



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT : GÉNIE DES PROCÉDÉS

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : **KAHLALECHE Brahim El Khalil**

REGUE Ismail

DOMAINE : Sciences et Technologies

FILIERE : Génie des Procédés

OPTION : Génie pharmaceutiques

Thème

**Contribution à l'activité antioxydante de
l'extrait phénolique de *Ruta graveolens* « Fidjel »**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
MECHRAOUI Omar	MCA	Président
AMEUR Kheira	MAA	Examinatrice
GUENANE Hadjira	Pr	Rapporteur
DJEKIDEL Elallia	Doctorante	Co-rapporteur

Promotion : JUIN 2025

Remerciements

Je commence ma dédicace au nom de Dieu, et que les prières et la paix soient sur Mohammed, le Messager de Dieu, que Dieu le bénisse et lui accorde la paix. Nous remercions notre Seigneur qui nous a donné le courage d'accomplir cette humble œuvre.

Notre premier mot de remerciement va bien sûr à notre encadrante, M_{me} GUENANE Hadjira, pour avoir accepté de diriger ce travail.

Nous adressons également nos sincères remerciements à M_{me} DJEKIDEL Alia, doctorante à l'Université Amar Téliidji, pour les connaissances scientifiques et les efforts fructueux qu'elle nous a fournis, ainsi que pour ses précieux conseils et ses nobles qualités humaines.

Notre remerciement également à M_{me} BOUKHALKHAL Sarah chef d'option de Génie des procédés pharmaceutique, ainsi que M_{me} BOUTASSOUNA Nasima.

Nous exprimons toute notre gratitude aux membres du jury, M_r MECHRAOUI Omar et M_{me} AMEUR Kheira, pour avoir accepté de juger notre humble travail.

Pour les remercier, nous tenons à partager tous les enseignants du département Génie des Procédés pour leur soutien et leurs encouragements.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

À tous mes amis, à toutes les personnes qui m'ont aidé par un mot, une idée ou un encouragement, je dis « merci ».

Dédicace

«Et leur dernière supplication est Louange à DIEU, Seigneur des mondes. »

Qui a dit je suis à elle, il l'a eu

Je dédie ce fruit de mes efforts à ceux que Dieu m'a confiés, mes nobles parents.

À ceux qui ont partagé notre maison et qui ont été d'un grand soutien, mes chers frères, chacun par son nom.

À nos compagnons et bons amis, dont les paroles seront toujours entendues.

Ismail, Rabeh, Younes, Abdel Hak, Aymen Houssam, Mohamed.

À moi-même qui ai parié sur le succès, et à tous ceux à qui mon cœur était ouvert mais le papier était trop étroit pour les mentionné.



Khalil

Dédicace

«Et leur dernière supplication est Louange à DIEU, Seigneur des mondes. »

Qui a dit je suis à elle, il l'a eu

Je dédie ce fruit de mes efforts à ceux que Dieu m'a confiés, mes nobles parents.

À ceux qui ont partagé notre maison et qui ont été d'un grand soutien, mes chers frères, chacun par son nom.

À nos compagnons et bons amis, dont les paroles seront toujours entendues.

Khalil, Zaki.

À moi-même qui ai parié sur le succès, et à tous ceux à qui mon cœur était ouvert mais le papier était trop étroit pour les mentionné.



Ismail

Table de matières

Liste des abréviations	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	iv
<i>Introduction générale</i>	1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la plante étudiée	4
I.1. La plante <i>Ruta graveolens</i>	4
I.1.1. Description botanique	4
I.1.2 Composition chimique	4
I.1.2.1 Les Alcaloïdes	4
I.1.2.2 Les Huiles volatiles	5
I.1.2.3 Les Flavonoïdes	5
I.1.2.4 Les Coumarines	5
I.1.2.5 Les lignans	5
I.1.3 Usage traditionnel et médicinal	5
I.2. Composés Phénoliques (POLYPHÉNOLS)	6
I.2.1. Généralités	6
I.2.2. Différentes classes des polyphénols	6
I.2.2.1. Classification des polyphénols	7
I.2.2.2. Acide phénolique	8
I.2.2.3. Flavonoïdes	8
I.2.2.4. Stilbènes	9
I.2.2.5. Tanins	9
I.3. Antioxydants synthétiques	11
I.3.1. Définition d'un Antioxydant	11
I.3.2. Les antioxydants	11
I.3.2.1. Antioxydants enzymatiques	11
I.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques	11
I.3.3. Radical libre	13
I.3.4. Stress oxydatif	13
I.3.5. Mécanisme d'action des Antioxydants	13

Chapitre II:Partie expérimentale

II. Matériels et méthodes.....	15
II.1. Produits Chimiques et Instruments	16
II.2. Préparation des échantillons	17
II.3. L'extraction des composés phénoliques	17
II.4. Analyse quantitative.....	17
II.4.1. Dosage de polyphénols totaux.....	17
II.4.2.Dosage de flavonoïdes.....	18
II.5. Évaluation de l'activité antioxydante	19
II.5.1.Test de piégeage du radical libre DPPH.....	19
II.5.1.1. Principe.....	19
II.5.1.2. Mode opératoire.....	19
II.5.2.Test de Phosphomolybdate	20
II.5.2.1. Principe.....	20
II.5.2.2. Mode opératoire.....	20
II.5.3.Test de FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique).....	21
II.5.3.1. Principe.....	21
II.5.3.2. Mode opératoire.....	22
II.5.4.Test de l'ABTS	22
II.5.4.1. Principe.....	22
II.5.3.2. Mode opératoire.....	23

Chapitre III:Résultats Et Discussions

III.1. Dosage de polyphénols totaux.....	25
III.2. Dosage des flavonoïdes totaux	25
III.3. Activité antioxydante	26
III.4. Le Test de Piégeage du Radical DPPH	27
III.5. Test de Phosphomolybdate	28
III.6. Test de (l'ABTS).....	28
III.7. Test de la réduction du fer (FRAP)	29
<i>Conclusion</i>	31
<i>Références</i>	34
<i>Annexe</i>	35

Liste des abréviations

A_{control} : L'Absorbance du milieu réactionnel sans l'antioxydant.

A_{test} : L'Absorbance du milieu réactionnel avec l'antioxydant.

A^{*} : Radical.

ABTS : 2,2'-azinobis- (3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

AH : Donneurs d'Hydrogènes.

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium.

AOX : Antioxydant.

BHA : Butylate d'hydroxy anisole.

BHT : Butyle Hydroxy Toluène.

C₂H₆O : Éthanol.

C₆ : Phénols Simples.

C₆-C₁ : Acides Hydrox Benzoïques.

C₆-C₁-C₆ : Xanthones.

C₆-C₂-C₆ : Stilbènes.

C₆-C₃ : Acides Hydrox Cinnamiques.

C₇H₆O₅ : Acide Gallique.

CAT : Catalase.

CH₃-OH : Méthanol.

DPPH : 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl.

EAG/g MS : Equivalent d'Acide Gallique par gramme de Matière Sèche.

ER/g MS : Equivalent de Rétine par gramme de Matière Sèche.

Fe(III)-TPTZ : Le complexe Tripyridyltriazine ferrique.

FeCl₃ : Chlorure Ferrique.

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique.

GPX : Glutathion Peroxydase.

H₂O₂ : Le Peroxyde d'Hydrogène.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

IC₅₀ : La Concentration de l'extrait exprimée nécessaire pour balayer 50% du radical DPPH.

IP (%) : Pourcentage d'inhibition.

KH₂PO₄ : Phosphate Mono Potassique.

LDL : Lipoprotéines de densité légère.

L'ADN : L'acide Désoxyribonucléique.

L'ATP : Adénosine Triphosphate.

Mo (V) : Molybdène (V).

Mo (VI) : Molybdène (VI).

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium.

NO : L'oxyde Nitrique.

O₂ : Oxygène.

OH : Le Radical Hydroxyle.

RL : Radical Liber.

ROS : Reactive Oxygen Species.

SOD : Super Oxyde Dismutase.

UV/vis : Ultra- Violet visible.

VCEAC : vitamine C Equivalent Antioxydant Capacité.

% : Pourcentage.

Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>Ruta graveolens</i>	4
Figure 2 : Groupements Phénoliques de 1 ou Plusieurs OH.	6
Figure 3 : Quelques exemples des acides hydroxy benzoïques.....	8
Figure 4 : Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques.	8
Figure 5 : Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques.	9
Figure 6 : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.....	9
Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables.....	10
Figure 8 : Structure des tanins condensés.....	10
Figure 9 : Organigramme expliquant les différentes étapes dans ce travail.....	15
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	18
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la rutine.	18
Figure 12 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH'.....	19
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.	21
Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le FRAP.	22
Figure 15 : Formation d'un radical ABTS (ABTS ⁺) stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium.	23

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales classes des composés phénoliques.....	7
Tableau 2 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.....	12
Tableau 3 : Produits Chimiques	16
Tableau 4 : Les Instruments.....	17
Tableau 5 : Teneurs en phénols totaux de <i>R.graveolens</i>	25
Tableau 6: Teneur en flavonoïdes de <i>R. graveolens</i>	26
Tableau 7: valeurs d'IC ₅₀ trouvées pour l'extrait de <i>R. graveolens</i> et les standards de test de DPPH.....	27
Tableau 8: les valeurs VCEAC de l'extrait <i>R. graveolens</i> mesurée par le test du Phospho molybdate	28
Tableau 9: valeurs d'IC ₅₀ trouvées pour l'extrait de <i>R. graveolens</i> de test l'ABTS	29
Tableau 10: les valeurs VCEAC de l'extrait de <i>R.graveolens</i> pour le test de FRAP	29

Introduction
Générale

À travers les âges, les humains ont compté sur la nature pour subvenir à leurs besoins fondamentaux en matière de nourriture, d'abri, de vêtements et de soins médicaux. Où les plantes médicinales sont utilisées dans le but de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé humaine car elles possèdent des propriétés thérapeutiques exceptionnelles. **(Svoboda et Svoboda, 2000).**

Aujourd'hui, alors que la médecine moderne continue de se développer, l'intégration des pratiques de médecine traditionnelle, y compris l'utilisation des plantes médicinales, suscite un intérêt croissant, ce qui souligne l'importance de poursuivre la recherche scientifique pour mieux comprendre leurs effets, leurs mécanismes d'action et leurs applications cliniques potentielles. **(Harrar, 2012)** L'Organisation mondiale de la santé estime qu'environ 81 % de la population mondiale utilise les préparations traditionnelles à base de plantes comme soins de santé primaires. **(World Health Organizations, 1993).**

L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles **(Aberkane, 2006).**

En fait, ses propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de milliers de composés naturels appelés métabolites secondaires, comme les polyphénols. On les retrouve dans toutes les parties des plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois). Les polyphénols suscitent un intérêt croissant dans la recherche pharmaceutique et nutritionnelle en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé, notamment leurs propriétés antioxydants **(Boizot et Charpentier, 2006).**

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de recherche actuels dont l'objectif principal est d'étudier les activités antioxydants et antifongiques de l'extrait brut de *Ruta graveolens* (*Fidjel*), connu pour sa richesse en produits métaboliques secondaires, notamment en huiles essentielles et alcaloïdes. Cette activité antioxydant des extraits suscite un intérêt croissant dans le domaine de la valorisation des plantes médicinales, en raison de leurs applications potentielles dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et alimentaire **(Baba Aissa, 1999).**

Ainsi, Le présent travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques surtout l'activité antioxydant. Un important pour mieux comprendre et exploiter son potentiel thérapeutique et nutraceutique.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de Trois chapitre.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique des *Ruta graveolens* (les caractères botaniques et la systématique) des différentes espèces végétales, l'intérêt biologique et quelques travaux antérieurs réalisés sur cette plante et les composés phénoliques, leur biosynthèse, les huiles essentielles en présentant leurs différentes structures chimiques, ainsi que leur intérêt thérapeutique.

Dans le deuxième chapitre, nous avons envisagé la partie expérimentale qui se déroule en Deux axes :

Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction et la détermination des teneurs en Composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes).

Dans le deuxième axe, nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des plantes par quatre techniques chimiques (piégeage du radical DPPH, test phospho molybdate et test de FRAP, enfin test de l'ABTS).

Dans le troisième chapitre, nous avons présentés la discussion des résultats obtenus.

Enfin le travail est clôturé conclusion.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I. Généralités sur la plante étudiée

I.1. La plante *Ruta graveolens*

I.1.1. Description botanique

C'est une plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (**Baba Aissa, 1999**). Les feuilles mesurent entre 6 et 12 cm, sont aromatiques, ovales, larges et bleu-vert. Elles présentent de nombreux lobes oblongs et lancéolés. En été, des fleurs jaunes foncées de 1 à 2 cm de diamètre, à quatre ou cinq pétales frangés de poils, apparaissent en cymes lâches. (**Mioulane, 2004**) (Figure 1). C'est une espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale (**Baba aissa, 1999**).



Figure 1 : Photo de *Ruta graveolens*

I.1.2 Composition chimique

I.1.2.1 Les Alcaloïdes

- **Furoquinoline alcaloïdes** : skimmianine, gamma-fagarine, dictamnine, kokusaginine, pteleine
- **Acridine alcaloïdes**: arborinine- 2-arylquinoline, rutacridone, Gravacridiol (**Waterman, 1975**), choloridone [4, 5-dioxymethylene-11-methylfuro (2, 3-c) acridin-6 (11H)-on] (**Ulu Belen et Terem, 1988**).
- **Quinazoline alcaloïdes** : comme l'arborine
- **Quinoline alcaloïdes** : parmi eux : graveoline, graveolineine (**Waterman, 1975**).

I.1.2.2 Les Huiles volatiles

Le rendement en huiles essentielles diffère selon le lieu de récolte mais généralement les composés les plus rencontrés sont le 2-nonanone et le 2-undécanone (**Merghache et al, 2009, Mejri et al, 2010**).

I.1.2.3 Les Flavonoïdes

Le composant majoritaire est la rutine (2-5%) (**Fleming et al, 2000**).

I.1.2.4 Les Coumarines (**Milesi et al, 2001**)

- a) **Hydroxy-coumarines** : umbelliférone, herniarin, gravelliféron, rutacultin.
- b) **Furo-coumarines** : bergapten, psoralen, xanthotoxin, chalepéensin, isopimpinellin, isoimperatorin, rutarin, rutaretine.
- c) **Pyrano-coumarines** : parmi eux : xanthyletine.

I.1.2.5 Les lignans : Savinine, helioxanthine (**Fleming et al, 2000**).

I.1.3 Usage traditionnel et médicamenteux

Ruta graveolens est une plante ornementale des jardins, sa présence éloigne les vipères (**Le moine, 2001**). Les feuilles fraîches, quoique très amères, sont comestibles, elles sont utilisées pour aromatiser le fromage blanc et dans la préparation d'une beure aux herbes. (**Bilderback, 2007**). Sa sève irrite les peaux sensibles. Les feuilles soignent les phlébites et les varices. Son utilisation est déconseillée pour les femmes enceintes (**Le moine, 2001**). Elle est aussi utilisée contre la gale et les parasites de la tête (**Bonnier, 1999**). Selon (**Duke et al. 2008**), la rue possède plusieurs propriétés thérapeutiques, telles que des effets analgésiques, anti-inflammatoires, antiseptiques, antiparasitaires, et hypotenseurs. Elle est aussi utilisée pour traiter les infections, les spasmes, la fièvre, et favoriser la digestion.

I.2. Composés Phénoliques (POLYPHÉNOLS)

I.2.1. Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. À l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Ralph, 2006).

Chaque classe est caractérisée par la présence d'un noyau benzoïque auquel un ou plusieurs groupes hydroxyles sont directement liés. (Matkowski A., 2008).

Les polyphénols se trouvent dans toutes les parties des plantes supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits, graines, bois). Ils sont produits en réponse à des conditions stressantes (infections, blessures, rayons UV) et participent à des processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la germination et la maturation des fruits. Les principaux types sont les anthocyanes, flavonoïdes et tannins. Leur distribution dans la plante est assez homogène, et ces molécules sont stockées dans les vacuoles des cellules périphériques des épidermes. (Labbani, 2021).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils sont caractérisés par la présence de groupements phénoliques : 1 ou plusieurs cycles aromatique (benzéniques) porteurs de 1 ou plusieurs OH.

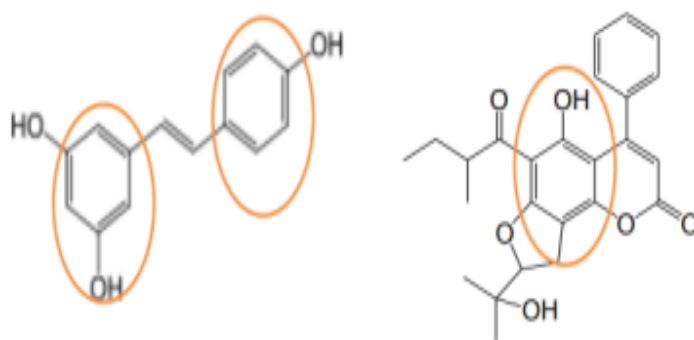


Figure 2 : Groupements Phénoliques de 1 ou Plusieurs OH.

I.2.2. Différentes classes des polyphénols

Les polyphénols sont répartis en différents groupes, définis en fonction de la structure de leur squelette carboné. Les acides phénoliques (C₆-C₁ et C₆-C₃) et surtout les flavonoïdes (C₆-

C_3-C_6) sont les plus fréquemment retrouvés dans le règne végétal. Les lignanes ($C_6-C_3-C_3-C_6$), moins répandus. Le dernier groupe est celui des stilbènes ($C_6-C_2-C_6$) ; le plus connu est le resvératrol, présent dans la peau du raisin. Les flavonoïdes représentent le groupe le plus vaste des polyphénols et le plus largement distribué dans le règne végétal. Plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés. Plusieurs classes de flavonoïdes sont retrouvées dans notre alimentation. Elles diffèrent par le degré d'oxydation du noyau hétérocyclique oxygéné. (Labrani, 2021).

