11(1), 113-121.

C

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.36.

Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2022). The role of microencapsulation in food application. *Molecules*, 27(5), 1499.

Calin Sánchez, Á., and Carbonell Barrachina, Á.. (2012). La grenade cultivée en Espagne: Punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade, dans l'alimentation fonctionnelle du futur, pp 1-77 (université Miguel Hernández).

Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of applied polymer science*, 63(1), 125-132.

Çam, M., & Hışıl, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry*, 123(3), 878-885.

Çam M., Hışıl Y. et Durmaz G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112 : 721–726;

Chaabna, N., Naili, O., Ziane, N., Bensouici, C., Dahamna, S., & Harzallah, D. (2023). Neuroprotective and Antioxidant Activities of Algerian Punica granatum L. Peel Extracts. *Current Enzyme Inhibition*, 19(3), 202-210.

Les références bibliographiques

Chambon, S., Schatz, C., Sébire, V., Pavageau, B., Wantz, G., & Hirsch, L. (2014). Organic semiconductor core–shell nanoparticles designed through successive solvent displacements. *Materials Horizons*, 1(4), 431-438.

Chen, J., Liao, C., Ouyang, X., Kahramanoğlu, I., Gan, Y., & Li, M. (2020). Antimicrobial activity of pomegranate peel and its applications on food preservation. *Journal of Food Quality*, 2020, 1-8.

Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 272–283.

Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4791-4795.

Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426-442.

D

Dang, X., Yang, M., Shan, Z., Mansouri, S., May, B. K., Chen, X., et al. (2017). On spray drying of oxidized corn starch cross-linked gelatin microcapsules for drug release. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 493–500.

De Kruif, C. G., Weinbreck, F., & De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(5), 340–349.

de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331-5337.

Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., ... & Sadrabad, E. K. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and chemical toxicology*, 114, 108-111.

De Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243,23–45.

Dorđević, V., Paraskevopoulou, A., Mantzouridou, F., Lalou, S., Pantić, M., Bugarski, B., & Nedović, V. (2016). Encapsulation technologies for food industry. *Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food*, 329-382

Douaouri, N. E., & Djebli, N. (2018). In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of Algerian pomegranate (*Punica granatum L.*). *International Journal of Biosciences*, 12(2), 76-90.

Dresser, G.K., Spence, J.D, Bailey D.G., 2000. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet.* 38, 41-57, doi: 10.2165/00003088-200038010-00003.

Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Yang, M., & Hou, C. (2019). Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of TLR4/NF- κ B pathway activation. *Food & nutrition research*, 63.

Duchêne, D., & Bochot, A. (2016). Thirty years with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 514,58–72.

E

El-Azazy, M., Kalla, R. N., Issa, A. A., Al-Sulaiti, M., El-Shafie, A. S., Shomar, B., & Al-Saad, K. (2019). Pomegranate peels as versatile adsorbents for water purification: Application of Box–Behnken design as a methodological optimization approach. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 38(6), 13223.

Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32), 4724-4730.

El-Hadary, A. E., & Taha, M. (2020). Pomegranate peel methanolic-extract improves the shelf-life of edible-oils under accelerated oxidation conditions. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1798-1811.

Elodie, W. A. L. D. (2009). LE GRENADIER (*PUNICA GRANATUM*): Plante historique et évolutions.

Elshafie, H. S., Caputo, L., De Martino, L., Sakr, S. H., De Feo, V., & Camele, I. (2021). Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) leathery exocarp extract. *Plants*, 10(1), 153.

Eren, G., Cukurova, Z., & Hergunsel, O. (2014). Oxidative Stress and the Lung in Diabetes: The Use of Pomegranate Juice. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 237-245). Academic Press

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and bioprocess technology*, 6, 628-647.

F

Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39, 18–39.

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.

Feng, Y., Lin, J., He, G., Liang, L., Liu, Q., Yan, J., & Yao, Q. (2022). Compositions and biological activities of pomegranate peel polyphenols extracted by different solvents. *Molecules*, 27(15), 4796.

Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food chemistry*, 127(2), 807-821.

G

Galaz, P., Valdenegro, M., Ramírez, C., Nuñez, H., Almonacid, S., & Simpson, R. (2017). Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *Journal of Food Engineering*, 208, 19-27.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(10), 4581-4589.

Gioti, E. M., Fiamegos, Y. C., Skalkos, D. C., & Stalikas, C. D. (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 117(3), 398-404.

Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Food Chemistry*, 352, 129396.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15(7–8), 330–347.

Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: seed oil encapsulation. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 639-652.

Gullon, B., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food control*, 59, 94-98.

Gültekin HE, Değim Z. Biodegradable Polymeric Nanoparticles are effective Systems for Controlled Drug Delivery. *FABAD J Pharm Sci* 2013; 38: 107–118.

Gundogdu, M., & Yilmaz, H. (2012). Organic acid, phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars and selected genotypes. *Scientia Horticulturae*, 143, 38-42.

H

Hadjadj, S., Benyahkem, M., Lamri, K., & Ould El Hadj-Khelil, A. (2018). Potential assessment of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels as a source of natural antioxidants. *Pharmacophore*, 9(4), 29-35.

Hady, E., Youssef, M., Aljahani, A. H., Aljumayi, H., Ismail, K. A., El-Damaty, E. S., ... & El-Sharnouby, G. (2022). Enhancement of the stability of encapsulated pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract by double emulsion with carboxymethyl cellulose. *Crystals*, 12(5), 622.

Hajleh, M. A., & Al-Dujaili, A. J. E. N. (2016). Anti-cancer activity of pomegranate and its biophenols; general review. *EC Nutr*, 6, 28-52.

Hamoudi, M., Amroun, D., Baghiani, A., Khennouf, S., & Dahamna, S. (2021). Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Analgesic Activities of Alcoholic Extracts of *Ephedra Nebrodensis* from Eastern Algeria. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 574.

Hanafy, S. M., Abd El-Shafea, Y. M., Saleh, W. D., & Fathy, H. M. (2021). Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 80.

Hani, N. M., Torkamani, A. E., Azarian, M. H., Mahmood, K. W. A., & Ngalim, S. H. (2017). Characterisation of electrospun gelatine nanofibres encapsulated with *Moringa oleifera* bioactive extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3348–3358.

Hashem, N. M., Hosny, N. S., El-Desoky, N., Soltan, Y. A., Elolimy, A. A., Sallam, S. M., & Abu-Tor, E. S. M. (2023). Alginate nanoencapsulated synbiotic composite of pomegranate peel phytochemicals and multi-probiotic species as a potential feed additive: physicochemical, antioxidant, and antimicrobial activities. *Animals*, 13(15), 2432.

He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., & Gao, Y. (2011). Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS⁺ assay. *Food Research International*, 44(5), 1161-1167.

Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F. A., & Artes, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, 210, 39-42.

Herrera, J. E., & Sakulchaicharoen, N. (2016). Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles. In *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization* (pp. 259-271). CRC Press.

Hessien, M. (2022). Microwave-assisted hydrothermal carbonization of pomegranate peels into hydrochar for environmental applications. *Energies*, 15(10), 3629.

Hodúr, C., Bellahsen, N., Mikó, E., Nagypál, V., Šereš, Z., & Kertész, S. (2020). The adsorption of ammonium nitrogen from milking parlor wastewater using pomegranate peel powder for sustainable water, resources, and waste management. *Sustainability*, 12(12), 4880.

Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., & Li, Y. (2005). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 160-169.

I

Ibrahim, T. H., Gulistan, A. S., Khamis, M. I., Ahmed, H., & Aidan, A. (2016). Produced water treatment using naturally abundant pomegranate peel. *Desalination and Water Treatment*, 57(15), 6693-6701.

Institut national de la recherche agronomique d'Algérie, RADP, Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques, INRAA (juin 2006) 65p

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., & Vican, P. (2001). Larousse des plantes médicinales: identification. *préparation, soins. 2ème édition de VUEF, Hong Kong*, 335.

J

Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O. P., & Shivhare, U. S. (2016). Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 101–113.

Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, 1-34.

Jalal, H., Pal, M. A., Hamdani, H., Rovida, M., & Khan, N. N. (2018). Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 992-997.

Jalili, S., Tabatabaee Naini, A., Ashrafi, M., & Aminlari, M. (2020). Antioxidant activity of pericarp extract from different varieties of pomegranate fruit. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(1), 95-107.

Jawad, A. H., Waheeb, A. S., Abd Rashid, R., Nawawi, W. I., & Yousif, E. (2018). Equilibrium isotherms, kinetics, and thermodynamics studies of methylene blue adsorption on pomegranate (*Punica granatum*) peels as a natural low-cost biosorbent. *Desalination and Water Treatment*, 105, 322-331.

Jia, Z., Dumont, M. J., & Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87–104.

Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current opinion in colloid & interface science*, 19(5), 417-427.

K

Khalil, A. A., Khan, M. R., & Shabbir, M. A. (2018). In vitro antioxidant activity and punicalagin content quantification of pomegranate peel obtained as agro-waste after juice extraction. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 55(1).

Khan, S. A., & Schneider, M. (2013). Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading. *Macromolecular bioscience*, 13(4), 455-463.

Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts. *Industrial Crops and Products*, 111, 345-352.

Kfoury, M., Landy, D., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2014). Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10(1), 2322-2331.

Kramberger, K., Barlič-Maganja, D., Bandelj, D., Baruca Arbeiter, A., Peeters, K., Miklavčič Višnjevec, A., & Jenko Pražnikar, Z. (2020). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS determination of bioactive compounds and antioxidant activity comparison of the hydroalcoholic and water extracts from two *Helichrysum italicum* species. *Metabolites*, 10(10), 403.

Kumar, N., Pratibha, Neeraj, Sami, R., Khojah, E., Aljahani, A. H., & Al-Mushhin, A. A. (2022). Effects of drying methods and solvent extraction on quantification of major bioactive compounds in pomegranate peel waste using HPLC. *Scientific Reports*, 12(1), 8000.

L

Lansky E. et Newman R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prévention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.

Lesmes, U., & McClements, D. J. (2009). Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 448-457.

Li, Xuan, Humaira Wasila, Linwei Liu, Tian Yuan, Zhongmei Gao, Beita Zhao, et Imran Ahmad. 2015. « Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis ». *Food chemistry* 175: 575–584.

Li, Yunfeng, Changjiang Guo, Jijun Yang, Jingyu Wei, Jing Xu, et Shuang Cheng. 2006. « Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract ». *Food chemistry* 96 (2): 254–260.

Les références bibliographiques

Li, Z., Percival, S. S., Bonard, S., & Gu, L. (2011). Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. *Molecular nutrition & food research*, 55(7), 1096-1103.

Liu, Y., Kong, K. W., Wu, D. T., Liu, H. Y., Li, H. B., Zhang, J. R., & Gan, R. Y. (2022). Pomegranate peel-derived punicalagin: Ultrasonic-assisted extraction, purification, and its α -glucosidase inhibitory mechanism. *Food chemistry*, 374, 131635.

Liu, Y., & Seeram, N. P. (2018). Liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry for comprehensive phenolic characterization of pomegranate fruit and flower extracts used as ingredients in botanical dietary supplements. *Journal of separation science*, 41(15), 3022-3033..

Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.

M

Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C. G., Dreher, M., & Reed, J. D. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 324-329.

Malik, Arshi, Farrukh Afaq, Sami Sarfaraz, Vaqar M. Adhami, Deeba N. Syed, et Hasan Mukhtar. 2005. « Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (41): 14813–14818.

Malviya, S., Arvind, Jha, A., & Hettiarachchy, N. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of food science and technology*, 51, 4132-4137.

Man, G., Xu, L., Wang, Y., Liao, X., & Xu, Z. (2022). Profiling phenolic composition in pomegranate peel from nine selected cultivars using UHPLC-QTOF-MS and UPLC-QQQ-MS. *Frontiers in Nutrition*, 8, 807447.

Mansour, E., Khaled, A. B., Lachiheb, B., Abid, M., Bachar, K., & Ferchichi, A. (2018). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from tunisian pomegranat e.

Marcillo-Parra, V., Tupuna-Yerovi, D. S., González, Z., & Ruales, J. (2021). Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application—A review. *Trends in Food Science & Technology*, *116*, 11-23.

Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food research international*, *44*(9), 3039-3046.

Masci, Alessandra, Andrea Coccia, Eugenio Lendaro, Luciana Mosca, Patrizia Paolicelli, et Stefania Cesa. 2016. « Evaluation of Different Extraction Methods from Pomegranate Whole Fruit or Peels and the Antioxidant and Antiproliferative Activity of the Polyphenolic Fraction ». *Food Chemistry* 202 (juillet): 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.106>.

Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyaya, A., Lacetera, N., Ryan, M. T., Romani, A., Bernini, R., & Sweeney, T. (2019). Anti-inflammatory effects of pomegranate peel extracts on in vitro human intestinal caco-2 cells and ex vivo porcine colonic tissue explants. *Nutrients*, *11*(3), 548.

Mastrogiovanni, F., Bernini, R., Basiricò, L., Bernabucci, U., Campo, M., Romani, A., ... & Lacetera, N. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory effects of pomegranate peel extracts on bovine mammary epithelial cells BME-UV1. *Natural product research*, *34*(10), 1465-1469.

Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., ... & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: A comprehensive review. *Applied Sciences*, *12*(3), 1424.

Meziane, Z. K., Elothmani, D., & Benhadja, L. B. (2016). Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria. *Fruits*, *71*(1), 17-26.

Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides)* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).

Milhiet, P. E., Dosset, P., Giocondi, M. C., & Le Grimellec, C. (2004). La microscopie à force atomique, une technique de pointe appliquée à la biologie. *Journal de la Société de Biologie*, *198*(2), 169-174.

Mishra, B., Patel, B. B., & Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6,9–24.

Moreno, P. M., & Valero, R. M. (1992). *El granado*. Mundi-Prensa.

Mosa, A. F., & Mohamed, M. A. E. (2021). Potential Effect of Pomegranate Peels Extract (Punica Granatum.) against Covid-19 Virus.

N

Naidu, B. V. K., & Paulson, A. T. (2011). A new method for the preparation of gelatin nanoparticles: Encapsulation and drug release characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(6), 3495-3500.

Naziri, Z., Rajaian, H., & Firouzi, R. (2012). Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (Punica granatum) peel extracts against various pathogenic bacteria.

Negi, P. S., & Jayaprakasha, G. K. (2003). Antioxidant and antibacterial activities of Punica granatum peel extracts. *Journal of food science*, 68(4), 1473-1477.

Nejat, H., Rabiee, M., Varshochian, R., Tahriri, M., Jazayeri, H. E., Rajadas, J., ... & Tayebi, L. (2017). Preparation and characterization of cardamom extract-loaded gelatin nanoparticles as effective targeted drug delivery system to treat glioblastoma. *Reactive and Functional Polymers*, 120, 46-56.

Ninan, G., Jose, J., & Abubacker, Z. (2011). Preparation and characterization of gelatin extracted from the skins of rohu (Labeo Rohita) and common carp (Cyprinus Carpio). *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 143–162.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(1), 166-171.

Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R., & Fartashvand, M. (2018). Antibacterial activity of pomegranate (Punica granatum L.) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(1), 32-36.

O

Oyaizu, Makoto. 1986. « Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine ». *The Japanese journal of nutrition and dietetics* 44 (6): 307–315.