I.2.2.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. Ces molécules sont généralement trouvées conjuguées aux sucres et les acides organiques. (Benhamou, N, 2012).

On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes. (Achat, S, 2013).

Tableau 1: Principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C_6	Phénols simples	Catéchol	
C_6-C_1	Acides hydroxy benzoïques	p-hydroxy benzoïque	Epices, fraise
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique, férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine	Citrus
C_6-C_4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
$C_6-C_1-C_6$	Xanthones	Mangiférine	
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes : * Flavonols * Anthocyanes * Flavanols * Flavanones	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélagonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruit, légumes, fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoïdes	Amentoflavone	
$(C_6-C_3)_n$	Lignines		Bois, noyaux des fruits
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés		Raisin rouge, kaki

I.2.2.2. Acide phénolique

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxy benzoïques et les acides hydroxy cinnamiques.

1. Les acides hydroxy benzoïques

Ils sont les dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (Kebbab. R, 2014), dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (Nkhili Ez., 2009).

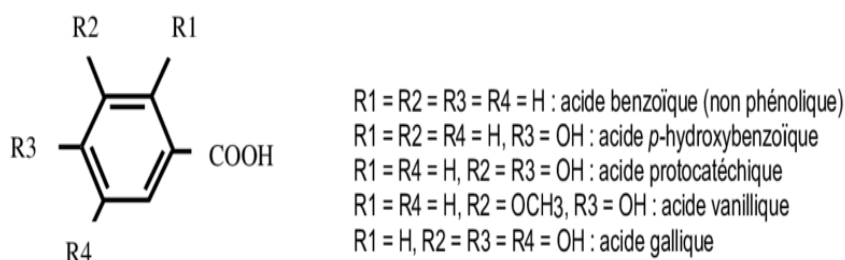


Figure 3 : Quelques exemples des acides hydroxy benzoïques.

2. Les acides hydroxy cinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérivée de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxy cinnamique sont l'acide caféique et l'acide férulique (Kebbab. R, 2014).

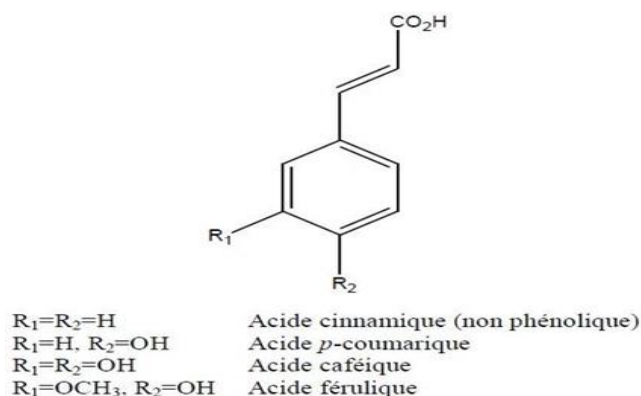


Figure 4 : Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques.

I.2.2.3. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006), ce sont des pigments responsable à la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone

constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (Figure 5) (Lugasi *et al*, 2003).

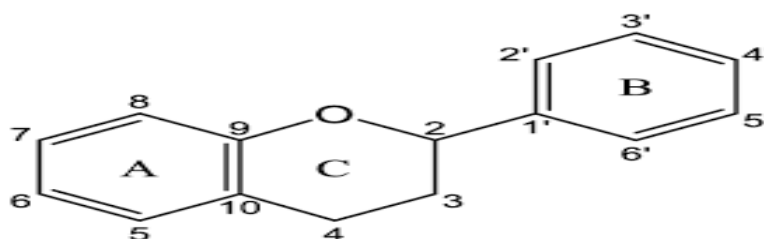


Figure 5 : Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques.

I.2.2.4. Stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison formant un système conjugué. Ils sont de type C₆-C₂-C₆. Ces molécules existent sous leur forme aglycone comme le resvératrol (isomères trans et cis), qui est le principal stilbène chez la vigne, ou encore sous leur forme glycosylée (picéïdes), ou méthylée (ptérostilbènes). Le resvératrol peut également former des oligomères, tels que les viniférines (Khater. F, 2011).

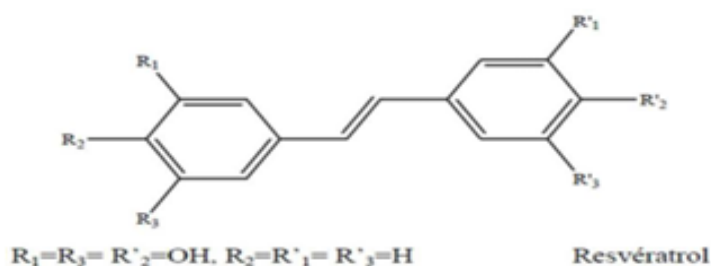


Figure 6 : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes

I.2.2.5. Tanins

Les tanins ont la propriété de précipiter les protéines (Bruneton, 1999), que l'on trouve dans des nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et les fruits... etc. (Macheix et al, 2005).

On distingue deux types, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Nkhili, 2009).

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (Figure 7) sont des ester d'acide gallique ou un de ses dérivés (acide éllagique, chébulique ou vaonique) (Haslam, 1996), par hydrolyse enzymatique ou

acide, ils donnent des sucres de l'acide gallique et ces différents dérivés parmi lesquels : l'acide ellagique est le plus importants (Djahra, 2015).

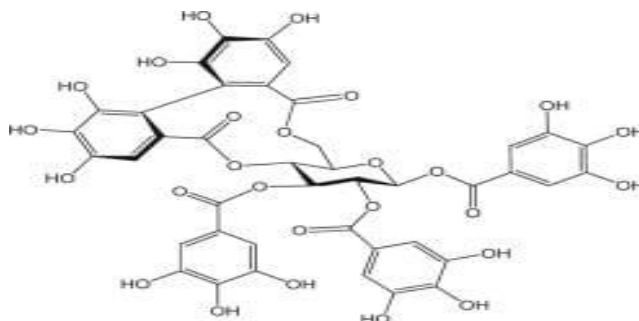


Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables.

➤ Tanins condensés

Les tanins condensés (Figure 8) sont désignés aussi sous le nom de "tanins catéchiques" et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides (Haslam, 1996).

Les tanins condensés ou prothocyanidols sont des polymères flavoniques, constitués d'unités de flavon-3-ols (catéchines) liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, résultante du couplage entre le C-4 électrophile d'un flavonyle issu d'un flavon-4-ol ou d'un flavon-3,4-diol (leuco anthocyanidines) (Ribereau-Gayon., 1968). Ils ont tendance à se polymériser pour donner des produits de coloration rouge ou brune (Roux et Catier, 2007), de poids moléculaire élevé (de 1000 à 30 000) et une forte affinité pour les protéines (Jarrige *et al*, 1995). On les trouve dans la pellicule, les pépins et les rafles du raisin, ainsi que dans les parties périphérique des divers fruits ou légumes (Dacosta, 2003).

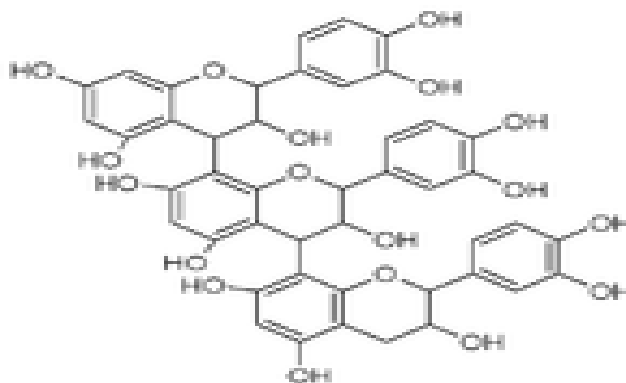


Figure 8 : Structure des tanins condensés

I.3. Antioxydants synthétiques

I.3.1. Définition d'un Antioxydant

Consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaires (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les polyphénols pris lors d'un repas permettraient de lutter contre l'oxydation du mauvais cholestérol (LDL). Cela empêcheraient ainsi les phénomènes à l'origine de l'obstruction des artères.

I.3.2. Les antioxydants

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des faibles Concentrations comparées à celles d'un substrat oxydable retarde ou empêche de Manière significative l'oxydation de ce substrat. Le terme substrat oxydable englobe les Protéines, les lipides, les glucides, et l'ADN (**Cadehas et Packer, 2002**). La nature des systèmes antioxydants varie. Les défenses antioxydants de notre organisme peuvent se diviser en deux systèmes : enzymatiques et non enzymatiques.

I.3.2.1. Antioxydants enzymatiques

Représentés principalement par trois enzymes :

- Le super oxyde dismutase (SOD).
- La catalase.
- La glutathion peroxydase (GPx).

I.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules pro-oxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton (**Piquet et Hébuterne, 2007**).

Ces agents piègeurs possèdent plusieurs avantages par rapport aux antioxydants enzymatiques, en particulier par leur petite taille qui leur permet de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre facilement leurs cibles. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

a. Vitamine E

Le terme générique de vitamine E désigne en fait la famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma chez l'homme. L' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singlet (O_2) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH^\bullet) mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) pour former un radical tocophéryl.

b. Vitamine C

L'acide L'ascorbique ou vitamine C est présent le plus couramment sous forme d'ascorbate. Il est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles et de l'oxygène singlet (**Evans, 2000**). Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueuses, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et lipoprotéines.

Pour la partie d'antioxydante non enzymatiques, le tableau suivant rassemble les principaux antioxydants non enzymatiques et leurs sources alimentaires associées (Tableau 2) :

Tableau 2 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β -carotène	Légumes et fruits orangés et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin

I. 3.3. Radical libre

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (molécule ou un atome) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés au niveau de son orbitale externe (**Halliwelle, 1989**). Ils sont instables, très réactives et qui possèdent un temps de demi-vie extrêmement courte (10⁻⁹ - 10⁻⁶ Seconde) (**Thiebault et Sprumont, 1998**). De par leur structure particulière, ils ont tendance à attirer les électrons des autres atomes et molécules pour gagner la stabilité (**Delattre et al, 2003**).

I. 3.4. Stress oxydatif

Le stress oxydant, ou stress oxydatif, résulte d'une oxydation excessive dans le corps. L'oxydation est une réaction chimique entre l'oxygène et d'autres substances, libérant des radicaux libres, qui sont des molécules instables. Ces radicaux sont nécessaires au bon fonctionnement du corps, mais deviennent nuisibles en excès, endommageant les cellules et causant des problèmes de santé. Heureusement, les antioxydants présents dans le corps aident à éliminer ces radicaux libres, en ralentissant ou en empêchant l'oxydation. (**Breton, laboratoire lescuyer, 2021**).

I. 3.5. Mécanisme d'action des Antioxydants

Les antioxydants agissent contre l'oxydation de deux manières principales : soit en protégeant les lipides contre les initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la propagation de la chaîne d'oxydation. (**Léger, C.I. 2006**).

Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs empêchent ou piègent la formation des dérivés réactifs de l'oxygène responsables de l'initiation de l'oxydation. Dans le second cas les antioxydants dits briseurs de chaînes arrêtent les radicaux propagateurs de l'oxydation. (**Laguerre et al., 2007**).

Les antioxydants phénoliques d'origine végétale consommés par l'homme permettent de compléter l'action des antioxydants endogènes. Leurs capacités à céder un électron permet de lutter contre les espèces actives de l'oxygène, les espèces réactives de l'azote et de rétablir le potentiel antioxydant des vitamines A, E et C. (**Bahri. M, 2010**).

Chapitre II
Partie expérimentale

II. Matériels et méthodes

Notre travail de recherche est réalisé au niveau du laboratoire de génie des procédés de l'université Amar Thelidji de Laghouat, l'ensemble des méthodes expérimentales que nous avons mené dans ce travail se structure comme illustré l'organigramme suivant :

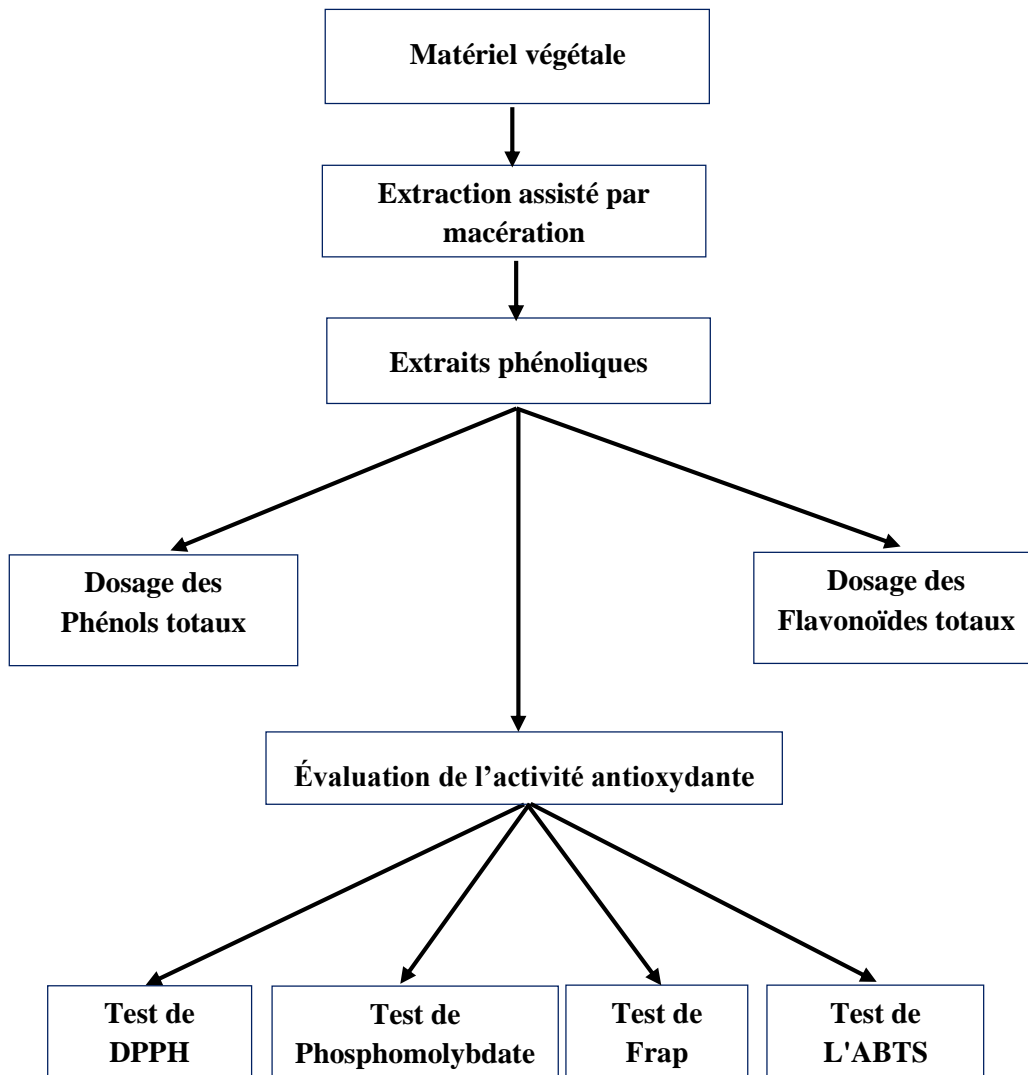


Figure 9 : Organigramme expliquant les différentes étapes dans ce travail

II.1. Produits Chimiques et Instruments

L'ensemble des Produits Chimiques et Instruments utilisé pour réaliser cette étude est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Produits Chimiques

Produit	Marque
Methanol (CH₃-OH)	SIGMA-ALDRICH
Ethanol (C₂H₆O)	SIGMA-ALDRICH
Folin-Ciocalteu	SIGMA-ALDRICH
Carbonate de sodium (Na₂CO₃)	SIGMA-ALDRICH
Mono molybdate d'ammonium (NH₄)₂MoO₄	BIOCHEM
Acide ascorbique (vitamin C) (C₆H₈O₆)	ANALAR NORMAPUR
Rutine (C₂₇H₃₀O₁₆)	SIGMA-ALDRICH
Chlorure d'aluminium (AlCl₃)	MERCK
DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆)	ALADRICH
Acide sulfurique (H₂SO₄)	SIGMA-ALDRICH
Hexacyanoferrate de potassium (K₃ [Fe (CN) ₆])	SIGMA-ALDRICH
Acide gallique (C₇H₆O₅)	SIGMA-ALDRICH
Phosphate mono potassique (KH₂PO₄)	SIGMA-ALDRICH
Phosphate di potassique (K₂HPO₄)	SIGMA-ALDRICH
Chlorure ferrique (FeCl₃)	BIOCHEM
Phosphate di sodique (Na₂HPO₄)	SIGMA-ALDRICH
Acide trichloro acétique (C₂HCl₃O₂)	SIGMA-ALDRICH
I'ABTS (C₁₈H₂₄N₆O₆S₄)	SIGMA-ALDRICH

Tableau 4 : Les Instruments

Instrument	Marque
Chauffe-ballon	VELP
Spectrophotomètre UV-vis	SHIMADZU
Etuve	Memmert
Balance électrique	KERN ABS
Moulin à café	Moulinex
Micropipette	EASY
Bain-marie	Memmert
Micropipette	Socorex

II.2. Préparation des échantillons

Les échantillons de la partie arienne de *R.graveolens* ont été récoltés de la région Ben Nacer Ben Chouhra (Wilaya de Laghouat) durant les premières semaines de mois Janvier 2025. La partie aérienne a été séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées la plante a été réduite en poudre puis soumise à l'extraction.