P

Paarakh, M. P., & Jose, P. A. (2018). A review on anticancer activity of *Punica granatum* Linn. *Eur J Biomed Pharm Sci*, 5(4), 884-891.

Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., & Volpe, M. G. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food chemistry*, 190, 824-831.

Pal, Jag, C. V. Raju, I. P. Lakshmisha, Gayatri Pandey, Rehana Raj, et Rajkumar Ratankumar Singh. 2017. « Antioxidant activity of pomegranate peel extract and its effect on storage stability of cooked meat model system of indian mackerel (*Rastrelliger Kanagurta*) stored at 4°C ». *Biochem. Cell. Arch* 17: 183–187.

Paredes, A. J., Asensio, C. M., Llabot, J. M., Allemandi, D. A., & Palma, S. D. (2016). Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization.

Parisi, V., Santoro, V., Donadio, G., Bellone, M. L., Diretto, G., Sandri, C., ... & Braca, A. (2022). Comparative chemical analysis of eight *Punica granatum* L. peel cultivars and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Antioxidants*, 11(11), 2262.

Potemkin, V., & Grishina, M. (2008). Principles for 3D/4D QSAR classification of drugs. *Drug discovery today*, 13(21-22), 952-959.

Potemkin, V. A., Ivshina, N. N., & Maksakov, V. A. (2009). Theoretical study of the conformational features of triosmium clusters. *Journal of Structural Chemistry*, 50, 143-151.

Potemkin, V. A., Pogrebnoy, A. A., & Grishina, M. A. (2009). Technique for energy decomposition in the study of “receptor-ligand” complexes. *Journal of chemical information and modeling*, 49(6), 1389-1406.

Potemkin, V., & Grishina, M. (2018). Grid-based technologies for in silico screening and drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 25(29), 3526-3537.

Potemkin, V., Palko, N., & Grishina, M. (2019). Quantum theory of atoms in molecules for photovoltaics. *Solar Energy*, *190*, 475-487.

Poyrazoglu E, Gökmen V, Nevzat A. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum L*) Grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal* 2002;15: 567–575.

Q

Qu, W., Breksa III, A. P., Pan, Z., Ma, H., & Mchugh, T. H. (2012). Storage stability of sterilized liquid extracts from pomegranate peel. *Journal of food science*, *77*(7), C765-C772.

R

Rashid, M., & Shafi, S. (2018). Evaluation of phytochemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of Kashmiri pomegranate (*Punica granatum Linn.*) flower extract. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *13*(2), 58-67.

Rahimi, H. R., Arastoo, M., & Ostad, S. N. (2012). A comprehensive review of *Punica granatum* (Pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *11*(2), 385..

Rahnemoon, P., Sarabi-Jamab, M., Bostan, A., & Mansouri, E. (2021). Nano-encapsulation of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. *Food Bioscience*, *43*, 101331.

Rana, T. S., Narzary, D., & Ranade, S. A. (2010). Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica L.* Pomegranate. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol*, *4*(2), 19-25.

Rashid, M., & Shafi, S. (2018). Evaluation of phytochemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of Kashmiri pomegranate (*Punica granatum Linn.*) flower extract. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *13*(2), 58-67.

Re, Roberta, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, et Catherine Rice-Evans. 1999. « Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay ». *Free Radical Biology and Medicine* *26* (9): 1231-37. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

Reguieg Yssad, A. L'effet de *Punica granatum* sur la flore gastrique; Etude Invitro et Invivo chez le rat (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).2019

Les références bibliographiques

Rigaux G. Elaboration, caractérisation et évaluation biologique de nanoparticules biocompatibles pour la thérapie photodynamique et l'imagerie IRM. Université de Reims Champagne-Ardenne, 2015.

Rosenbloom, J., Harsch, M., & Jimenez, S. (1973). Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Archives of biochemistry and biophysics*, 158(2), 478-484.

Ruis A. R., 2015. Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine. *Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, vol 15, no 1, p. 22-33. DOI: 10.1525/gfc.2015.15.1.22.

Russo, M., Fanali, C., Tripodo, G., Dugo, P., Muleo, R., Dugo, L., ... & Mondello, L. (2018). Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: Application to different Italian varieties. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, 3507-3520.

S

Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial crops and Products*, 40, 239-246.

Saadh, M. J., Almaaytah, A. M., Alaraj, M., Dababneh, M. F., Sa'adeh, I., Aldalaen, S. M., ... & DAYYIH, W. (2021). Punicalagin and zinc (II) ions inhibit the activity of SARS-CoV-2 3CL-protease in vitro. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 25(10), 3908-13.

Saeed, M., Naveed, M., BiBi, J., Kamboh, A. A., Arain, M. A., Shah, Q. A., ... & Dhama, K. (2018). The promising pharmacological effects and therapeutic/medicinal applications of *punica granatum* L.(Pomegranate) as a functional food in humans and animals. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 12(1), 24-38.

Saifullah, M., Ahsan, A., & Shishir, M. R. I. (2016). Production, stability and application of micro-and nanoemulsion in food production and the food processing industry. In emulsions (pp. 405-442). Academic Press.

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development—a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17(10), 547–556.

- Sanhueza, L., García, P., Giménez, B., Benito, J. M., Matos, M., & Gutiérrez, G. (2022). Encapsulation of pomegranate peel extract (*Punica granatum* L.) by double emulsions: Effect of the encapsulation method and oil phase. *Foods*, *11*(3), 310.
- Šavikin, K., Nastić, N., Janković, T., Bigović, D., Miličević, B., Vidović, S., ... & Vladić, J. (2021). Effect of type and concentration of carrier material on the encapsulation of pomegranate peel using spray drying method. *Foods*, *10*(9), 1968.
- Savkov, B. Y., Virovets, A. V., Peresykina, E. V., Potemkin, V. A., Palko, N. N., & Maksakov, V. A. (2021). Unusual Synthesis of Triosmium Carbene Clusters by Tandem Activation of Chlorohydrocarbons and Heterocyclic Amines. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2021*(10), 989-996.
- Seeram N. P., Zhang Y., Reed J. D., Krueger C. G. et Vaya J. (2006). Pomegranate Phytochemicals. In : Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine. Seeram N. P., Risa N. S., Heber D. Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.
- Selcuk, Nurten, et Mustafa Erkan. 2015. « Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of sour–sweet pomegranates cv.‘Hicaznar’during long-term storage under modified atmosphere packaging ». *Postharvest Biology and Technology* 109: 30–39.
- Sentandreu, E., Cerdán-Calero, M., & Sendra, J. M. (2013). Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. *Journal of Food Composition and Analysis*, *30*(1), 32-40.
- Shao, J., Li, Y., Wang, Z., Xiao, M., Yin, P., Lu, Y., ... & Liu, J. (2013). 7b, a novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2-and p38 MAPK-mediated activation of NF-κB in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *International immunopharmacology*, *17*(2), 216-228.
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). A review study on *Punica granatum* L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *21*(3), 221-227.
- Shi, Honglian, Noriko Noguchi, et Etsuo Niki. 2001. « Galvinoxyl Method for Standardizing Electron and Proton Donation Activity ». In *Methods in Enzymology*, 335:157-66. Flavonoids and Other Polyphenols. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35240-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35240-0).

Shirode, A. B., Bharali, D. J., Nallanthighal, S., Coon, J. K., Mousa, S. A., & Reliene, R. (2015). Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. *International journal of nanomedicine*, 475-484.

Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.

Singh, Mithilesh, Alok Jha, Arvind Kumar, Navam Hettiarachchy, Ashiwini K. Rai, et Divya Sharma. 2014. « Influence of the Solvents on the Extraction of Major Phenolic Compounds (Punicalagin, Ellagic Acid and Gallic Acid) and Their Antioxidant Activities in Pomegranate Aril ». *Journal of Food Science and Technology* 51 (9): 2070-77. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1267-0>.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Soltanzadeh, M., Peighambaroust, S. H., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Chitosan nanoparticles as a promising nanomaterial for encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a natural source of antioxidants. *Nanomaterials*, 11(6), 1439.

Sood, A., & Gupta, M. (2015). Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*, 12, 100-106.

Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730.

Subramani, T., & Ganapathyswamy, H. (2020). An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. *Journal of food science and technology*, 57(10), 3545-3555.

Suručić, R., Travar, M., Petković, M., Tubić, B., Stojiljković, M. P., Grabež, M., ... & Škrbić, R. (2021). Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor: In silico and in vitro studies. *Bioorganic chemistry*, 114, 105145.

Suručić, R., Tubić, B., Stojiljković, M. P., Djuric, D. M., Travar, M., Grabež, M., ... & Škrbić, R. (2021). Computational study of pomegranate peel extract polyphenols as potential inhibitors of SARS-CoV-2 virus internalization. *Molecular and cellular biochemistry*, 476, 1179-1193.

Syed D, Malik A, Hadi N, Schmitt C, Afaq F, Mukhtar H. Chapter 7- Molecular Mechanisms of Chemoprevention of Cancer by Pomegranate. *Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine* 2006:117-131

Szydłowska-Czerniak, Aleksandra, Csilla Dianoczki, Katalin Recseg, György Karlovits, et Edward Szlyk. 2008. « Determination of Antioxidant Capacities of Vegetable Oils by Ferric-Ion Spectrophotometric Methods ». *Talanta* 76 (4): 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>.

T

Taleghani, A., & Akbari, R. (2021). Diversity of Phenolic Profiles in Peel of an Iranian Pomegranate Cultivar (*Punica granatum* L.): Phenolic Profiles in Peel of Iranian Pomegranate. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 51-68.

Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021, March). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1122, No. 1, p. 012095). IOP Publishing.

Tarhini, M., Greige-Gerges, H., & Elaissari, A. (2017). Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, 522, 172–197.

Terrien, A. (2015). *Synthèse et étude structurale multi-échelle de peptides mimes de collagène* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

Tiede, K., Boxall, A. B., Tear, S. P., Lewis, J., David, H., & Hassellöv, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food additives and contaminants*, 25(7), 795-821.

Tito, A., Colantuono, A., Pirone, L., Pedone, E., Intartaglia, D., Giamundo, G., ... & Apone, F. (2021). Pomegranate peel extract as an inhibitor of SARS-CoV-2 spike binding to human ACE2 receptor (in vitro): a promising source of novel antiviral drugs. *Frontiers in chemistry*, 9, 638187.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloid*, 17(1), 1–23.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, 103(3), 816-822.

V

Van Elswijk, D. A., Schobel, U. P., Lansky, E. P., Irth, H., & van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65(2), 233-241.

Vinay, C. H., Goudanavar, P., & Acharya, A. (2018). Development and characterization of pomegranate and orange fruit peel extract based silver nanoparticles. *Journal of Manmohan Memorial Institute of Health Sciences*, 4(1), 72-85.

Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Pérez-Alvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:635–654.

W

Waghulde, S., Bhopi, S., Ghude, T., Gotarane, R., & Kale, M. (2018). Comparative Anti-Inflammatory Activity of Aril Extracts of *Punica granatum* Fruits. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 9(1), 66.

Wan, H. C., Sultana, B., Singh Nigam, P., & Owusu-Apenten, R. (2018). Comparison of iron (III) reducing antioxidant capacity (iRAC) and ABTS radical quenching assays for estimating antioxidant activity of pomegranate. *Beverages*, 4(3), 58.

Wang, J., Wan, Y. Z., Luo, H. L., Gao, C., & Huang, Y. (2012). Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique. *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 536-541

Wang, R. F., Xie, W. D., Zhang, Z., Xing, D. M., Ding, Y., Wang, W., ... & Du, L. J. (2004). Bioactive Compounds from the Seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67(12), 2096-2098.

Williams, D. B., Carter, C. B., Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). *The transmission electron microscope* (pp. 3-17). Springer Us.

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 675-682.

Y

Yenilmez, E. (2017). Desloratadine-Eudragit® RS100 nanoparticles: Formulation and characterization. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 148.

Yuan, Y., Kong, Z. Y., Sun, Y. E., Zeng, Q. Z., & Yang, X. Q. (2017). Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 75, 171–179.

Z

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., ... & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers*, 14(19), 4194.

Zahed, N., Kenari, R. E., & Farahmandfar, R. (2024). Evaluation of supercritical CO₂ extraction on color stability and antioxidant activity of nanoencapsulated anthocyanin extract of pomegranate peel powder. *Iranian journal of food science and industry*, 21(153).

Zahin, Maryam, Farrukh Aqil, et Iqbal Ahmad. 2010. « Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extracts ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 703 (2): 99–107.

Zaki, S. A., Abdelatif, S. H., Abdelmohsen, N. R., & Ismail, F. A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activities of pomegranate peels. *International Journal of Food Engineering*, 1(2), 73-76.

Zhao, L., Temelli, F., Curtis, J. M., & Chen, L. (2017). Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide. *Food research international*, 100, 168-179.

Zhu, C. P., Zhai, X. C., Li, L. Q., Wu, X. X., & Li, B. (2015). Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel. *Food Chemistry*, 177, 139-146.

Les références bibliographiques

Zhu, W., Mohammed, H. H. H., Dutta, K., & Li, C. (2020). Tannins inhibit SARS-CoV-2 through binding with catalytic dyad residues of 3CLpro: An in-silico approach with 19 structural different hydrolysable tannins. *Journal of food biochemistry*, 44(10), e13432.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Quantification, phytochemical evaluation, and identification of pomegranate yellow peel constituents using LC-MS/MS, the effect of the solvent extract on the antioxidant, in vitro anti-inflammatory, and antibacterial activities

Amina Boukezzoula^a, Djalila Boudemagh^{a,b,*}, Nadezhda Palko^c, Maria Grishina^c, Chawki Bensouici^d, Mahmoud Bounekhel^a, Ehab AlShamaileh^e, Saliha Dahamna^f

^a Multiphase Polymeric Materials Laboratory (LMPM), Emerging Materials, Setif 19000, Algeria

^b Emerging Materials Research Unit, Ferhat Abbas University Setif1, Setif 19000, Algeria.

^c Laboratory of Computational Modelling Drugs, South Ural State University, Chelyabinsk 454 080, Russia

^d Laboratory of Biochemistry, Biotechnology and Health Division, Center for Research in Biotechnology (CRBT), Constantine 25000, Algeria

^e Department of Chemistry, School of Science, The University of Jordan, Amman 11942, Jordan

^f Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, Faculty of Nature and Life Sciences, University Setif 1, 19000, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Yellow peel pomegranate
Antioxidant activity
Anti-inflammatory
Antibacterial activity
Phenolic compounds

ABSTRACT

Yellow pomegranate peel represents a promising source of bioactive compounds with potential therapeutic applications. This research focused on identifying the optimal solvent for extracting phenolic compounds from Algerian yellow pomegranate cultivars. Several antioxidant assays, including DPPH, GOR, CUPRAC, ABTS, reducing power, and phenanthroline, were employed to evaluate the extracts. Additionally, in vitro anti-inflammatory and antibacterial activities were assessed, complemented by in silico analyses. Molecular modeling explored the interaction between specific compounds (punicalagin- β , punicalagin- α , punicalin, gallic acid, and tannic acid) and various solvents. The study considered solvent effects using the MERA model and predicted biological activity and metabolism via CIS and CoMin algorithms. The aqueous extract exhibited remarkable antioxidant capacity, with notable IC₅₀ values in ABTS (7.05±0.12 µg/mL), CUPRAC (7.40±0.79 µg/mL), reducing power (16.00±4.02 µg/mL), and phenanthroline assay (10.23±1.95 µg/mL). Furthermore, the hydro-methanolic extract displayed superior antibacterial efficacy against selected bacterial strains, while the aqueous and methanolic extracts exhibited limited activity. These findings underscore the potential of yellow pomegranate peel as a source of bioactive molecules with significant antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial properties.