II.3. L'extraction des composés phénoliques

Le protocole d'extraction des polyphénols à partir de poudre de *R.graveolens* est basé sur la méthode de macération (solide /liquide) qui consiste à immerger 5 g de poudre (solide) dans 100 ml du solvant (liquide) contenant 70 ml d'éthanol et 30 ml d'eau distillée pendant 72 h sous agitation à 4°C. Le mélange a été filtré sur un papier filtre. L'extrait obtenu est conservé dans un flacon ombré en verre dans un réfrigérateur à -4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

II.4. Analyse quantitative

II.4.1. Dosage de polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *R.graveolens* a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al*, 2007).

On met 100 µl d'extrait de *R.graveolens* et l'acide gallique sont mélangés avec 200 µl du réactif Folin-Ciocalteu à 10 % et 2 ml d'eau distillée, après 2 min on ajoute 1ml de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV-visible.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g E MS). En utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique comme référence.

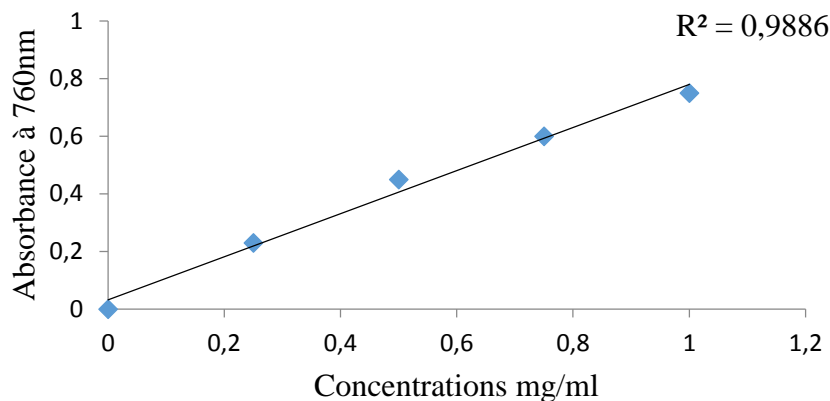


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II.4.2. Dosage de flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al*, 1996**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait de *R.graveolens*. 1 ml d'échantillon ou standard la rutine (préparés dans l'éthanol) est ajouté à 1,5 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2% dans le méthanol). Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la rutine (0-0,1 mg/ml) et est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme de matière sèche (mg ER/mg MS).

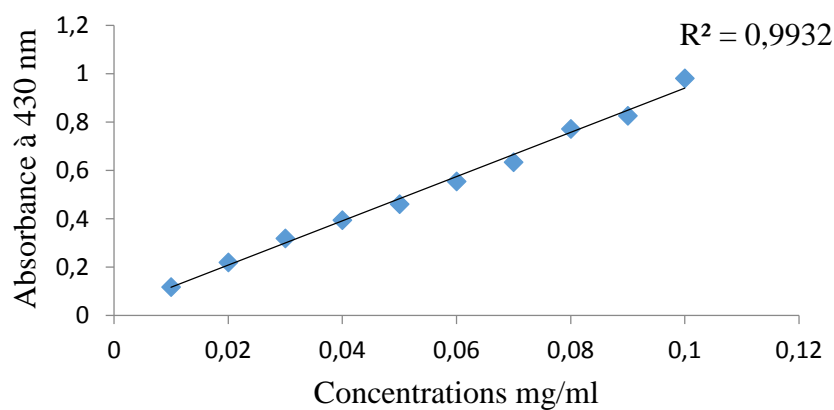


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la rutine.

II.5. Évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou d'un mélange (l'extrait phénolique) sont nombreuses. Parmi lesquelles on a adopté les méthodes : la méthode de DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle), et la méthode de phosphomolybdate, la méthode de FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power) et la méthode de l'ABTS.

II.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

II.5.1.1. Principe

La DPPH est un radical organique azoté avec un électron délocalisé, et cette caractéristique lui donne une coloration violette, avec une absorbance maximale à 517 nm. Le test est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants à réduire la DPPH. Cette réduction peut être mesurée par la décoloration de la couleur violette dans son absorbance (**San Miguel-Chavez, 2017**).

Le DPPH est caractérisé par une couleur violée. En présence d'un donneur d'hydrogène. Le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine) (Figure 12).

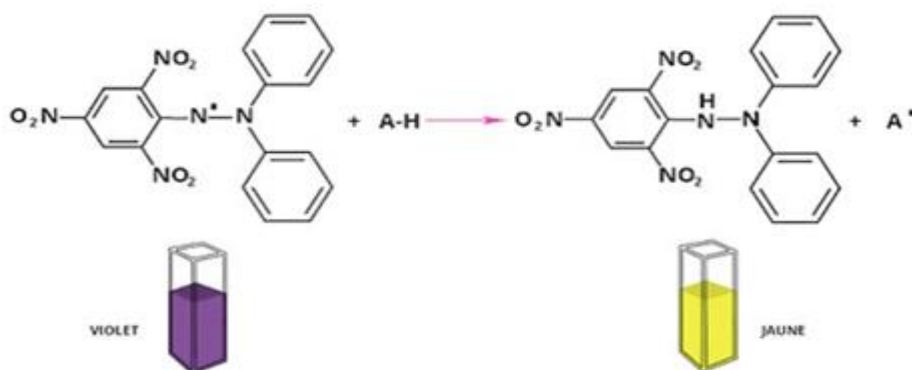


Figure 12 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH

II.5.1.2. Mode opératoire

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée dans le protocole suivant ; dans des tubes on introduit 200 µl de chaque extrait et 1.8 ml de la solution méthanolique au DPPH, après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (PI %) en utilisant la formule suivante :

$$PI (\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

PI(%) : pourcentage d'inhibition

A_{control} : l'absorbance du milieu réactionnel sans l'antioxydant

A_{test} : l'absorbance du milieu réactionnel avec l'antioxydant

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur d'IC₅₀, sachant que l'IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

Le calcul des IC₅₀ a été réalisé graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. La valeur de l'IC₅₀ est exprimée en mg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

II.5.2. Test de Phosphomolybdate

II.5.2.1. Principe

La méthode de (Prieto *et al*, 1999) a été employée pour évaluer la capacité réductrice des extraits phénoliques. Cette méthode est basée sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V) en présence de l'antioxydant. Cette réduction, se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre à un pH acide détectable dans le visible à 695 nm.

II.5.2.2. Mode opératoire

0,2 ml de chaque extrait dilué est ajouté à 2 ml de la solution de réactif phosphomolybdique contenant le Molybdate d'ammonium (1.483%), phosphate de sodium (0.766%) et l'acide sulfurique (10%) préparé dans l'eau distillée. Le mélange a été placé dans un bain marie à une température 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement à une température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant différentes concentrations de la vitamine C ; les résultats sont exprimés comme (mmole de vitamine C) par g et la capacité réductrice exprimés en tant qu'équivalent de la vitamine C.

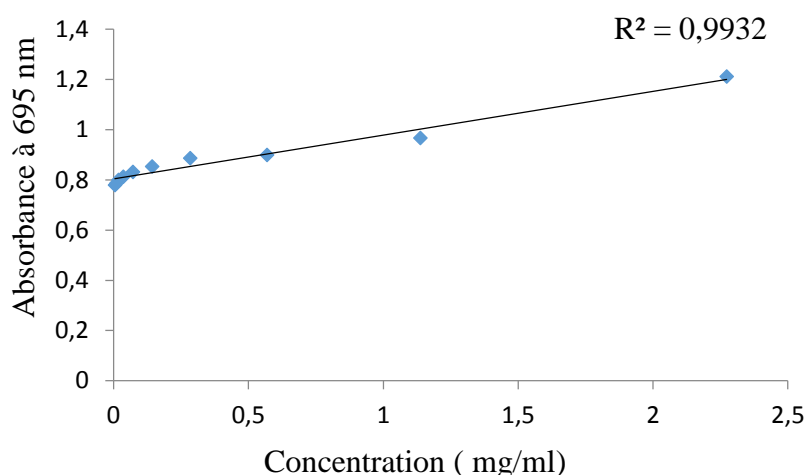


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

II.5.3. Test de FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique)

II.5.3.1. Principe

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de pro-oxydants.

Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale.

Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante.

L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxyde- réduction.

La méthode de FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique. La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode adaptée par **(Hinneburg,1998)**.

Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)- TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu-vert, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (Figure 14).

La variation de la coloration est mesurée à 700 nm **(Bassene, 2012)**.