1. Introduction

Medicinal plants represent an inexhaustible source of bioactive compounds such as the pomegranate tree (*Punica granatum* L.) which is widely found in many regions including the Mediterranean basin, Middle East, Southern Asia, and Latin America. The pomegranate tree has a large consumption of pomegranate edible parts and generates substantial amounts, including peels, seeds, and flowers (Sood et al., 2015). Pomegranate peels, constituting approximately 50 % of the fruit's total weight (Çam et al., 2010) are considered a valuable

by-product, rich in secondary plant metabolites (Ali et al., 2019). Extracting these metabolites from pomegranate peel is crucial for their isolation and for studying their biological activity (Mahmoudi et al., 2013). According to Zhang et al. (2018), the effectiveness and selectivity of the extraction process are directly related to the quality of the extract. It is important to note that, as revealed in Altunkaya-Dinçay's (2014) research, the type of solvent employed during extraction significantly impacts the concentration of total phenols, which in turn affects the antioxidant activity. The extraction of bioactive compounds from pomegranate peel has been optimized by researchers (Masci et al.,

* Corresponding author at: Emerging Materials Research Unit, Ferhat Abbas University Setif1, Setif 19000, Algeria.

E-mail addresses: d.boudemagh@univ-setif.dz, djalila.boudemagh@gmail.com (D. Boudemagh).

¹ ORCID: 0000-0003-3876-0526

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118780>

Received 15 December 2023; Received in revised form 16 April 2024; Accepted 14 May 2024

Available online 1 July 2024

0926-6690/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

2016). However, there are no studies that but there are still few studies that specifically address the phenolic content of yellow pomegranate peel, particularly in Algerian cultivars. According to research conducted by Kumar et al. (2017), water, ethanol, and their combinations are considered the most effective food-grade solvents for extracting phenolic compounds from pomegranate peel. These solvents are particularly well-suited for applications involving products intended for human consumption. Pomegranate and its derived products are known for their abundance of phenolic compounds, such as anthocyanins, phenolic acids, flavonoids, and tannins (Russo et al., 2018). These compounds contribute to a range of pharmacological benefits, including antimicrobial, anti-aging, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic effects (El-Desouky et al., 2015). Numerous scientific studies have corroborated pomegranate's remarkable antioxidant activity, as evidenced by research conducted by Karthikeyan et al. (2019).

In this study, we aim to identify the constituents of yellow pomegranate peels from Algerian pomegranates. Our objectives include finding an appropriate solvent for extracting polyphenols as well as investigating and evaluating antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities using *in silico* methods, and finally assessing the total phenol content, total flavonoids, and total hydrolyzable tannins through high-performance liquid chromatography (HPLC)-linear ion trap mass spectrometry. Our ultimate goal is to establish an effective procedure for recovering phenolic compounds from pomegranate waste extracts, with a view of utilizing them as a source of antioxidants for food applications.

2. Material and methods

2.1. Preparation of dried pomegranate peels

The fruits were collected in Setif in the Northeast of Algeria, in September – October, 2017. The yellow pomegranate peels were manually separated and air-dried at room temperature for two months in the dark. The dried peels were then ground using a coffee grinder and sieved to obtain a uniform particle size of yellow peel and then stored for further analysis.

2.2. Preparation of extracts

For the extraction of polyphenols by maceration, we followed a protocol based on the method described by Çam et al., (2010) with slight modifications. Initially, 20 g of *Punica granatum* powder were weighed, and this powder was weighed and added to 200 mL of various solvents (methanol, 50:50 ethanol/water, distilled water). The mixture was then shielded from light and stirred continuously for 24 hours at room temperature. Following this maceration period, the extracts underwent different processing depending on the solvent used.

For methanol and ethanol/water extracts, the supernatants were concentrated under vacuum at 40 °C using a rotary evaporator. In contrast, the supernatant from the distilled water extraction was subjected to a lyophilization process for 72 hours. The resulting extracts were subsequently stored at 4 °C until further use.

2.3. LC-MS/MS (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) analyses

LC-MS/MS analyses were performed using UPLC-ESI-MS-MS Shimadzu 8040 Ultra-High sensitivity with UFMS technology and equipped with a binary bump Nexera XR LC-20AD.

The chromatographic analysis was performed as follows: five µL of 500 ppb sample was injected into Restek Ultra C18 3 µm 150×4.6 mm column using a 0.3 mL/min linear mobile phase gradient of eluent A (water, 0.1 % formic acid) and eluent B (methanol). The gradient elution procedure was as follows: 0.1 min to 1 min A 80 %, 1 min to 30 min A 20 %, 30 min to 40 min A 0 %, 40 min to 45 min A 0 %, 45 min to 60 min A 80 %. For the optimization of polyphenol standards, direct

injection without columns was used. The ESI conditions were as follows: CID gas, 230 KPa; conversion dynode, –6.00 Kv; DL temperature, 250 °C; nebulizing gas flow, 3.00 L/min; heat block, 400°C; drying gas flow, 15.00 L/min. Phenolic compounds were determined by analyzing their retention time (Rt) values and mass spectra as well as by comparison of the spectra with those of the available authentic standards. In cases where no authentic standards were accessible for specific compounds, their structural assignment was accomplished through a systematic exploration for molecular ions using extracted ion mass chromatograms. These chromatograms were subsequently compared to data available in the literature.

2.4. phenolic content (TPC)

The total polyphenol content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu reagent method, as described by Singleton and Joseph. (1965). In a microplate, 20 µL of each extract was added, along with 100 µL of diluted Folin-Ciocalteu reagent (1:10), and 75 µL of sodium carbonate solution (75 g/L). After incubating the mixture in darkness for 2 hours, the absorbance was measured at 765 nm using a microplate reader. The TPC is expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry extract.

2.5. Total flavonoids content (TFC)

The quantification of flavonoid content followed the method outlined by Topçu et al., (2007). In this procedure, a volume of 50 µL of the plant extract was incubated with 130 µL of methanol, 10 µL of CH₃COOH, and 10 µL of Al (NO₃)₂·9 H₂O for 40 minutes. Subsequently, the absorbance was measured at 415 nm and the results were then expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry extract.

2.6. Hydrolyzable tannins

Hydrolyzable tannins were determined by the method described by Çam et al. (2010). 1 mL of each extract diluted 10 times and 5 mL of 2.5 % KIO₃ are mixed and vortexed for 10 seconds. The absorbance of the resulting red-colored mixture was measured at 550 nm. The outcomes were expressed as milligrams of tannic acid equivalent per gram of dry extract.

2.7. Computational studies

Geometry optimization of punicalagin-β, punicalagin-α, punicalin, gallic acid, tannic acid and modeling of their complexes with water, ethanol, and methanol was performed using the MOPS algorithm in the combined force field MM3/MERA with a continual account of the solvent influence according to the MERA model demonstrated in (Potemkin, 2009b; Savkov, 2021). The prediction of biological activity and metabolism was performed using models based on the CiS and CoMin algorithms (Potemkin and Grishina, 2018).

2.7.1. Algorithm MOPS

The main idea of the MOPS method lies in the assumption that conformational changes in the structure occur because of vibrational movements (Potemkin, 2009a, 2019; Savkov, 2021). Therefore, the directions of atomic movements can be determined by solving the direct spectral problem, namely form the equation:

$$GFL = \Lambda A,$$

where F - matrix of force constants, the second derivatives of energy with respect to the coordinate, G - inverse mass matrix, Λ and L - eigenvalues and eigenvectors (vibrational modes) of the matrix $A = GF$. The elements of the diagonal Λ -matrix are the squares of vibrational, rotational and translational frequencies. L -Vector shows the direction of movement of atoms.

MOPS finds the most stable complex, which corresponds to the

minimum potential energy.

The following steps are used in MOPS.

1. The geometry of the initial complex is assumed. The energy of the initial complex is minimized.
2. Hessian of potential energy – F-matrix, Λ and L of the matrix $A=GF$ of complex are calculated.
3. The motion of atoms of the complex is carried out along vibrational modes. The movement stops when the nearest maximum potential energy is reached.
4. The maximum potential energy is overcome, then the energy of the complex is minimized in Cartesian coordinates.

The complex is preserved if the energy of the new structure is less than the energy of the original structure. Steps 2–4 are repeated for the lower energy structure.

The potential energy and F-matrix of the complexes were calculated using combined molecular mechanics (MM3) and MERA (Potemkin, 2009b) force field. Total energy of the complexes equals the sum of MM3 total energy (E_{MM3}) and MERA energy (E_{MERA}): $E_{total} = E_{MM3} + E_{MERA}$.

2.7.2. MERA model

MERA (Model of Effective Radii of Atoms) (Potemkin, 2009b, 2019; Savkov, 2021) is a nonparametric model. The main idea of the method: atoms are represented as expanding spheres. Neighboring spheres prevent the expansion of the atomic sphere. The expansion stops when the external and internal pressures in the atomic spheres are equalized.

The total interaction energy (E_{ij}) is calculated using Eq. (1).

$$E_{MERA} = \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i>j}^N E_{ij}, \quad E_{ij} = p_{ij} \left[-2U_{ij} \left(\frac{R_{ij}^e}{R_{ij}} \right)^6 + U_{ij} \left(\frac{R_{ij}^e}{R_{ij}} \right)^{12} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \right] \quad (1)$$

The contact probability (p_{ij}) was calculated using Eq. (2).

$$p_{ij} = \frac{n_{ij} S_i \exp(-E_{ij}/kT)}{1 + \sum_{i=1}^N \exp(-E_{ii}/kT)} = \frac{n_{ij} S_i \exp(-E_{ij}/kT)}{1 + \sum_{i=1}^N \exp(-E_{ii}/kT)} \quad (2)$$

where U_{ij} is the depth of the potential; R_{ij}^e is the equilibrium distance; q_i and q_j are the charges of the atoms i and j ; ϵ_0 is the vacuum permittivity; n_{ij} is a coordination number of i th atom with respect to the j th atom; S_i is the solvent accessible area of the i th atom.

2.7.3. 3D QSAR algorithms CiS and CoMin

3D QSAR algorithm Cinderella's Shoe (CiS) (Potemkin and Grishina, 2008, 2018) classifies structures based on molecular exterior (molecular field) represented as the sum of Coulomb and van der Waals potentials determined on molecular surface. Then the parameters of pseudo-receptor (the set of atomic spheres with radii and charges) are determined using principle of complementarity. The use of a self-consistent field makes it possible to obtain the optimal arrangement of compounds in the pseudo receptor (the energy is constant, the forces of intermolecular interactions are equal to zero). The interaction energies, forces, force constants of molecules with the pseudo receptor are descriptors of the algorithm.

3D QSAR algorithm CoMin (Continual Molecular Interior analysis) classifies structures based on the molecular interior (quantum functions, e.g. distribution of electronic density, "atomic matter", potentials, etc. (Potemkin et al., 2008, 2018)). The algorithm superimposes the structures of the training data set. The process is performed until the minimum difference in quantum functions at the junctions of the generalized lattice is reached for all molecules of the dataset. The values of the quantum functions at the junctions are descriptors of the algorithm.

Then either the linear reaction neural network (LNN), or neural network with sigmoid neurons (NNSN), or linear regression model

(LRM) are used to find the relationships between biological activity and CiS or CoMin descriptors. Then the biological activity (BA) value is converted to a probability (p) using a desirability function $p = \exp(-\exp(a-b \times BA))$ (Potemkin et al., 2008).

To predict the biological activity of molecules from a predicting dataset, molecules are oriented in a pseudo receptor (CiS) or superimpose to the generalized lattice (CoMin). Then, descriptors are computed and bioactivity is predicted using previously found models.

2.8. Antioxidant activity

2.8.1. DPPH• free radical-scavenging assay

The evaluation of antioxidant activity in the extracts using the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical was conducted following the method outlined by Blois, (1958), employing various concentrations. 40 μ L of each extract were added to 160 μ L of DPPH• solution (0.06 mg/mL) prepared in methanol. The negative control was prepared by replacing the extracts with 40 μ L of methanol while BHA was used as a standard. After 30 min of incubation in darkness, the absorbance was measured at 517 nm. The percentage of DPPH• radical scavenging activity of each sample was calculated as follows:

$$\text{DPPH}\bullet \text{ scavenging effect (\%)} = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

$A_{Control}$ is the absorbance of the blank and A_{Sample} is the absorbance of the positive control or sample.

Results were established as 50 % inhibition concentration (IC_{50} = μ g/mL) which means that sample concentration provides 50 % activity.

2.8.2. ABTS+ scavenging activity

The scavenging activity of the extracts against the free radical ABTS⁺ (2, 2'-azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) was assessed according to the method described by Re et al. (1999). To prepare the ABTS⁺ cation solution, 2.45 mM of potassium persulfate was added to a 7 mM ABTS solution in water. This mixture was then incubated in darkness at room temperature for 12 hours, and the absorbance was adjusted using H₂O to reach a value of 0.700 ± 0.020 at 734 nm.

Next, 160 μ L of the previously prepared ABTS⁺ solution were added to 40 μ L of the sample and standards in triplicate. For the negative control, the extract was replaced with methanol, while BHT and BHA were used as standards. All mixtures were incubated at room temperature for 10 minutes. The absorbance was subsequently read at 734 nm, and the percentage of inhibition was calculated using the following formula:

$$\text{ABTS}^+ \text{ scavenging effect (\%)} = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

$A_{Control}$ is the absorbance of the blank and A_{Sample} is the absorbance of the positive control or sample.

Results were established as 50 % inhibition concentration (IC_{50} = μ g/mL) which means sample concentration providing 50 % activity.

2.8.3. Gor assay (galvinoxyl free radical) (GOR•)

The galvinoxyl free radical scavenging activity (GOR•) of our three extracts was evaluated following the method outlined by Noguchi et al., (2001). To perform this assay, 40 μ L of various concentrations of the three extracts were combined with 160 μ L of a 0.1 mM methanolic solution of galvinoxyl. The negative control was determined by substituting the extract with methanol, while BHT was employed as the standard. These mixtures were then incubated for 120 minutes in the absence of light at room temperature. Subsequently, the absorbance was measured at 428 nm.

The following equation was used to calculate the scavenging of galvinoxyl radical:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

2.8.4. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

For the cupric reducing antioxidant capacity, we followed the method described by Apak et al. (2004). 50 μ L of CuCl₂ (10 mM) solution were mixed with 50 μ L of the neocuprine solution (7.5 mM), along with 60 μ L of ammonium acetate buffer solution (NH₄Ac, 1 M, pH = 7.0) and 40 μ L of different concentrations from the three extracts.

The extracts were replaced by methanol for the negative control where butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as standards. The samples were incubated for 1 hour in a dark place. The absorbance was measured at 450 nm and the results were expressed as A_{0.5} (μ g/mL), which signifies the concentration at which the absorbance reaches 0.5 units.

2.8.5. Reducing power assay

The reducing power FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) was realized following the method described by Oyaizu et al., (1986) which comprised two phases. Before incubation, we mixed a volume of 10 μ L from a sample at various concentrations was mixed with 40 μ L of phosphate buffer solution (0.2 M, pH 6.6), as well as 50 μ L of potassium ferricyanide solution K₃Fe (CN)₆ (1 %, w/v) This mixture was then incubated for 20 minutes at 50° C. After, 50 μ L of trichloroacetic acid (TCA, 10 %), 40 μ L of distilled water, and 10 μ L FeCl₃ solution (0.01 % w/v) were added to the incubated mixture. Ascorbic acid, Tannic acid, and α -Tocopherol were used as a positive control at different concentrations. The absorbance was measured at 700 nm against the blank (methanol).

2.8.6. Phenanthroline assay

The phenanthroline assay was evaluated by the method of Szydłowska-Czerniak et al. (2008). 10 μ L of the three extracts at different concentrations were mixed with 50 μ L of FeCl₃ (0.2 %), 30 μ L of phenanthroline (0.5 %), and 110 μ L of methanol. For the negative control, methanol was used, while for the positive control butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were used. These mixtures were then incubated for 20 minutes at 30 °C. After incubation, the absorbance was measured at 510 nm. The results were expressed as A_{0.50}, which signifies the concentration at which the absorbance reaches 0.5 units.

2.9. In vitro anti-inflammatory effect of the extracts

The *in vitro* anti-inflammatory effect of the extracts was determined using the bovine serum albumin (BSA) denaturation inhibition test according to protocol described by Hamoudi et al. (2021). Briefly, 500 μ L of 0.2 % bovine serum albumin (BSA) previously prepared in a tris-HCl buffer (20 mM, pH 6.8) was added to 500 μ L of different concentrations of extracts or aspirin (10 mg/mL). This mixture was incubated at 37 °C for 20 min and then at 65 °C for 10 min. After cooling, the absorbance was measured at 660 nm, and the percentage inhibition is calculated using the following equation:

$$\text{Percentage Inhibition (\%)} = [A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}] / A_{\text{Control}} * 100$$

2.10. Antibacterial activity assessment

For the antibacterial activity assessment, the Well Diffusion Method was employed. Muller Hinton agar medium plates were seeded with 18–24-hour-old cultures of microbial inoculum with 0.08–0.1 optic density. The wells (6 mm in diameter) were cut into the agar media with sterilized pipette tips and then plant extracts in 50 μ L volume were poured into the wells. Inoculated plates were then incubated at 37 °C for 24 h and zones of inhibition were measured in mm. Three replicates were prepared for each microorganism. The Gram-positive food contaminant/pathogenic bacteria used in this study included

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, and the gram-negative were *Escherichia coli* ATCC 7839, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3. Statistical analysis

The data were recorded as means \pm standard deviation based on three measurements. To analyze the variance and determine significant differences between the means, a one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted. Significant differences between means were assessed using the Tukey's test, where *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

4. Results and discussion

4.1. Extraction yield

The maceration of pomegranate yellow peel powder by water, methanol, and ethanol/water (50:50) gave a deep brown color extract. The yield in different extracts is shown in Table 1 where hydroethanolic extract had the highest extraction yield (50.62 %) followed by methanolic (36.5 %) and aqueous extract (30.4 %). This variation is attributed to differences in the polarity of solvents and solubility of plant powder in different solvents. The trend of the obtained results are in agreement with those found by Hettiarachchy et al., (2014) where the total pomegranate peel extracted with ethanol/water (50:50) gave the highest yield (16.28 %) followed by methanol (about 10 %) then water extract (5.74 %), which gave the lowest yield. The extraction yield values were significantly higher than those reported by Hettiarachchy et al. (2014). This large difference may be attributed to the different pomegranate type (Ganesh variety from India vs. Algerian), preparation of pomegranate peel powder and extraction conditions. Besides, the founded results confirm those of Zaki et al. (2015) where the yield of methanol extract of the two varieties, which namely Manfalouty and Wardey, was higher than the yield of water extracts. In a study by Abid et al. (2017), pomegranate peel extracted with water gave the highest total extract yield followed by ethanol and acetone for the four ecotypes of pomegranate used related to the hydrosolubility of the majority of compounds.

Table 1

List of phenolic compounds by HPLC in the three extracts tested compared to authentic standards.

ID#	Name	Ret. Time (min)	% Area		
			Aqueous extract	Methanolic extract	Hydro-ethanolic extract
1	Thymol	0.951	0,00	0,00	0.2026
2	Coumaric acid	1.349	0,00	17.00	88.6907
3	Maleic acid	1.813	0,00	0.14	0.0279
4	Caffeic acid	6.057	0,00	0,00	0.0002
5	Vanillin	8.403	0.7	0.58	0.0100
6	Chrysin	21.85	3.5	1.23	0.3208
7	Quercetin	22.97	1.4	0.97	0.1444
8	Viniferin	23.891	0.0	0.01	0.0011
9	Chlorogenic acid	32.522	2.6	1.97	0.3418
10	Beta carotene	32.656	0.3	0.10	0.0106
11	Hesperitin	37.771	0.1	0.10	0.0198
12	Folic acid	38.528	2.7	6.88	1.0114
13	Rutin	40.531	16.4	11.07	0.9561
14	Hydroxy comarin	47.835	0.2	0.09	0.0128
15	Maleic acid	47.534	72.1	59.80	8.2428
16	Naringenin	47.723	0.1	0.05	0.0070

4.2. Characterisation of phenolic compounds by LC-MS

Pomegranate peel is known for its rich polyphenol content and to elucidate their structures, an analysis of the three extracts was conducted using UPLC-ESI-MS-MS to identify various phenolic compounds. Specifically, polyphenols and flavonoids were examined in the three extracts using twenty two authentic standard by comparisons of the retention times, sixteen of this polyphenols and flavonoids were identified and the results are expressed as percentages relative to the total extracted compounds, as summarized in Table 1.

In both the aqueous and methanolic extracts, maleic acid (47.534 min) accounted for the highest area percentages, at 72.1 % and 59.80 %, respectively. However, in the hydro-ethanolic extract, it constituted only 8.2428 % of the total. Conversely, the hydro-ethanolic extract exhibited the highest area for coumaric acid (1.349 min) at 88.6907 %, while in the methanolic extract, it represented 17.00 % and was not detected in the aqueous extract. Rutin (40.531 min) was found at 16.4 %, 11.07 %, and 0.9561 % in the aqueous, methanolic, and hydro-ethanolic extracts, respectively. Folic acid (38.528 min)

represented areas of 6.88 %, 2.7 %, and 1.0114 % in the methanolic, aqueous, and hydro-ethanolic extracts, respectively.

Chlorogenic acid (32.522 min) also exhibited significant areas in the methanolic, aqueous, and hydroethanolic extracts, at 2.6 %, 1.97 %, and 0.3418 %, respectively. However, compounds such as Lawson, kaempferol, ascorbic acid, salicylic acid, and ferulic acid were not detected in any of the three extracts, while caffeic acid (6.057 min) and thymol (0.951 min) were only detected in the hydro-ethanolic extract, at 0.0002 % and 0.2026 %, respectively. An unexpected finding was the absence of Gallic acid in all three extracts, despite its recognition as the major bioactive compound in pomegranate peel, as reported by (El-Hadary et al.,2020). Our findings align with those of (Balaban et al., 2022), who also did not detect gallic acid in any of the extracts, as determined by both TLC and HPLC analyses. In contrast, maleic acid was detected in pomegranate peel through HPLC analysis.

Several compounds, including vanillin (8.403 min), chrysin (21.85 min), quercetin (22.97 min), viniferin (23.891 min), beta carotene (32.656 min), hesperitin (37.771 min), hydroxy coumarin (47.835 min), and naringenin (47.723 min), were detected in all three

Table 2
HPLC-ESI-MSMS analysis of the pomegranate yellow peel extract.

peak	R t	[M+H] ⁺	Ms ²	Identification	Aqueous extract	Methanolic extract	Hydro-ethanolic extract
1	1.053	303	165 181 215 247	Ellagic acid	+	-	+
2	19.994	702	340 362 680	Not identified	+	-	+
3	21.323	815	419 455 181	(epi)gcat-cyd-3,5-dihexoside	+	-	+
4	22.365	475	181 227 321	Ellagi acid- deoxyhexoside	+	+	+
5	24.696	365	317 352	Not identified	+	-	-
6	26.147	274	274	Genistein	+	+	+
7	26.854	290	246 179	Epi catechine	+	+	+
8	28.514	331	299 181	galloyl-hexoside	+	-	-
9	30.323	617	181 383 301	dihydrogalloyl-HHDP-hexo	+	-	-
10	33.596	635	181 365 280	galloyl-HHDP-Hexoside	+	-	+
11	33.668	677	365 185 280	Ticaffeoylquinic acid	-	+	-
12	34.077	855	181 331 713 809	Not identified	-	-	+
13	34.206	898	181 331 758 589	(epi)cat-cyd-3,5-dihexoside	-	+	-
14	35.292	684	363 379 595 639 181	Caffeic acid glycoside dimmer	+	+	+
15	36.371	1046	181 302 473 869	Not identified	-	-	+
16	36.495	1085	186 339 399 517 1002	HHDP-gallagyl-hexoside(Punicalagin α)	-	+	-
17	37.545	684	415 353	Caffeic acid glycoside dimmer	+	+	+
18	38.471	804	413 390 323	Gallotannin	+	+	+
19	39.298	740	381 398	Not identified	+	+	+
20	39.646	751	407 181 363	Not identified	-	-	+
21	39.835	595	412 306 284 181	kaempferol-3-O-rutinside	+	+	+
22	40.516	1101	541 1085	Punicalin derivati	+	+	+
23	41.715	1085	510 185	Digalloyl-galloyl-hex Punicalagin B	+	+	+
24	42.976	1023	911 664 688	Not identified	+	-	+
25	43.424	985	227 489 537	Not identified	-	-	+
26	43.463	1005	537	Not identified	-	+	+
27	44.000	1059	607	Not identified	-	-	+
28	47.970	409	377 279 250 181	Not identified	+	+	+
peak	R time	[M-H] ⁻	Ms ²	Identification	Aqueous extract	Methanolic extract	Hydro-ethanolic extract
29	1.067	519	378 331 273 211	ellagic acide der	+	+	+
30	15.907	1532	359	Not identified	+	-	-
31	19.984	785	741 723 249 205	digalloyl -HHDP-hexoside (pedunculagin)	+	+	+
32	32.626	515	205 347 265	feuric acid der	+	+	+
33	34.705	379	311 232	Unknown	+	+	+
34	35.276	339	339	p-coumaric acid glucuronide	+	-	+
35	36.310	393	249 325	digalloyl-HHDP-hexoside (Ellagic acid der)	+	-	+
36	36.975	393	249 218 325	digalloyl-HHDP-hexoside	+	-	-
37	37.543	1493	667	Not identified	+	+	+
38	37.797	407	339 277 205	Not identified	+	-	-
39	38.022	1485	217	Not identified	-	+	-
40	38.580	861	225 799 725	procyanidine trimer A	+	+	-
41	39.276	1381	723	Not identified	-	-	+
42	40.020	1542	1027	Not identified	+	+	+
43	48.094	701	305 633 571	Di-HHDP-Galloloylglucose)-pentose	+	+	+
44	49.384			Not identified	+	-	-
45	49.952			Not identified	+	-	-
46	50.012	1578	233	Not identified	-	-	+
48	51.352	1578	233	Not identified	-	-	+

extracts, albeit with minimal area percentages. The presence of these compounds such as chlorogenic, vanillin, rutin, quercetin, naringenin and hesperitin in pomegranate peel confirms earlier findings in the study by El-Hadary et al. (2020).

Many authors proved the presence of this different phenolic compounds in pomegranate fruits by HPLC analysis, Ali et al. (2014) study confirmed the presence of the chlorogenic acid, coumaric acid, rutin, in pomegranate peel methanolic extract also, Cai et al. (2004) and Mansour et al. (2018) revealed the presence of quercetin and vanillic acid in pomegranate peel.

The significant differences in area percentages of the same components across different extracts can be attributed to variations in solvent polarity, which impacts their solubility, as previously suggested by Balaban et al. (2022).

After analyzing the mass spectra, a total of 48 phenolic compounds were detected. Out of these, tentatively 25 compounds were identified and classified them into distinct classes, as summarized in Table 2. These phenolics can be categorized as follows: 14 are hydrolyzable tannins, 5 are phenolic acids, 3 are flavonoids, 2 are anthocyanins, and 1 is proanthocyanin. These results are resumed in Table 2 and represented in the chromatograms in Fig. 1.

4.2.1. Hydrolysable tannins

C1 (1053 min) exhibits a molecular ion at 303 m/z with fragment ions at 165, 181, 215 and 247 m/z , according to Gosset-Erard et al. (2021), C1 characterized as ellagic acid. C4 (22.365 min) with a molecular ion at 475 m/z and fragment ions at 181, 227 and 321 m/z was also identified as Ellagic acid-deoxyhexoside as reported in different studies (Feng et al., 2023). C8 (28.514 min) generated a molecular ion at 331 m/z , along with fragment ions at 299 and 181 m/z , establishing its identity as galloyl-hexoside based on results from various studies (Russo et al., 2018). Similarly, C9 (30.323 min) and C10 (33.596 min) were identified as galloyl hexoside derivatives.

C9 exhibited a molecular ion at 617 m/z and fragments at 181, 301, and 383 m/z , a result in line with Fischer et al., (2011) study; while C10 produced a molecular ion at 635 and fragments at 181, 365, and 280 m/z , consistent with findings from several studies (Feng et al., 2023), from the data, C9 and C10 can be identified as galloyl-HHDP-Hexoside derivatives. C16 (36.495 min) and C23 (41.715 min) were identified as Punicalagin derivatives, characterized by a molecular ion at 1085 and a common fragment at 185. Specifically, C16 was identified as Punicalagin a, and C23 as Punicalagin b. These compounds, vital and abundant in pomegranate fruit, have been widely reported in numerous studies (Russo et al., 2018). C18 (38.471 min) was identified as gallo tannin due to its molecular ion at 804 m/z , a finding consistent with (Sentandreu et al., 2013) report. They also noted that the punicalin derivative produced a molecular ion at 1101 m/z , corresponding to C22 (40.516 min) in our study. Notably, the former compound was detected in positive mode, while the latter was detected in negative mode. C29 (1.067 min), characterized by a molecular ion at 519 m/z and fragment ions at 378, 331, 273, and 211 m/z , was identified as an ellagic acid derivative, corroborating findings from Al-Rawahi et al. (2013).

C31 (19.984 min) was identified as digalloyl-HHDP-hexoside (pedunculagin), producing a molecular ion at 758 and fragmenting at 741, 723, 249, and 205, an identification supported by studies such as (Liu et al., 2018). C35 (36.310 min) and C36 (36.975 min) shared the same molecular ion at 393 m/z , along with fragmentations at 249 and 325 m/z , signifying them as digalloyl-HHDP-hexoside (Ellagic acid derivatives), consistent with Parisi et al.'s (2022) findings. C43 (48.094 min), with a molecular ion at 701, corresponded to Di-HHDP-Galloyl glucose-pentose, as reported by Aguilar-Zarate et al. (2017). To summarize, C4, C18, C22, C23, C29, and C43 were found in all extracts. C1, C10, C31, and C35 were present in both aqueous and hydroethanolic extracts, while C8, C9, and C36 were exclusively found in aqueous extracts. C16 was identified only in the

methanolic extract.