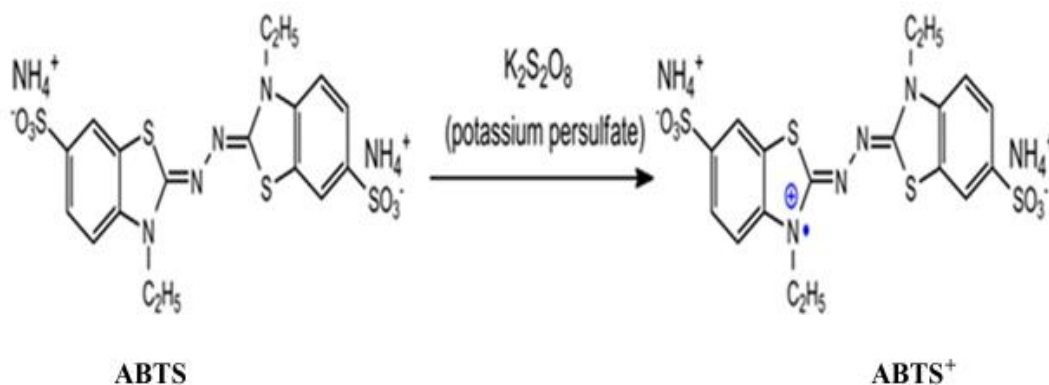


Figure 15 : Formation d'un radical ABTS (ABTS⁺) stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium.

II.5.3.2. Mode opératoire

La solution ABTS⁺ était préparée en mélangeant 7 ml de sel ABTS avec 2.45 ml de persulfate de potassium dans 25 ml d'eau distillée, à la température ambiante dans l'obscurité et conservée pendant 16 h avant l'utilisation. La solution ABTS⁺ a été diluée avec de l'éthanol à 95% (environ 600 μ L ABTS⁺ à 40 ml d'éthanol à 95%), afin d'obtenir une absorbance de 0,7 à 0,8 à 734 nm. 100 μ l d'extrait est ajouté à 1.9 ml de la solution radicalaire d'ABTS⁺. Le mélange est incubé à 37°C à l'abri de la lumière pendant 15 min. Un contrôle constitué de 100 μ L de MeOH et de 1.9 ml de la solution d'ABTS⁺ est lu avec chaque série d'extrait à 734 nm. L'éthanol à 95% utilisé comme un blanc. Tous les tests sont reproduits au moins trois fois (Dorman et Hiltunen, 2004).

Chapitre III
Résultats Et
Discussions

III.1. Dosage de polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénol totaux dans l'extrait de notre plante sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Teneurs en phénols totaux de *R.graveolens*

L'extrait de <i>R. graveolens</i>	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g MS)
Hydroéthanolique	3,36 ± 1,47

Les résultats ont montré que l'extrait de *R.graveolens* représente une teneur considérable en phénols totaux de (3,36 ± 1,47 Mg EAG/g MS).

Ce résultat est similaire à celui trouvé par **(Belaid et Bellil 2017)** qu'ils ont étudié les feuilles de *R.graveolens* de Mostaganem (4,163 ± 0,394 mg EAG/g).

Ainsi, **Djeridane et al. (2006)** ont rapporté que les feuilles de *R.graveolens* contenaient 3.13 mg GAE/g de polyphénols totaux.

La comparaison des teneurs en phénols totaux avec celles rapportées par *Ruta sp.* a montré la richesse de ces espèces par rapport *R.graveolens*. Selon l'étude de **(Charif et Allou 2015)**, la teneur en phénols totaux des feuilles de *R.graveolens* est de (160,21 ± 7,29 µg EAG/mg) d'extrait.

Tant que les teneurs en polyphénols d'extrait méthanolique de *Ruta montana* L. et de *Ruta tuberculata* Forsk. sont (26,62±1,93 et 20,36±0,48 µg EAG/ mg) respectivement **(Chaibeddra, 2014)**.

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes de l'extrait de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la rutine et exprimées en équivalents de mg de la rutine par gramme de matière végétale sèche.

Les flavonoïdes contenus dans notre extrait phénolique est déterminé par la complexation des phénols par le trichlorure d'aluminium.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Teneur en flavonoïdes de *R. graveolens*

L'extrait de <i>R. graveolens</i>	Teneur en flavonoïdes (mg ER/g MS)
Hydroéthanolique	1,12± 0,38

La teneur en flavonoïdes de l'extrait hydroéthanolique de *R. graveolens*, elle est de l'ordre de (1,12± 0,38 Mg ER/g MS).

A titre de comparaison de notre étude avec la littérature, ce résultat est similaire à celui des feuilles de *R. graveolens* de Mostaganem étudié par (**Belaid et Bellil 2017**) qu'ils ont trouvé un teneur en flavonoïdes de (1,397 ± 0,033 mg EQ/g E).

Tandis que, nos teneurs sont comparables à celle trouvée par (**Diwan et al. 2012**) qui ont trouvé (0.4 mg EQ/g E).

Selon l'étude de (**Charif et Allou 2015**), la teneur en flavonoïdes des feuilles de *R. graveolens* est de (17,97± 0,05 µg EQ/mg) d'extrait. Tant que les teneurs d'extrait méthanolique de *Ruta montana* L. et de *Ruta tuberculata* Forsk. Sont (44,54 ±1,40 et 19,67 ± 0,34 µg EQ/mg) respectivement (**Chaibeddra, 2014**).

Il est important de souligner que l'utilisation d'espèce de plante, d'origine géographique et climatique distinctes ainsi que des méthodes d'extraction et de dosage différentes réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les différents études.

D'autres facteurs peuvent influencés la teneur en phénols à savoir : l'espèce, l'exposition à la lumière et les technique de récolte et de stockage (**Turkmen Erol et al, 2009 ; Rawel et al, 2005**) in. Les contraintes environnementales de développement des plantes : la sécheresse, la chaleur, les rayons ultraviolet, la pollution de l'air et les attaques d'agents pathogènes (**Chehma.A, 2006**).

III.3. Activité antioxydante

Dans notre étude, nous avons utilisé quatre tests afin d'évaluer l'activité antioxydante in vitro : DPPH, FRAP, Phosphomolybdate et l'ABTS, ces tests sont différents les uns des autres sur le plan de leurs principes, les conditions expérimentales et leur potentiel antioxydant via les extraits.

III.4. Le Test de Piégeage du Radical DPPH

Le radical DPPH[•] est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al*, 2008). L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH[•] à 515 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donateurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (Maisuthisakul *et al*, 2007, Da Silva Pinto *et al*, 2008).

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ qui est défini comme étant la concentration de l'extrait exprimée nécessaire pour balayer 50% du radical DPPH et calculée à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction de la concentration de chaque extrait. De même, L'efficacité est estimée à partir de l'activité de l'acide ascorbique, BHA, BHT comme références standards. Il faut rappeler que plus la valeur d'IC₅₀ est petite plus l'activité antioxydante de l'extrait est grande.

Les résultats obtenus de ce test sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 7: valeurs d'IC₅₀ trouvées pour l'extrait de *R. graveolens* et les standards de test de DPPH.

Les extraits	IC ₅₀ (mg /ml)
hydroéthanolique de <i>R. graveolens</i>	0,031±0,012
Acide ascorbique	0.001±0.005
BHT	0.0013±0.002
BHA	0.0079±0.0004

Selon les résultats obtenus, l'extrait de *R. graveolens* est doté d'un pouvoir antioxydant intéressant, son IC₅₀ est de (0,031±0,012 mg/ml), mais cette valeur d'activité reste inférieure à celle du contrôle positif BHA, BHT et l'acide ascorbique d'IC₅₀ (0.0079±0.0004 ; 0.0013±0.002 ; 0.001±0.005 mg/ml respectivement).

L'extrait de *R. graveolens* possède plus grand potentiel de piégeage des radicaux DPPH (100,8 ± 0,56 mg GA/g d'extrait sec) (Al Qaisi *et al*, 2024).

L'activité antioxydante de notre extrait éthanolique de *R.graveolens* est nettement supérieur à celle obtenu par (Charif et Allou, 2015), avec une IC₅₀ égale à $0,155 \pm 0,00115$ mg/ml.

III.5. Test de Phosphomolybdate

La capacité antioxydante s'exprime par la réduction de l'ion Mo (VI) en Mo (V), La Complexation de ce dernier avec le phosphate abouti à une couleur verte dont l'intensité est Proportionnelle à la concentration de l'extrait (Prasad *et al*, 2009).

L'activité antioxydante est mesurée selon un nouveau terme appelé VCEAC (vitamine C Equivalent Antioxydant Capacité). On définit le VCEAC comme la concentration molaire de la solution de vitamine C qui possède un pouvoir réducteur équivalent à solution de concentration 1 M de composé étudié.

L'évolution de l'activité antioxydante de nos extraits de *R.graveolens* est comparée par rapport à l'acide ascorbique (vitamine C) Le paramètre VCEAC, plus la valeur de VCEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important. La valeur de VCEAC calculé pour l'extrait est regroupée dans le tableau 7.

Tableau 8: les valeurs VCEAC de l'extrait *R. graveolens* mesurée par le test du Phospho molybdate

Extrait	Test de Phospho molybdate VCEAC(M)
Extrait Hydroéthanolique de <i>R. graveolens</i>	$0,0038 \pm 0,0011$

Pour le test de phosphomolybdate, l'extrait hydroéthanolique de *R.graveolens* montré une valeur antioxydante totale de VCEAC de $(0,0038 \pm 0.0011$ M), donc le résultat montre que l'extrait éthanolique de *R.graveolens* possède un pouvoir réducteur faible.

Egalement, des autres études sont menues sur *R.graveolens* dont le travail de (Renia *et al*, 2012).a possède un pouvoir réducteur de fer (146, 119 equivalents of ascorbic acid $\mu\text{mol/g}$ of extract).

III.6. Test de (l'ABTS)

La capacité du produit à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber, aussi bien les phases d'initiation que de propagation, implique la création de radicaux. Dans le test l'ABTS, l'activité antioxydant totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le

radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

L'extrait de *R.graveolens* ainsi que l'antioxydant standard (Trolox) à inhiber le radical-cation ABTS^{•+} sont évalués et les résultats exprimés en IC₅₀ sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9: valeurs d'IC₅₀ trouvées pour l'extrait de *R. graveolens* de test l'ABTS et le standard et TROLOX

Extraits	IC ₅₀ (mg /ml)
Extrait hydroéthanolique de <i>R.graveolens</i>	0,037±0,002
TROLOX	0,004 ± 0.0002

Ces résultats indiquent que l'extrait hydroéthanolique de *R.graveolens* est un bon potentiel du radical ABTS^{•+}, leur IC₅₀ a de valeur (IC₅₀= 0,037±0,002 mg/ml) et faible par rapport le Trolox avec une IC₅₀ égale à (0.004±0.0002 mg/ml).

En définitif, on peut dire que l'extrait éthanolique de *R.graveolens* possède une activité antioxydante élevée à réduire le radical ABTS. (Renuka *et al*, 2012), dans ses travaux sur les extraits de *R.graveolens* notent des valeurs EC₅₀ contre l'ABTS sont 65 et 115 µg/ml.

III.7. Test de la réduction du fer (FRAP)

Par ce test, on évalue la capacité d'un composé à transformer le Fe³⁺ en Fe²⁺. On détermine ainsi la capacité de ce composé à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante.

Tableau 10: valeur VCEAC de l'extrait de *R.graveolens* pour le test de FRAP

Extrait	VCEAC(M)
Extrait Hydroéthanolique de <i>R. graveolens</i>	0,014±0,002

Pour le test de FRAP, L'extrait hydroéthanolique de *R.graveolens* possède une capacité antioxydant totale faible avec une valeur de VCEAC (0,014±0,002 M).

Selon Al Qaisi *et al*, 2024. La capacité antioxydante mesurée par le test FRAP était plus élevée dans l'extrait de *R.graveolens* (91,2 ± 1,33 mg GA/g d'extrait sec).

En générale, l'extrait hydroéthanoïque a donné les meilleurs résultats en termes d'activité antioxydant dans presque tous les tests effectués, ce qui signifie que le pouvoir antioxydant de extraits est directement proportionnel à la polarité des solvants utilisés.

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Le dépistage d'agents bioactifs à partir de ces plantes est l'un des axes le plus intensif dans la recherche des produits naturels aujourd'hui, La plante médicinale *R.graveolens* « Fidjel », espèce spontanée, très abondante en Algérie est parmi les plantes largement utilisées en médecine traditionnelle en Algérie.

Cette étude a pour but de contribuer à l'étude des composés phénoliques et activités antioxydante de l'extrait de *R.graveolens*, les résultats ont montré que l'extrait de cette plante a des activités antioxydante intéressantes. Quantitativement, l'évaluation du contenu de l'extrait en polyphénols totaux adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes de polyphénols ($3,36 \pm 1,47$ Mg EAG/g MS). De même le dosage des flavonoïdes, a montré que contient une quantité considérable de flavonoïdes de l'ordre de ($1,12 \pm 0,38$ Mg EAG/g MS).

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait selon la méthode du radical libre DPPH et l'ABTS a montré que l'extrait possède une activité antioxydante intéressante dont la valeur d'IC₅₀ est $0,031 \pm 0,012$ et $0,037 \pm 0,002$ mg/ml respectivement .D'autre part, l'activité antioxydant par la méthode de de phosphomolybdate et de réduction de fer a montré que l'extrait hydroéthanolique possède un pouvoir réducteur faible dont la valeur de VCEAC est ($0,0038 \pm 0,0011$, $0,0141 \pm 0,002$ M respectivement)

L'étude sur *R.graveolens*, nous a permis de remarquer la diversité au sein de cette espèce, de point de vue composition qu'activité.

Afin de mieux évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait brut :

- Il est très important d'extraire et de tester les activités biologiques des huiles essentielles de cette plante.
- Séparer et caractériser les composés bioactives responsables des activités obtenues qui pourront répondre aux différents problèmes.
- De plus, des études comparables in-vivo visant d'autres marqueurs biologiques sont également nécessaires.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de *R.graveolens* comme plante médicinale traditionnelle très largement utilisée par les populations du nord de l'Afrique.

Références

A

- **Aberkane M.C., 2006** : Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse de doctorat. Batna, 163.
- **Amarawicz, R., Pegg, R. B., Rahim-moghaddam, Bari, B., Weil, J.A. (2004)**. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairie. *Food chemistry* 84, 551-562.
- **AlQaisiYaseen, Ibrahim Alfarrayeh, Ahmad Alsarayreh, Khaled Khleifat, Noor Abu-Nwas** . **Assessment of antioxidant potential, cytotoxicity, and anticancer activity of methanolic extracts from selected wild medicinal plants**. *Phytomedicine Plus* Volume 4, Issue 2, May 2024, 100534.

B

- **Baba iassa F., 1999** : Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA, 243 - 244.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M et Gazin M., 1996** : Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-forschung* 46: 1086-1094.
- **Bahri, M. (2010)**. Analyse génétique du métabolisme de l'acide caftarique, chlorogénique et chicorique chez *chicoriumintybus* L. : cartographie des QTL et gènes candidats Thèse de Doctorat en Sciences de Université de Lille 1. 230 p.
- **Bassene, E. (2012)**. Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction-Analyse-Essais Biologiques. Presses Universitaires de Dakar.
- **Bilderback L., 2007**: Spices and Herbs; Ed: ALPHA BOOKS, 177-178.
- **Boizot, N. Charpentier, J.P. 2006** : Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA, 79-82.
- **Bonnier G., 1999** : La Grande Flore en Couleur ; Ed : BELIN ; Tome 3, 205 - 206.
- **Bruneto J., 1999**. Pharmacognosie phytochimie plante médicinales. édition N 3 : Tec et Doc, Paris, 1120p.
- **Breton, L. (2019)**. laboratoire les cuyer. Récupéré sur <https://www.laboratoire-lescuyer.com/blog/nos-conseils-sante/stress-oxydant-et-antioxydants-comprendre-pour-mieux- vieillir>.
- **Berger, M.M. (2006)**. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 20(1), 48-53.

C

- **Cadehas E and Packer L.2002**. Hand Book Of Antioxidant Second And Expanded, P. 4.
- **Chaibeddra, Z., (2014)**. Etude comparative des substances bioactives chez *ruta montana* L. et *ruta tuberculata* forsk. Magister. Université El Arbi Ben M'Hidi-Oum ElBouaghi.
- **Charif Nour el houda et Allou Hanane. 2015**. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* de la région de Bordj Bou Arreridj. Mémoire de master. Université El Arbi Ben M'Hidi-Oum ElBouaghi.

D

- **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. yves dacosta, paris, 317p.
- **Delattre J., BEAUDEUX J.L., BONNEFONT-ROUSSELOT D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier TEC et DOC, Paris, 587p.
- **Djahra A.B., 2015.** Cours Phytochimie II 2éme Année Master II, Université Echahid Hamma Lakhdar, El Oued, Alger.
- **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem., 97: 654-660.
- **Duke A.J., Duke P.A.K. et Duceille J.L., 2008:** Duke's handbook of medicinal plants of the bible, Ed: CRC PRESS, 394 – 397.
- **Dorman, H., Hiltunen, R.:** Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions, Food Chemistry, 2004, 88, 193-199; essences forestières, Ed. Larose, Paris, PP299-445.

F

- **Fleming T. et al., 2000:** PDR for Herbal Medicines; Ed: MEDICAL ECONOMICS COMPANY, 648-649.
- **Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019).** Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. Antioxidants [Working Title], 11-18.

H

- **Haslam E., 1996.** Natural polyphenole (végétale tannins) as drugs possible modes of action. Journal of nationale production, 59: 205-215.
- **Halliwell B., 1989.** Free radicals, reactive oxygene species and human disease: a critical evaluation with the special reference to atherosclerosis. Br. J Exp. Pathol, (70) : 737-757.
- **Harrar A., 2012.** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Sétife, Alger.