4.2.2. Phenolic acids

Five phenolic acids are identified in the extracts. In the positive ionization mode, compound C11 (33.668 min) displayed a molecular ion at 677 and fragmentation ions at 365, 185, and 280. These characteristics are consistent with those of T-caffeoylquinic acid, as previously reported by Kramberger et al. (2020). Both C14 (35.292 min) and C17 (37.545 min) produced the same molecular ion at 684. According to (He et al. in (2011), these compounds are likely caffeic acid glycoside dimers. The presence of this compound is confirmed by the results of the HPLC analysis using the authentic standards. In the negative ionization mode, compound C32 (32.626 min) was identified as a ferulic acid derivative, as described by He et al. in 2011. It exhibited a molecular ion at 515 m/z and fragments at 205, 347, and 265 m/z . Finally, compound C34 (35.276 min) exhibited a molecular ion at 339, which corresponds to p-coumaric acid glucuronide, as reported by Al-Rawahi et al. (2013). It is important to note that all identified phenolic acids were present in the three extracts, with the exception of compound C34, which was absent in the methanolic extract.

4.2.3. Flavonoids

C6, C7 and C21 represent the flavonoids identified in our extracts, C6 (26.147 min) with 274 m/z as a molecular ion is identified as genistein (Man et al., 2022). C7 (26.854 min) exhibited a molecular ion at 290 m/z and fragmentation ions at 246 and 179 m/z , it is identified as Epi catechine which is mentioned in many studies as (Taleghani et al., 2021; Russo et al., 2018). While C21 (39.835 min) produced a molecular ion at 595 m/z and fragmentations at 412, 306, 284 and 181 m/z which is correspond to kaempferol-3-O-rutnside (Feng et al., 2022). The identified flavonoids are detected in positive mode and existing in the three extract.

4.2.4. Anthocyanins

Only two anthocyanins are identified in the extracts under study in the positive mode which are C3 (21.323 min) and C13 (34.206 min). Compound C3 displayed a molecular ion at 815 m/z and fragmentation ions at 419, 455, and 181 m/z . This compound has been identified as (epi)gcat-cyd-3,5-dihexoside, as reported by Sentandreu et al. (2013) which is present in both aqueous and hydro-ethanolic extracts. C13 corresponds to (epi)cat-cyd-3,5-dihexoside (Sentandreu et al., 2013) with a molecular ion at 898 m/z and fragmentations at 589, 758, 331 and 181 m/z . Notably, this specific compound was exclusively detected in the methanolic extract.

4.2.5. Pro-anthocyanidine

In the negative mode, within both the aqueous and methanolic extracts, compound C40 (38.580 min) was identified as procyanidin trimer A. This identification is based on its molecular ion at 861 and fragmentations at 225, 799, and 725. Procyanidin trimer A has been reported in several studies, including those by Ambigaipaijan et al. (2016).

The mass spectroscopy and chromatographic analyses revealed that ellagic acid der C29 is the predominant compound in all three extracts, constituting 29.024 %, 41.346 %, and 33.545 % of the area percentage in the Aqueous, Methanolic, and Hydro-ethanolic extracts, respectively. Additionally, Punicalagin b emerged as another major constituent, accounting for 16.835 %, 3.823 %, and 18.956 % in the Aqueous, Methanolic, and Hydro-ethanolic extracts, respectively. Notably, ellagic acid C1, punicalin derivative C22, and ellagic acid derivative C35 were also identified as significant compounds across all extracts. The present data are confirmed by Abid et al. (2017), and Russo et al. (2018). where their phytochemical analysis revealed a high content of ellagitannins with punicalagin derivatives as the major compounds.

These compounds, belonging to the class of hydrolysable tannins, collectively underscore the prevalence of hydrolysable tannins as the most abundant polyphenols in pomegranate yellow peel.

4.3. Total phenolic, total flavonoid and total hydrolysable tannins

An assessment of the phenolic, hydrolysable tannin, and flavonoid content in pomegranate peel extracts were determined, and the results are presented in Table 3. The total phenolic content in the methanol extract was the highest, measuring at 259.37 ± 13.66 mg GAE/g. Following that, the water extract yielded 205.58 ± 8.21 mg GAE/g, while the hydro-ethanolic extract had the lowest value at 166.84 ± 43.60 mg GAE/g. A prior study by Negi and Jayaprakasha, (2003) reported a higher TPC value of 460 mg (+) - catechin/g for methanolic pomegranate peel, but a lower value of 140 mg (+) - catechin/g for the aqueous extract compared to our findings. In contrast, El falleh et al. (2012) reported lower TPC values for both methanolic and aqueous extracts, at 85.60 ± 4.87 GAE mg/g and 53.65 ± 4.13 GAE mg/g, respectively. Another study by Wissam et al. (2012) found that water extracts had the highest total polyphenol yield, followed by 50 % ethanol. Furthermore, the flavonoid content in extracts investigated here was relatively lower as compared to the phenolic content. The hydro-ethanolic, methanolic, and aqueous extracts had flavonoid values of 64.19 ± 11.38 mg QE/g, 63.20 ± 10.02 mg QE/g, and 51.35 ± 22.15 mg QE/g, respectively. These values exceeded those reported by Çam et al. in (2010), who found 18.1 ± 0.5 mg CE/g for methanol and 6.2 ± 0.2 mg CE/g for water extracts. Similarly, the total flavonoid content in the methanolic extract tested by Shabbir in (2018) was lower than results presented here.

Considering that hydrolysable tannins are the dominant phenolics in pomegranate peel, their content was quantified for each solvent. The methanolic extract had the highest hydrolysable tannin content at 221.32 ± 0.00 mg TAE/g, followed by the hydro-ethanolic extract at 187.22 ± 0.00 mg TAE/g, and the aqueous extract at 149.44 ± 0.00 mg TAE/g. These results are slightly lower than those reported by Galaz et al., (2017), who found 305.5 ± 17.4 mg TAE/g. Additionally, Çam et al. (2010) reported values of 260.2 ± 12.6 mg TAE/g for methanolic and 82.6 ± 5.6 mg TAE/g for aqueous extracts.

The results demonstrate that methanol yielded the highest values for total polyphenols, flavonoids, and hydrolysable tannins, consistent with findings from Jalili et al., (2020), and Çam et al. (2010). However, Jalil et al. (2018) reported no significant difference between water and methanol extracts in the extraction of pomegranate peel phenolics. These variations may be attributed to differences in extraction conditions, solvents used, and the potential influence of cultivar maturity and geographic origin. Total polyphenol levels tend to increase during the early stages of skin growth but often decrease as maturation progresses, as observed in studies by Kharchoufi et al. (2018). In summary, the results presented highlight that phenolic content predominates over flavonoids, with hydrolysable tannins accounting for around 90 % of the phenolic content of pomegranate peel. These results are confirmed by the lc ms ms data, where the most identified components (19 components) in yellow pomegranate peel are hydrolysable tannins and phenolic acids.

Table 3
Extraction yield, total phenolics, total flavonoids and total hydrolysable tannins of aqueous, methanolic and hydro-ethanolic extract.

Extract	Yield %	Total phenolics (mg GAE/g)	Total Flavonoids (mg QE/g)	Total hydrolysable tannins (mg TAE/g)
Aqueous	30,4	205.58 ± 8.21^{ab}	51.35 ± 22.15^a	$149.44 \pm 0,00^c$
Methanolic	36,5	259.37 ± 13.66^a	63.20 ± 10.02^a	$221,32 \pm 0,00^a$
Hydro-ethanolic	50,62	166.84 ± 43.60^b	$64,19 \pm 11.38^a$	$187,22 \pm 0,00^b$

Values in the same column not showing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

4.4. Modeling of complexes

4.4.1. Modeling of complexes

Modeling of punicalagin- β , punicalagin- α , punicalin, gallic acid, tannic acid and modeling of their complexes with water, ethanol, methanol was carried out and gave the following results. Gallic acid forms hydrogen bond with water with length of contact 1.98 Å (Fig. 2(A)). Punicalagin- β (Fig. 2(B)) and punicalagin- α (Fig. 2(C)) interact with water forming two hydrogen bonds with intermolecular distances 2.02 Å, 2.14 Å and 2.03 Å, 2.14 Å, respectively. Punicalin (Fig. 2(D)), like gallic acid, forms an interaction with the length of contact 1.99 Å. The complex of tannic acid with water (Fig. 2(E)) has two hydrogen bonds with lengths 1.99 Å and 2.00 Å. In the complex of punicalagin- β with ethanol, as well as in the complex with water, the formation of two hydrogen bonds is observed, however, in this case, the intermolecular distance is 2.09 Å and 2.66 Å. Similarly, punicalagin- β interacts with methanol, two hydrogen bonds are formed with a distance of 2.09 Å and 2.66 Å. In the complex of tannic acid with methanol, one hydrogen bond is formed with a contact length of 1.99 Å. A similar value is observed in the complex of tannic acid with water.

4.4.2. Analysis of energy characteristics of the complexes

Analysis of the total energies of the complexes calculated by the MERA method showed that more stable complexes are formed between gallic acid, punicalagin- β , punicalin, tannic acid and ethanol, followed by complexes with methanol and water (Table 4.). In the case of punicalagin- α , the most advantageous complex is formed with ethanol, followed by water and methanol. This behavior of punicalagin- α in solvents does not significantly change the situation when considering a mixture of compounds. Thus, from an energetic point of view, ethanol is the best solvent for extracting yellow pomegranate peel, methanol is less efficient, followed by water, which agrees very well with experimental data.

4.4.3. Prediction of biological activity and metabolism using CiS and CoMIn algorithms

For the studied compounds, the probabilities of antioxidant, anti-bacterial activity and metabolism were calculated. Biological activity ranges from 0 to 1, where 0 is a very low probability of biological activity, 1 is a very high probability of biological activity. The predicted biological activity is presented in Table 5.

Analysis of the results showed that some of the studied compounds are characterized by a high (0.7–1) or moderate probability (0.4–0.6) of biological activity, other compounds have a low probability (0–0.3).

Due to the fact that the analysis of antioxidant activity is carried out from solutions, and also due to the fact that the structures form strong hydrogen bonds with solvents, the probabilities of biological activity for complexes with water, ethanol, and methanol were calculated. The probability of biological activity of the complexes depends on the solvent. Complexes of gallic acid with ethanol and methanol have a high probability of antioxidant activity of 0.95 and 0.74, and complex with water has a low probability of 0.30. Complexes of punicalagin- β and punicalagin- α with ethanol are characterized by the highest value of biological activity (0.90 and 0.87). The complex of punicalagin- β with water (0.70) and the complex of punicalagin- α with methanol (0.77) also have a high probability of antioxidant activity. The complex of punicalin with water is characterized by high biological activity (0.82), while the complex with methanol shows a moderate probability of 0.41, and the complex with ethanol has a probability of 0. Tannic acid has the best antioxidant activity in combination with methanol (0.67), a lower probability value is observed in combination with ethanol (0.50), then with water (0.44). Since the determination of experimental biological activity is carried out for an extract containing a mixture of compounds, we determined the average value of the probability of biological activity for a mixture of complexes. It has been established that mixtures of complexes with ethanol and methanol are characterized by almost equal probability (0.64 and 0.65) of biological activity, a lower value of

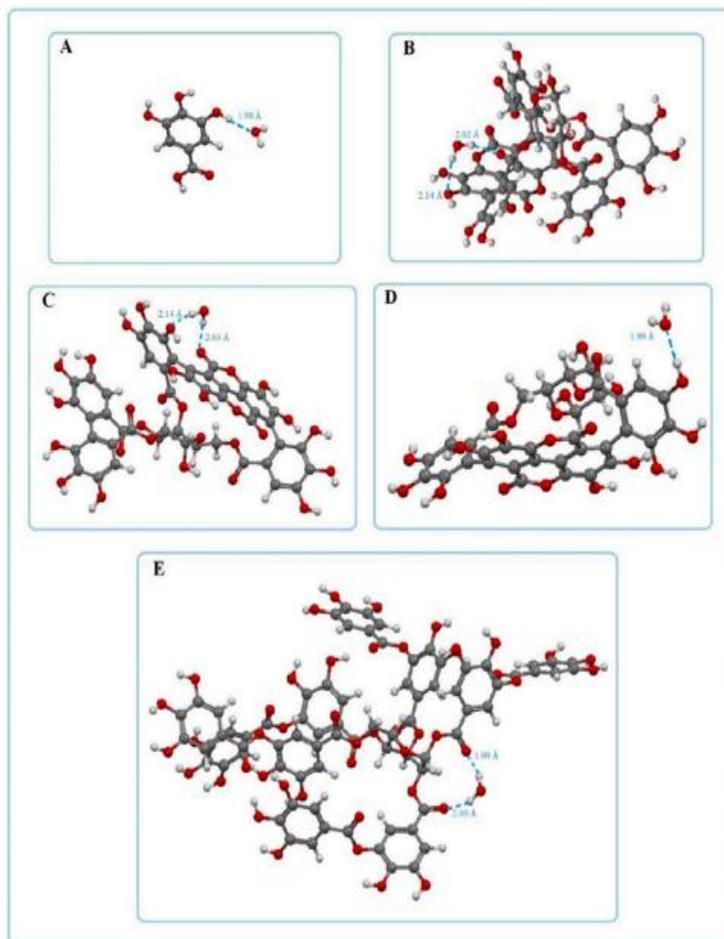


Fig. 2. Structure of complexes of gallic acid (A), punicalagin- β (B), punicalagin- α (C), punicalin (D), tannic acid (E) with water.

Table 4

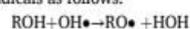
Total energy (E, kJ/mol) complexes of gallic acid, punicalagin- β , punicalagin- α , punicalin, tannic acid with ethanol, water and methanol.

Compound	E, kJ/mol		
	EtOH	H ₂ O	MeOH
Gallic acid	-423.76	-359.16	-381.04
punicalagin- β	-2049.69	-2011.34	-2021.99
punicalagin- α	-2086.66	-2046.63	-2037.56
Punicalin	-1641.19	-1514.84	-1597.77
tannic acid	-3364.64	-3257.36	-3276.92

antioxidant activity (0.55) is observed for complexes with water.

Analysis of pharmacophore, ballast and antipharmacophore fragments of the complexes showed that in the case of the most active of them (for example, "gallic acid - EtOH", "punicalagin- β -EtOH", "punicalagin- α -EtOH", "punicalagin-H₂O") at least either 3 OH groups (including the OH group of the COOH fragment) of the complexes, or aromatic ring atoms associated with OH groups, have a pharmacophoric effect on AOX, while other less active complexes have either fewer OH groups in the pharmacophore zone, either these groups have a less pronounced pharmacophore effect, or OH groups constitute predominantly the ballast part of the phytocomponent. It is well known that OH groups, e.g. OH groups of vitamin E described in (Li, 2010), play a very

important role in antioxidant activity; they can interact with OH• free radicals as follows:



OH groups attached to an aromatic ring are particularly active because the conjugated radical system is very stable due to the distribution of the free electron throughout the aromatic system.

In addition, a characteristic feature of the most active complexes is the interaction of the solvent with the O of OH groups of the pharmacophore with the formation of a hydrogen bond and subsequent possible stabilization of the RO• radical (Fig. 3-a).

In the case of less active complexes, the solvent forms hydrogen bonds with the oxygen of the CO group, which does not have hydrogen to interact with the OH• radical (Fig. 3-b).

Analysis of antibacterial activity showed that the complex of tannic acid with ethanol has a high probability value (0.91), while the complexes with water and methanol are characterized by a moderate probability of 0.47 and 0.37, respectively. Gallic acid is more active in complex with ethanol (0.57), less active in complex with methanol (0.53) and water (0.22). Complexes of punicalagin- β and punicalin with methanol have high probabilities of antibacterial activity (0.76 and 0.67), complexes with ethanol are characterized by moderate activity (0.44 and 0.38), complexes with water are characterized by a low probability (0.33 and 0.21). For the complexes with water, the highest probability of antibacterial action is observed for punicalagin- α (0.54).

Table 5
Predicted probabilities (P) of metabolism (M), antibacterial activity (AB), antioxidant activity (AOX) for the studied compounds.

BA	Solvent	P					average P
		gallic acid	punicalagin- β	punicalagin- α	Punicalin	Tannic acid	
AOX	EtOH	0.95	0.90	0.87	0	0.50	0.64
	H ₂ O	0.30	0.70	0.49	0.82	0.44	0.55
	MeOH	0.74	0.66	0.77	0.41	0.67	0.65
AB	EtOH	0.57	0.44	0.03	0.38	0.91	0.47
	H ₂ O	0.22	0.33	0.54	0.21	0.47	0.35
	MeOH	0.53	0.76	0.48	0.67	0.37	0.56
M (2D6)	EtOH	0.43	0.17	0.73	0.61	0.18	0.42
	H ₂ O	0.066	0.43	0.31	0.88	0.47	0.43
	MeOH	0.000037	0.26	0.66	0.95	0.029	0.38
M (3A4)	EtOH	0.75	0.70	0.75	0.56	0.98	0.75
	H ₂ O	0.96	0.78	0.89	0.69	0.98	0.86
	MeOH	0.87	0.63	0.90	0.63	0.97	0.8

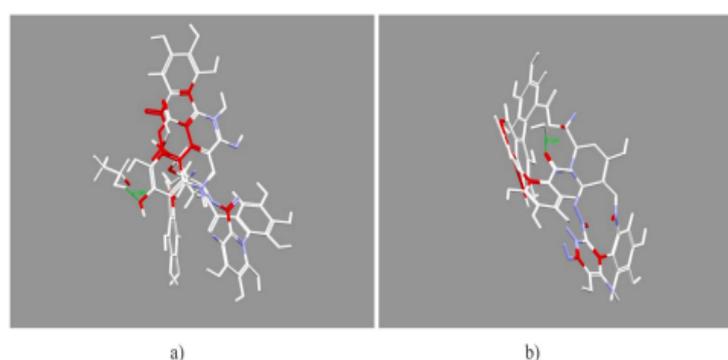


Fig. 3. a) punicalagin- α complexed to EtOH (pharmacophore O of OH-group interacts with H of OH of the solvent), b) punicalagin- α complexed to H₂O (O of CO-group interacts with the solvent). Red color - pharmacophore fragments, white - ballast part, blue - antipharmacophore fragments, and green dotted line is hydrogen bond with the solvent.

The complex of punicalagin- α with methanol has a probability of 0.48, and the complex with ethanol has a low biological activity value of 0.03. An analysis of the average probabilities for a mixture of compounds with solvents showed that complexes with water are characterized by a probability of (0.35), while the probabilities of complexes with ethanol and methanol are 0.47 and 0.56.

Characteristic features of highly active antibacterial complexes among presented in Table 5 are the pharmacophore parts located on peripheral hydroxyaromatic parts of the phytocomponents, monosaccharide fragments located in the center of the structures. Fragments of the dihydrobenzopyran ring, ester fragments and carboxyl groups are classified as antipharmacophore parts of the molecules.

The study of metabolism showed that complexes with methanol, ethanol, and water are characterized by a moderate probability of metabolism on the 2D6 isoform 0.38, 0.42, 0.43, respectively. A different situation is observed for the 3A4 isoform: the complexes are characterized by a high average probability of metabolism, while a higher value is observed for aqueous complexes (0.86), a lower probability value is observed for complexes with methanol (0.8) and ethanol (0.75).

Analysis of structures characterized by a high level of activity on the 3A4 isoform showed that pharmacophores include ester fragments, unsubstituted fragments of aromatic systems, alkyl fragments and hydroxyl groups. The results are consistent with experimental data (Dresser et al., 2000). It is known that these fragments are mainly subject to changes during metabolism on the 3A4 isoform.

Substituted parts of aromatic systems, fragments of monosaccharides are classified as antipharmacophore parts of molecules. Thus, it was found that mixtures of complexes of gallic acid, punicalagin- β ,

punicalagin- α , punicalin, tannic acid with ethanol, methanol, water in all cases have high or moderate values of antioxidant, antibacterial activity and metabolism. Each complex is characterized by its biological activity. The activity of the extract will depend on the molecules it contains, as well as on their ratio.

At the same time, the average probability of antioxidant and antibacterial activity of complexes with ethanol and methanol is greater than the probability of complexes with water. However, the known toxicity of methanol and ethanol limits the use of the obtained extracts. In this regard, it can be assumed that water is an effective solvent for yellow pomegranate peel, and its aqueous extracts are promising antioxidant and antibacterial drugs.

4.5. Antioxidant activity

The assessment of antioxidant activities in plant extracts required multiple methods rather than relying on a single assay, as emphasized by Gioti et al. (2009). This approach allows for a more comprehensive evaluation of antioxidant capacity, given the intricate nature of antioxidant mechanisms in biological matrices. In the present study, six in vitro assays (DPPH•, ABTS+, GOR, CUPRAC, FRAP, and phenanthroline) were employed as complementary methods to assess the potential antioxidant activity in pomegranate yellow peel. These assays encompass both free radical scavenging and oxidation-reduction mechanisms. The results of antioxidant activity, expressed in terms of IC₅₀ and A_{0.5}, with lower IC₅₀ and A_{0.5} values indicating higher antioxidant potency, are presented in Table 6

According to the DPPH• assay results, the hydro-ethanolic extract exhibited the highest activity (IC₅₀ = 9.90 ± 1.08 µg/mL), closely

Table 6
Antioxidant activity of aqueous, methanolic, and hydroethanolic extracts of pomegranate yellow peel by DPPH•, ABTS+, GOR• scavenging assay, CUPRAC, reducing power, and phenanthroline assay.

	DPPH assay ^{IC50} µg/ml.	ABTS ⁺ scavenging assay ^{IC50} µg/ml.	GOR• scavenging assay ^{IC50} µg/ml.	CUPRAC assay ^{A0.50} µg/ml.	reducing power assay ^{A0.5} µg/ml.	phenanthroline assay ^{A0.5} µg/ml.
Aqueous	12.42±0.52 ^{b,c}	7.05±0.12 ^b	6.03±1.12 ^b	7.40±0.79 ^f	16.00±4.02 ^d	10.23±1.95 ^b
Methanolic	16.30±0.22 ^b	8.37±0.43 ^a	5.83±0.12 ^b	10.33±0.17 ^{a,b}	34.22±1.74 ^e	24.10±1.44 ^a
Ethanol:water	9.90±1.08 ^{c,d}	8.42±0.06 ^a	7.69±0.25 ^a	11.78±0.49 ^a	48.88±1.31 ^b	24.29±2.30 ^a
BHT	22.32±1.19 ^a	1.59±0.03 ^e	3.32±0.18 ^e	9.62±0.87 ^b	152.24±2.43 ^a	2.24±0.17 ^e
BHA	5.73±0.41 ^d	1.03±0.00 ^f	5.38 ±0.06 ^b	3.64±0.19 ^d	8.41±0.67 ^e	0.93±0.07 ^e
Ascorbic acid	NT	NT	NT	NT	6.77±1.15 ^e	NT
Tannic acid	NT	NT	NT	NT	5.39±0.91 ^e	NT
α-Tocopherol	NT	NT	NT	NT	34.93±2.38 ^e	NT

IC₅₀ and A_{0.5} were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean±SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c, d or e) in the same columns are significantly different (p < 0.05). NT: not teste

comparable to BHA (IC₅₀ = 5.73 ± 0.41 µg/mL), but notably surpassing BHT (22.32 ± 1.19 µg/mL). This was followed by the aqueous and methanolic extracts, with IC₅₀ values of 12.42 ± 0.52 µg/mL and 16.30 ± 0.22 µg/mL, respectively. In the ABTS+ scavenging assay, the aqueous extract demonstrated the highest activity (IC₅₀ = 7.05 ± 0.12 µg/mL), while methanolic and hydroethanolic extracts showed similar values (IC₅₀ = 8.37 ± 0.43 µg/mL and IC₅₀ = 8.42 ± 0.06 µg/mL, respectively). Notably, BHT and BHA exhibited strong activity (IC₅₀ = 1.59 ± 0.03 µg/mL and IC₅₀ = 1.03 ± 0.00 µg/mL, respectively) compared to the investigated extracts.

For GOR scavenging activity, the methanolic extract displayed the highest activity (IC₅₀ = 5.83 ± 0.12 µg/mL), being very close to BHA, while the aqueous and hydro-ethanolic extracts exhibited IC₅₀ values of 5.38 ± 0.06 µg/mL and 6.03 ± 1.12 µg/mL, respectively, and lower than BHT (IC₅₀ = 3.32 ± 0.18 µg/mL).

In the CUPRAC assay, the aqueous extract showed higher activity (A_{0.50} = 7.40 ± 0.79 µg/mL) than the methanolic, hydro-ethanolic extracts, and BHT (A_{0.50} = 10.33 ± 0.17 µg/mL, A_{0.50} = 11.78 ± 0.49 µg/mL, and A_{0.50} = 9.62 ± 0.87 µg/mL, respectively), although these values were lower than BHA (A_{0.50} = 3.64 ± 0.19 µg/mL).

In the FRAP assay, the aqueous extract exhibited the highest activity (A_{0.50} = 16.00 ± 4.02 µg/mL), followed by the methanolic (A_{0.50} = 34.22 ± 1.74 µg/mL) and hydro-ethanolic extracts (A_{0.50} = 48.88 ± 1.31 µg/mL). Notably, tannic acid, ascorbic acid, and BHA demonstrated superior activity (A_{0.50} = 5.39 ± 0.91 µg/mL, A_{0.50} = 6.77 ± 1.15 µg/mL, and A_{0.50} = 8.41 ± 0.67 µg/mL, respectively) compared to our extracts, while α-tocopherol and BHT had A_{0.50} values of (A_{0.50} = 34.93 ± 2.38 µg/mL and A_{0.50} = 152.24 ± 2.43 µg/mL, respectively).

In the phenanthroline assay, the aqueous extract displayed the highest antioxidant activity (A_{0.50} = 10.23 ± 1.95 µg/mL), followed by the methanolic and hydro-ethanolic extracts (A_{0.50} = 24.10 ± 1.44 µg/mL and A_{0.50} = 24.29 ± 2.30 µg/mL, respectively). However, our extracts exhibited lower antioxidant activity than BHT and BHA (A_{0.50} = 2.24 ± 0.17 µg/mL and A_{0.50} = 0.93 ± 0.07 µg/mL).

The results of the DPPH assay presented in Hadjadj et al. (2018) indicate that the hydro-ethanolic extract exhibited relatively higher antioxidant activity (4.64 ± 0.35 µg/mL) compared to results presented here. Similarly, their ABTS+ result (3.63 ± 0.07) was higher than that for the present study (3.63 ± 0.07).

In contrast, an ethanol peel extract of pomegranate studied by Pal et al., (2017) demonstrated relatively lower antioxidant activity in the DPPH assay (IC₅₀ = 16.78 µg/mL) compared to the results obtained from the three extracts investigated here. However, their ABTS+ scavenging activity reported by Pal et al., (2017) showed weaker antioxidant activity (IC₅₀ = 587.36 µg/mL) compared to results presented here (Table 6).

Results presented by Zahin et al., (2010) indicated that the methanol fraction exhibited the highest antioxidant potency, followed by ethanol, acetone, and ethyl acetate fractions, in both the FRAP and CUPRAC

assays. In the present study, however, the aqueous extract displayed the highest antioxidant activity. moreover, Li et al., (2006) found that a peel extract obtained using a mixture of methanol, ethanol, acetone, and water had significantly higher FRAP values than those obtained using individual solvents such as methanol, ethanol, or acetone. the result of the phenanthroline activity carried out by Chaabna et al., (2023) on pomegranate skin diethyl ether extract showed a higher activity than that of the investigated extracts (A_{0.5} = 1.04 ± 0.10 µg/mL). No studies have reported results for the GOR• assay.

While many studies have established a correlation between a higher phenolic content in extracts and greater antioxidant activity (Masci et al., 2016), data presented here did not confirm this relationship. It was obvious that the methanolic extract had the highest total phenolic content (TPC), while the aqueous extract exhibited the most potent antioxidant activity in four out of six tests. Given the small differences in TPC values among extracts, being almost equivalent. Therefore, variations in antioxidant activity results may stem from differences in the chemical compounds and biomolecules present in each crude extract and their interactions with the specific methods employed.

The antioxidant effects of polyphenols, particularly phenolic acids and flavonoids, depend on the functional groups. (Sihag et al., 2022). In the in silico study results, at least either 3 OH groups (including the OH group of the COOH fragment) of the extracts, or aromatic ring atoms associated with OH groups, have a pharmacophoric effect on antioxidant activity, it is the case of the identified molecules rich with an OH groups which belongs to hydrolysable tannins. As a conclusion and according to computational study and LC-MS/MS results, the interesting antioxidant activity is probably due to the high amount of phenolics and flavonoids and especially hydrolysable tannins (punicalagin a, punicalagin b and punicalainect

4.6. In vitro anti-inflammatory effect of the extracts

The in vitro anti-inflammatory effect of the pomegranate yellow peel extracts was evaluated via the Proteins denaturation method (BSA) where the results are expressed in Fig. 4.

Protein denaturation is a process wherein proteins undergo structural changes, losing their secondary and tertiary structures due to alterations in hydrogen, hydrophobic, electrostatic, and disulfide bonds. This transformation often leads to the loss of biological activities in proteins, contributing to the production of auto-antigens observed in inflammatory diseases such as rheumatic arthritis. Consequently, natural products capable of inhibiting protein denaturation hold promise as potential candidates for the development of anti-inflammatory drugs.

In the present study, three extracts were compared to the standard drug aspirin, which exhibited approximately 97% inhibition at three different concentrations. At 1.25 mg/mL, the hydro-ethanolic extract displayed the highest percentage of inhibition (63.36%), followed by the aqueous extract and methanolic extract with a percentage of

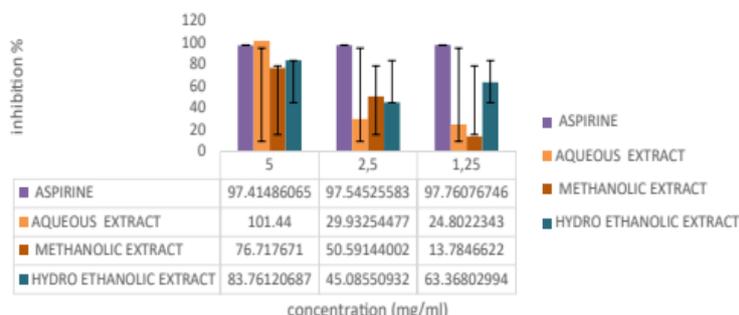


Fig. 4. The in vitro anti-inflammatory effect of the pomegranate yellow peel extracts.

inhibition of 24.80 % and 13.78 %, respectively. When the concentration was elevated to 2.5 mg/mL, the methanolic extract and hydro-ethanollic extract demonstrated inhibitions of 50.59 % and 45.08 %, respectively, both surpassing the aqueous extract, which achieved 29.93 %. Finally, at a concentration of 5 mg/mL, all three extracts exhibited their maximum inhibitory percentages: aqueous extract (101.44 %), hydro-ethanollic extract (83.76 %), and methanolic extract (76.71 %).

The extracts under investigation were more effective than those of Maqsood [Rashid and Shafi, \(2018\)](#) who tested *Punica granatum L.* flower extracts. The maximum percentage of inhibition of 71.24 % from the methanolic extract at a concentration of 500 g/mL, followed by the aqueous extract of 68.49 % at the same concentration where aspirin showed maximum inhibition of 75.66 % at a concentration of 100 g/mL versus the control. From this large difference in results, it can be concluded that pomegranate yellow peel is more effective than the flower in its anti-inflammatory activity. Also, methanolic extract gives the best percent of inhibition against aqueous extract in the *in vivo* inflammatory activity of *Punica granatum* peel which was assessed by [Douaouri and Djebli \(2018\)](#) using doses of 250 and 500 mg/kg of methanolic and aqueous extracts. and administered orally for carrageenan-induced paw edema in mice, against Diclofenac (50 mg/kg) is a standard drug. At both concentrations, the methanolic extract exhibited the best activity where at 500 mg/kg the percent inhibition of paw edema by the methanolic extract was equal to that of diclofenac.

The pomegranate peel is notably abundant in hydrolysable tannins, specifically punicalagins, which are widely recognized for their antioxidant and anti-inflammatory properties ([Mastrogiovanni et al., 2019](#)). This finding was corroborated by [Du et al. \(2019\)](#), whose results indicated that pomegranate peel possesses a potent anti-inflammatory effect, with punicalagin being the primary effective component. In the current study, and according to the quantification and the identification of pomegranate yellow peel constituents, the class of hydrolysable tannins is the most abundant polyphenols in pomegranate yellow peel including punicalagins a and b, this results elucidate that the hydrolysable tannins investigated are among the compounds responsible for the anti-inflammatory activity.

4.7. Antibacterial activity

The size of the inhibition zone should be proportional to the susceptibility of the organism to the tested antibiotic. This means that the larger the inhibition zone is, the more susceptible the bacteria to a particular extract should be and the bacteria can be classified as resistant or susceptible to a particular extract.

[Table 7](#) presents the results of testing different concentrations (1, 2 and 4 mg/mL) of aqueous, methanolic, and hydro-ethanollic extracts against various bacterial strains, including *Escherichia coli* ATCC 7839, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Across all concentrations and extracts, there is no inhibition observed For *Escherichia coli* ATCC 7839. While *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P shows inhibition at various concentrations and extracts with inhibition zones ranging from 11.5 mm to 24 mm.

Enterococcus faecalis ATCC 19433 exhibits no inhibition at the lowest concentrations for all extracts. However, at higher concentrations, 2 mg/mL for the methanolic extract and at 4 mg/mL for the hydro-ethanollic extract. Furthermore, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 does not show inhibition at the lowest concentrations for all extracts. However, at higher concentrations, inhibition is observed for the hydro-ethanollic extract at 8.5 mm and a concentration of 4 mg/mL.

Overall, the results suggest that the aqueous, methanolic and hydro-ethanollic extracts have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* while both methanolic and hydro-ethanollic extracts have antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. For *Pseudomonas aeruginosa*, only hydro-ethanollic extract shows an activity. *Escherichia coli* is resistant to all tested extracts and concentrations.

Pomegranate exhibits a wide-ranging spectrum of antibacterial effects and demonstrates a noticeable inhibitory impact on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Several studies have highlighted the potent antibacterial activity of pomegranate peel extract, emphasizing its effectiveness against various food contaminants and pathogenic bacteria. These bacteria include *Escherichia coli*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium italicum*, and *Bacillus subtilis*, as reported by [Chen et al. \(2020\)](#).

[Hazem et al., \(2021\)](#) conducted an evaluation of the antibacterial activity of *Leathery Exocarp* Extract against various microorganisms, including *Escherichia coli* and other food contaminants and pathogenic

Table 7 antibacterial activity of aqueous, methanolic, and hydro-ethanollic extracts of pomegranate yellow peel (no inh=no inhibition, not det= not detected).

Bacterial strains	Aqueous extract			Methanolic extract			Hydro-ethanollic extract		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 7839	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	11,5 mm	15 mm	19,5 mm	17,5 mm	19 mm	24 mm	12 mm	15,5 mm	18,5 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	No inh	No inh	No inh	No inh	11 mm	14 mm	No inh	No inh	11 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	No inh	8,5 mm

bacteria. Their findings align with results given here, as they observed a significant bactericidal effect against *E. coli* only at the higher concentration of the extract (10 mg/mL). Notably, the antimicrobial assays conducted by Hazem et al. (2021), demonstrated promising antibacterial effects in some cases, suggesting potential benefits when compared to synthetic drugs. Alexandre et al. (2019) tested the antimicrobial properties of the extracts against several food pathogens, such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The initial screening of the antibacterial activity showed that the majority of pathogenic strains appeared to be sensitive to the extracts. Showing the highest inhibition zone, *P. aeruginosa* was more sensitive to peel extracts than most other microorganisms. These findings collectively underscore the potential of pomegranate peel extracts as effective antibacterial agents against various bacterial pathogens

5. Conclusion

In this study, LC-MS/MS analysis of pomegranate yellow peel extracts was conducted, encompassing three solvents, leading to the identification of phytochemicals. Additionally, the phenolic, flavonoid, and hydrolyzable tannin content were assessed in these extracts. Further analyses involved geometry optimization of the most prevalent phenolic compound found in pomegranate peel. Also, the biological activity and metabolism of these compounds were predicted, enabling the evaluation of *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities.

The choice of three different extraction solvents, namely water, methanol, and a water-ethanol mixture (50:50), proved invaluable in determining the solvent that yielded the most promising results. Notably, this study introduced the application of GOR assay for the first time on pomegranate yellow peel to assess antioxidant activity.

The data demonstrate that the choice of solvent significantly impacts the outcomes, despite variations in yield, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and total hydrolyzable tannins (THT) compared to other solvents. The data consistently indicate that the aqueous extract emerges as the most effective solvent, exhibiting potency in nearly all evaluated tests for antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities. These findings underscore the potential utility of this specific pomegranate species in the pharmaceutical industry, highlighting its value as a source of bioactive compounds with diverse beneficial properties.

Ethics approval

Not applicable in this study

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies

CRedit authorship contribution statement

Ehab AlShamaileh: Writing – review & editing, Formal analysis. **Saliha dahamna:** Writing – review & editing, Validation, Formal analysis. **Chawki Bensouici:** Writing – review & editing, Validation, Formal analysis. **Mahmoud Bounakhel:** Writing – review & editing. **Maria Grishina:** Writing – review & editing, Software, Formal analysis. **Amina Boukezzoula:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Nadezhda Palko:** Writing – review & editing, Software, Formal analysis. **Djalila Boudemagh:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Formal analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interests

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Walid Boussebaa for his assistance in conducting the HPLC- LC-MS analysis. Mr. Boulesbaa Mohammed, a Search Engineer specializing in Scientific and Technical Research at the Physico-Chemical Analysis Center in Ouargla, Algeria.

Consent for publication

All authors consent to the submission of this paper

References

- Abid, Mouna, Hela Yaich, Salma Cheikhrouhou, Ibtihel Khemakhem, Mohamed Bouaziz, Attia, Hamadi, Ayadi, et M.A., 2017. « Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels ». *J. Food Sci. Technol.* 54 (9), 2890-2901.
- Aguilar-Zarate, P., Wong-Paz, J.E., Michel, M., Buenostro-Figueroa, J., Diaz, H.R., Ascacio, J.A., Aguilar, C.N., 2017. Characterisation of pomegranate-husk polyphenols and semi-preparative fractionation of punicalagin. *Phytochem. Anal.* 28 (5), 433-438.
- Alexandre, E.M., Silva, S., Santos, S.A., Silvestre, A.J., Duarte, M.F., Saraiva, J.A., Pintado, M., 2019. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Res. Int.* 115, 167-176.
- Ali, Amjad, Ying Chen, Hongsheng Liu, Long Yu, Zulqarnain Baloch, Saud Khalid, Jian Zhu, Chen, et Ling, 2019. Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. *Int. J. Biol. Macromol.* 129, 1120-1126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.068>.
- Ali, S.I., El-Baz, F.K., El-Emary, G.A., Khan, E.A., Mohamed, A.A., 2014. HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum L.*). *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 6 (4), 348-355.
- Al-Rawahi, A.S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A.S., Rahman, M.S., 2013. Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum L.*) cultivated in Oman. *Eur. J. Med. Plants* 4 (3), 315-331.
- Altunkaya-Dinçay, Arzu, 2014. Potential antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts and synergism with added phenolic antioxidants in a liposome system: A preliminary study. *Ir. J. Agric. Food Res.* 53 (janvier), 121-131.
- Ambigaipalan, P., De Camargo, A.C., Shamidi, F., 2016. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* 64: 6584-6604. Antolovich, Michael, Paul D. Prenzler, Emiliós Patsalides, Suzanne McDonald, et Kevin Robards. 2002. « Methods for testing antioxidant activity ». *Analyst* 127 (1), 183-198.
- Apak, Re.şat, Kubilay Güçlü, Mustafa Özyürek, et Saliha Esin, Karademir, 2004. « Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method ». *J. Agric. Food Chem.* 52 (26), 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.
- Balaban, M., Koç, C., Sar, T., Akbas, M.Y., 2022. Screening for bioactive compound rich pomegranate peel extracts and their antimicrobial activities: extraction methods for increased antibacterial and antifungal properties. *Johns. Matthey Technol. Rev.* 66 (1), 81-89.
- Blois, Marsden S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181 (4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74 (17), 2157-2184.36.
- Çam, Mustafa, et Yaşar, H.İ.ş.İ., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem.* 123 (3), 878-885. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>.
- Chaabna, N., Naili, O., Ziane, N., Bensouici, C., Dahamna, S., Harzallah, D., 2023. Neuroprotective and antioxidant activities of Algerian *Punica granatum L.* Peel Extracts. *Curr. Enzym. Inhib.* 19 (3), 202-210.
- Chen, J., Liao, C., Ouyang, X., Kahramanoğlu, I., Gan, Y., Li, M., 2020. Antimicrobial activity of pomegranate peel and its applications on food preservation. *J. Food Qual.* 2020, 1-8.
- Doussouri, N.E., Djebli, N., 2018. In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of Algerian pomegranate (*Punica granatum L.*). *Int. J. Biosci.* 12 (2), 76-90.
- Dresser, G.K., Spence, J.D., Bailey, D.G., 2000. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin. Pharm.* 38, 41-57. <https://doi.org/10.2165/0003088-200038010-00003>.

Communications internationales:

1-Communication par affiche: Third International Symposium: Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) 25-27 February 2020, Tebessa, Algeria “**TYROSINASE ACTIVITY OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT**” BOUKEZZOULA Amina, BOUDEMAGH Djalila. BENSOUICI Chawki, BOUNEKHEL Mahmoud

2- Communication par affiche : 2nd international Symposium on Materials Chemistry (ISyMC)16-20 May 2021 Boumerdes –Algeria,” **Extraction, Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, and butyrylcholinesterase inhibitory of Pomegranate Peel Waste**”. BOUKEZZOULA Amina, BOUDEMAGH Djalila, BOUNEKHEL Mahmoud

3- Communication par affiche: Second International Workshop on Environmental Engineering (IWEE'22) 3 and 4 December 2022 Setif Algeria,” **Antioxidant activity of pomegranate peel**” BOUKEZZOULA Amina, BOUDEMAGH Djalila, BOUNEKHEL Mahmoud

Annexe A :

Solvants et réactifs utilisés:

Folin-Ciocalteu

Carbonate de sodium (Na_2CO_3)

Acide gallique

Acétate de potassium (CH_3COOK)

Nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)

Quercétine

Iodate de potassium (KIO_3)

Acide tannique

Acide formique (HCOOH)

Méthanol

Éthanol

1,1diphényl-2-picrylhydrazyle DPPH^{*}

Hydroxyanisole butylé (BHA)

Sel d'ammonium de l'acide 2,2'azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS⁺)

Persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)

butylhydroxytoluène (BHT)
2,6-di-tert-butyl-4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényle (Galvinoxyl).
Chlorure de cuivre (CuCl_2)
Acétate d'ammonium ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$)
Ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
Acide trichloracétique (TCA)
Trichlorure de fer (FeCl_3)
Acide ascorbique
Acide tannique
 α -Tocophérol
Phénanthroline
Albumine sériume de bovine (BSA)
Tris-base
HCl
Aspirine
Gélosé
Bouillon nutritif
Gélatine type A

Annexe B

Activité antioxydante

1 Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon une méthode de dosage sur microplaque, Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

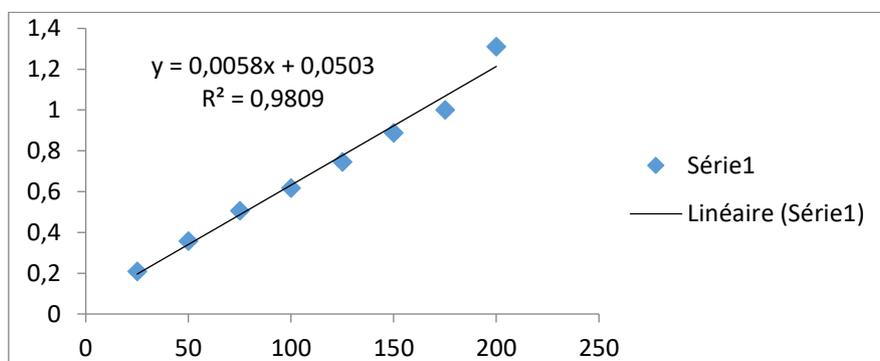
A Gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Solution Folin Ciocalteu (0.1N) : prendre 1ml de la solution de Folin Ciocalteu concentré (2M) est complété à 10ml avec de l'eau distillée (9ml).

Carbonate de sodium (7.5%) : dissoudre 7.5 g de carbonate de sodium dans 100 ml eau distillé.

Une solution mère de l'acide gallique dans du méthanol (0.2mg/ml) avec huit dilutions (25,

50, 70, 100, 125, 150, 175 et 200 $\mu\text{g/ml}$) ont été préparées. Dans une microplaque, pipetter 20 μl de chaque dilution et ajouter 100 μl de la solution Folin Ciocalteu (0.1N) et 80 μl du Carbonate de sodium (7.5%). Les absorbances sont lues à 765nm après incubation pendant 2h. La droite d'étalonnage est illustrée dans la Figure

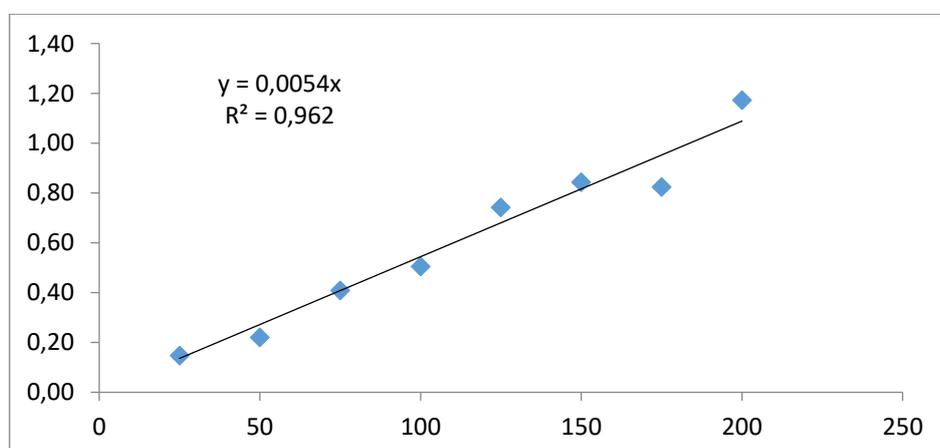


Courbe d'étalonnage acide gallique

2 dosages des flavonoïdes

A. Gamme d'étalonnage de de la quercétine :

Pour tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine, Une solution mère de de la quercétine dans du méthanol (0.2mg/ml) avec huit dilutions (25, 50, 70, 100, 125, 150, 175 et 200 $\mu\text{g/ml}$) ont été préparées. Dans une microplaque, pipeter 50 μl de chaque dilution et ajouter 130 μl de méthanol, 10 μl de CH_3COOK , et 10 μl d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ après une incubation de 40 min. les absorbances ont été lu à 415 nm.

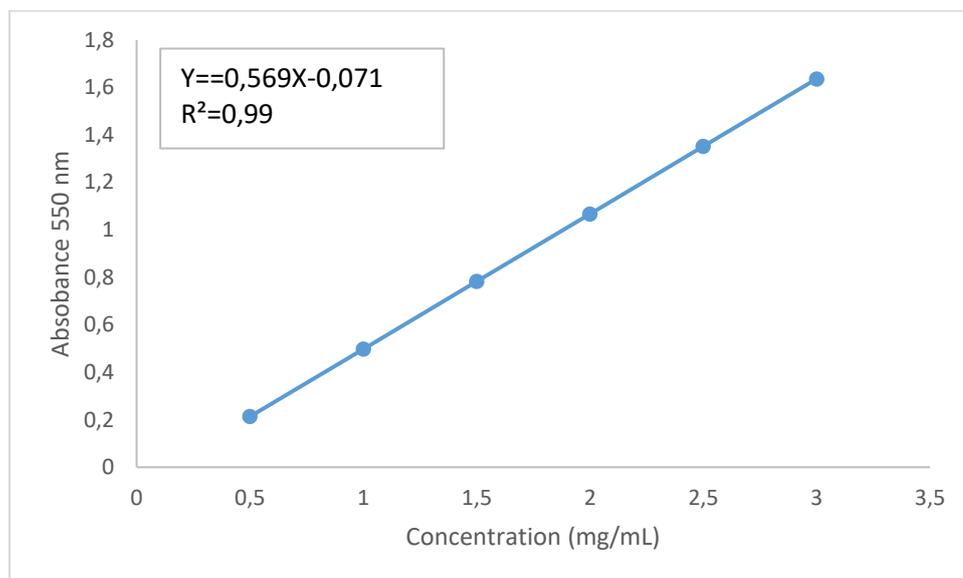


Courbet d'étalonnage quercetine

3 Dosage de tannins hydrolysable

- Afin de quantifier les tannins hydrolysables, Six concentrations différentes de la solution d'acide tannique (500-2000 mg/L) ont été préparées pour tracer la courbe d'étalonnage. Puis 5 mL de KIO_3 à 2,5%(2.5 g dans 100 ml eau distillé) sont ajouté et

vortexés pendant 10 secondes. Après 4 min, l'absorbance du mélange de couleur rouge est déterminée à 550 nm.



4 Activité antioxydantes:

A activité antioxydante par le test ABTS scavenging:

- **solution d'ABTS**

-Mélanger 7mM d'ABTS dans l'eau avec 2,45 mM de persulfate de potassium.

-Conserver la solution à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 12 h avant utilisation pour que la solution se stabilise.

-Avant utilisation, vérifier l'absorbance à 734 nm (elle doit être comprise entre 0.6 et 0.7).

B Activité antioxydante par le test de la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC).

Solutions Acétate d'ammonium 1M

Mélanger 1,927 g Acétate d'ammonium (ACNH_4) avec 25 ml d'eau distillé pour obtenir une solution transparente de PH=7

- **Solution chlorure de cuivre 10mM**

Mélanger 0,042625 g du chlorure de cuivre. ($\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) avec 25 ml d'eau distillé pour obtenir une solution bleu et de 10mM

- **Solution de Neocupronin 7.5 mM**

Mélanger 0,039 g (Neocupronin) avec 25 ml de méthanol. (7.5 mM)

C Activité antioxydante par le dosage DPPH

- **Solution de DPPH**

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol,

L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

Gardé la solution à -20°C à l'abri de la lumière.

D Activité antioxydante par absorbance dans le test de la phenanthroline

Solution de Phenanthroline (0.5%)

Mélanger 0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de Methanol.

- **Solution de chlorure de fer (0.2%)**

Mélanger 0.02g de FeCl₃ dans 10ml de d'eau distillé.

E Activité antioxydante par le test du pouvoir réducteur

- **Solution de potassium ferricyanide (1%) :**

Mélanger 1 g de K₃Fe(CN)₆ dans 100 ml d'eau distillé .

- **Solution d'acide tri-chloroacétique (10%)**

Mélanger 1 g de TCA dans 10 ml d'eau distillé.

- **Solution de chlorure de fer (0.1%)**

Mélanger 0,1 g de FeCl₃ dans 100 eau distillé.

F Activité antioxydante par pourcentage d'inhibition dans le test de piégeage du radical galvinoxyle (GOR)

- **Solution de Galvinoxyle 0.1 mM**

Mélanger 4 mg avec 100 ml de méthanol

Annexe D

Activité anti inflammatoire

- **Solution albumine sérique bovine BSA à 0,2 %**

Dissolvez 0,2 g de BSA dans le tampon Tris-HCl pour obtenir un volume total de 100 ml.

Annex E :

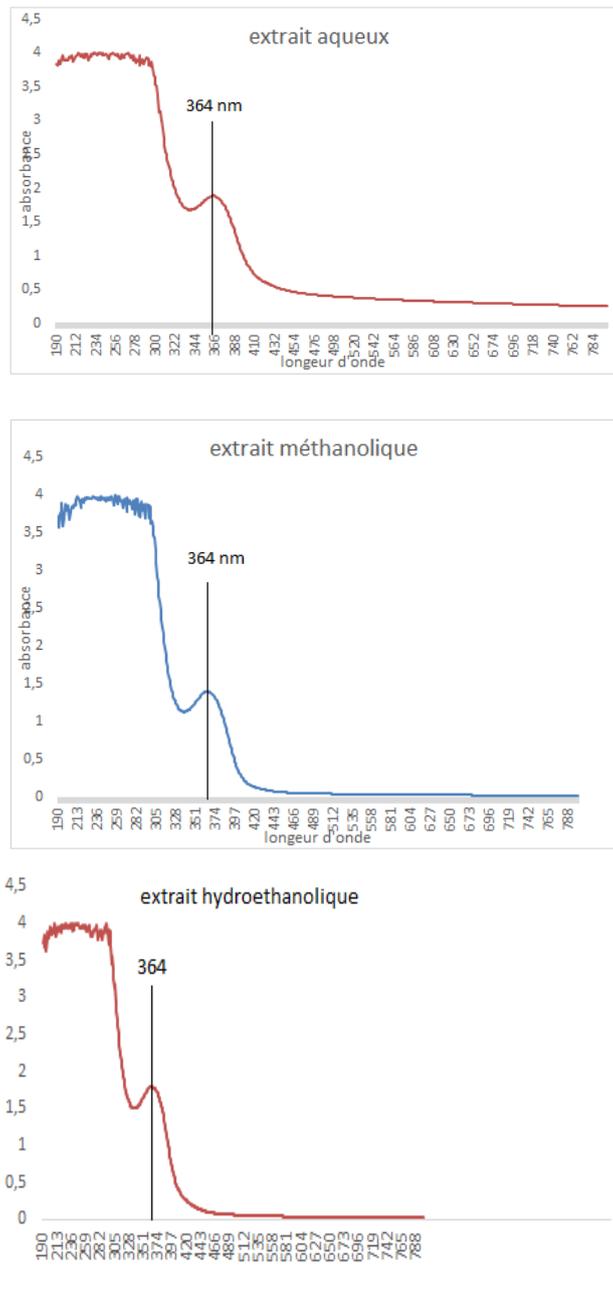
L'efficacité d'encapsulation:

1 Analyse UV-Visible des extraits

Pour déterminer l'absorbance maximale des extraits, des solutions mères (3 mg/ml) et des solutions étalons des chaque extraits sont préparer dans l'eau (0.187,0.375 , 0.75, 1.5). Les absorbances des solutions sont ensuite lues grâce au spectrophotomètre UV et la courbe est tracée par la suite.

2 Détermination de la longueur d'onde

D'après les figures, Le maximum d'absorption défini pour les trois extraits est: 364 nm



Sélection de la longueur d'onde maximale des trois extraits.

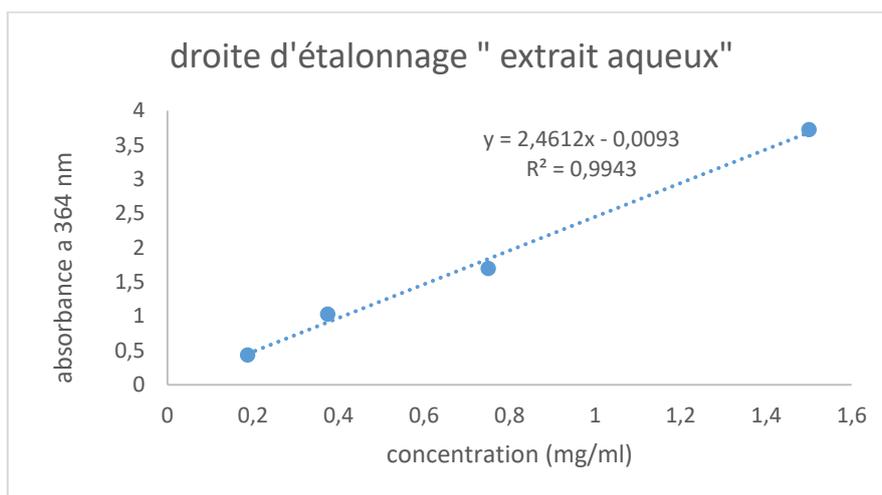
3 La droite d'étalonnage :

Les résultats obtenus après l'analyse en UV-visible des différentes solutions étalons sont montrés sur les Tableaux et sont représenté dans les figures.

a) Extrait aqueux

C (mg/ml)	Absorbance
0,187	0,432
0,375	1,029
0,75	1,697
1,5	3,726

La représentation graphique des résultats obtenus par analyse UV de l'extrait aqueux donne une droite, avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,9943$.

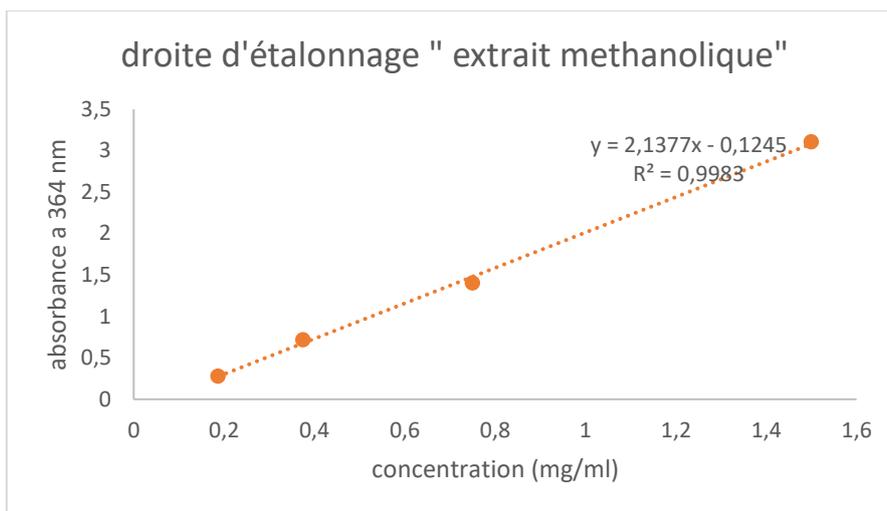


Courbe d'étalonnage de l'extrait aqueux

b) Extrait méthanolique

C (mg/ml)	Absorbance
0,187	0,28
0,375	0,72
0,75	1,406
1,5	3,107

La représentation graphique des résultats obtenus d'après l'analyse UV de l'extrait méthanolique donne une droite, avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,9983$.

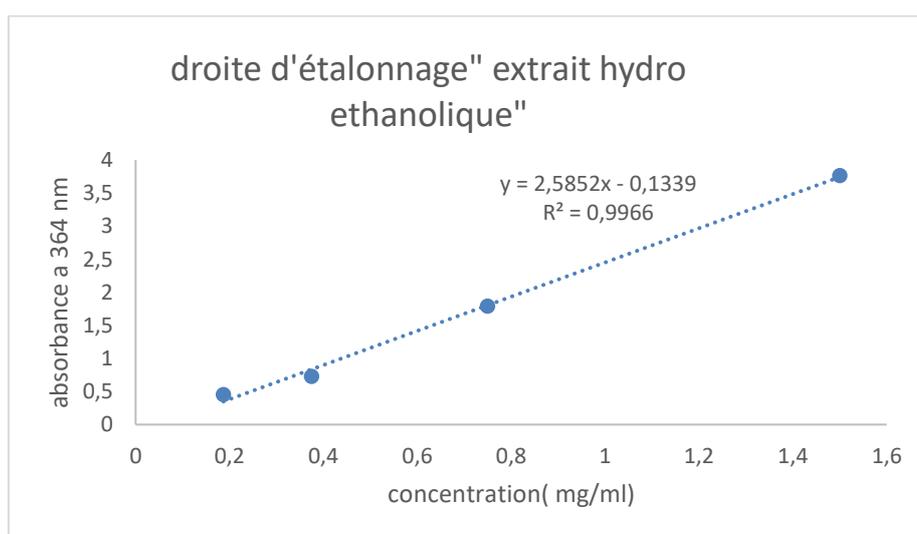


Courbe d'étalonnage de l'extrait méthanolique

c) Extrait hydro éthanolique

C (mg/ml)	Absorbance
0,187	0,452
0,375	0,726
0,75	1,79
1,5	3,766

La représentation graphique des résultats obtenus par l'analyse de l'extrait et le tracé de la courbe de tendance donne une droite, avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,9966$.



Courbe d'étalonnage de l'extrait hydro éthanolique :