J

- **Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M. H., JOURNET M., 1995.** Nutrition des ruminants domestique : ingestion et digestion. Quae, 921p.

K

- **Khater. F, 2011.** Identification Et Validation Fonctionnelle De Nouveaux Gènes Potentiellement Impliqués Dans La Biosynthèse Des Composés Phénoliques. Thèse De Doctorat. Centre International D'études Supérieurs En Sciences Agronomiques Sup Agro, Montpellier.
- **Kebbab. R, 2014.** Etudes Du Pouvoir Antioxydant Des Polyphénols Issus Des Margines D'olives De La Variété Chamla : Evaluation De L'activité Avant Et Après Dé glycosylation.

L

- **Labrani.** (2021). *fac.umc.edu*. Récupéré sur <https://fac.umc.edu.dz/https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/becol/2022/PrLABBANICompos%C3%A9s%20ph%C3%A9noliques.pdf>.
- **Laguerre, X., Lopez-Girland, J.L., Locomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Fondamental* 14 : 278-292.
- **Le moine E., 2001 :** Les plantes aromatiques et médicinales ; Ed : MOLIERE (Paris), 92.
- **Léger, C.I. (2006).** Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydant, interactions. *Oil seeds and fats, Crops and Lipids* 13, 45-69.
- **Léophonte, P. (2006).** Stress oxydatif et BPCO .Rôle des infections. Prévention. *Médecine et maladies infectieuses* 36(5) ,245-252.
- **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. et Jiang Y., 2007:** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771-776.

M

- **Macheix J.J., Annie S., Christan J.A., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. presses polytechniques et universitaire romondes, Paris, 192p.
- **Matyushchenko N.V. et Stepanova T.A., 2003:** Quantitative determination of the total content of flavonoids in the new phytopreparation Elima. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 37: 261-263.
- **Matkowski A., T. P. (2008).** Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11): 321-330.
- **Merghache S., Hamza M. et Tabti B., 2009 :** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie ; *Afrique Science* 5 (1) : 67- 81.
- **Mioulane P., 2004 :** Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA, 7-50.
- **Milesi S. Massot B., Gontier E., Bourgaud F. et Guckert A., 2001:** *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins; *Plant Science* 161: 189- 199.

N

- **Nkhili Ez., 2009.** Polyphénols De L'alimentation : Extraction, Interactions Avec Les Ions Du Fer Et Du Cuivre, Oxydation Et Pouvoir Antioxydant. Thèse De Doctorat. Université Cadi Ayyad – Marrakech, Université D'Avignon Et Des Pays De Vaucluse- Montpellier.

P

- **Prieto, P, Pineda, M, Aguilar, M:** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*, 1999, 269,337-341.

R

- **Ralph, W. .. (2006).** Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.
- **Ribereau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 202p.

- **Roux D. et Catier O., 2007.** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Groupe Liaisons, France, 141p.
- **Rokia Sanogo., 2006.** Extracts-Analgesic and anti Maytenus senegalensis, Stereospermum kunthianum and Trichilia emetica used in the treatment of dysmenorrhoea in Mali. University of Bamako – Mali 72 : P_258.
- **Renuka Diwan, Amit Shinde, and Nutan Malpathak.** Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Ruta graveolens L. In Vitro Culture Lines. Journal of Botany Volume 2012, Article ID 685427, 6 pages

S

- **San Miguel-Chávez, R. (2017).** Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. Phenolic Compounds – Biological, 59-74
- **Singleton, A., Vernon, L., Rudol, O., Rosa, M., Lamuel, R. (1974).** Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of folinciocalteau. Methodes in enzymologie, 299 ; 152-178.
- **Svoboda K. et Svoboda T.; 2000;** Secretary structures of aromatic and medicinal plants; Ed: MICROSCOPIX PUBLICATIONS; p: 7-12.

T

- **Tsimogiannins D. et Oreplolou V., 2006.** The contribution of flavonoide curing on DPPH free radical scavenging efficiency, acinetic approach for 3', 4'-hydroxy substituted membres innovat. Food science technique, (7): 140-146.
- **Thiebault C.M. et Sprumont P., 1998.** L'enfant et le sport : introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. De boeck et larciers, Paris, 464p.

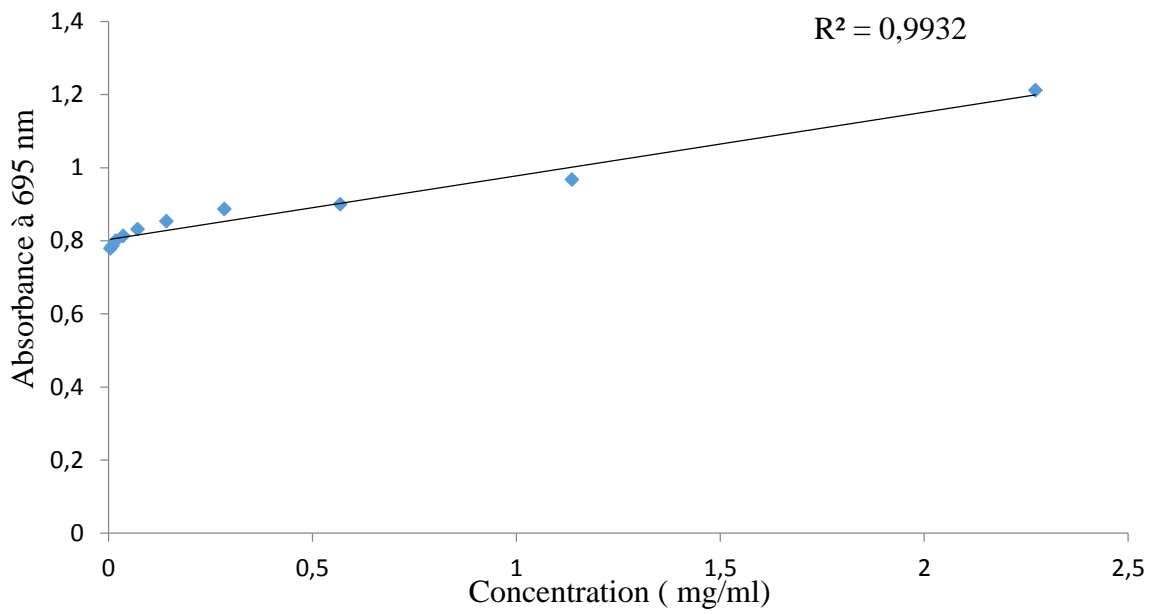
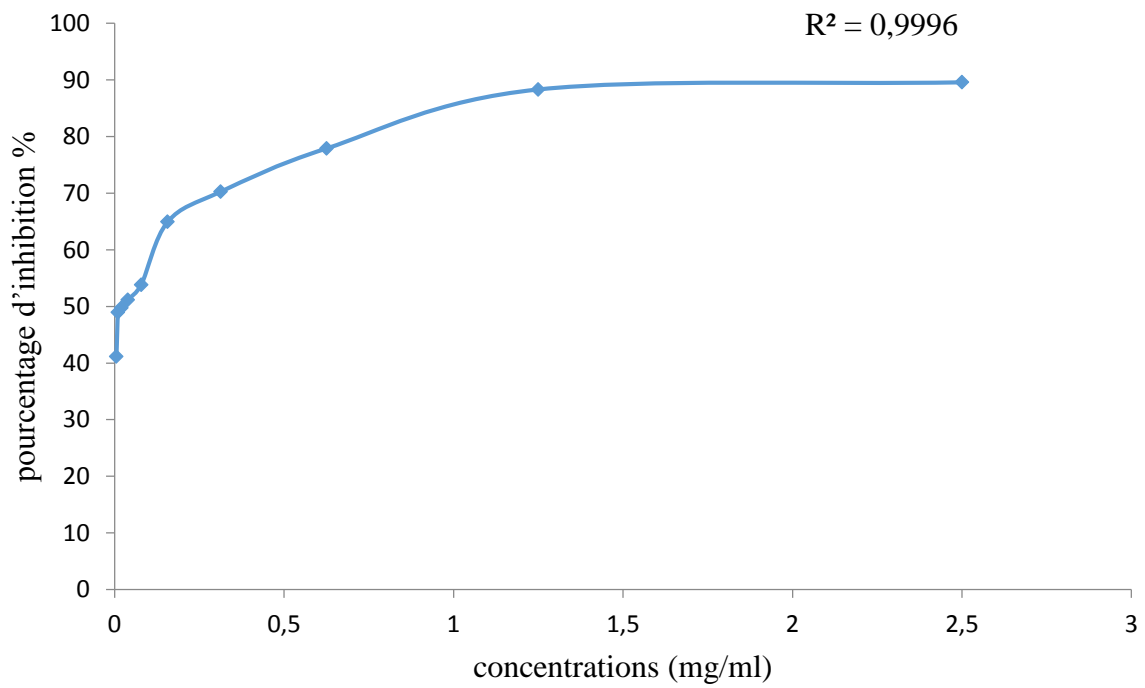
U

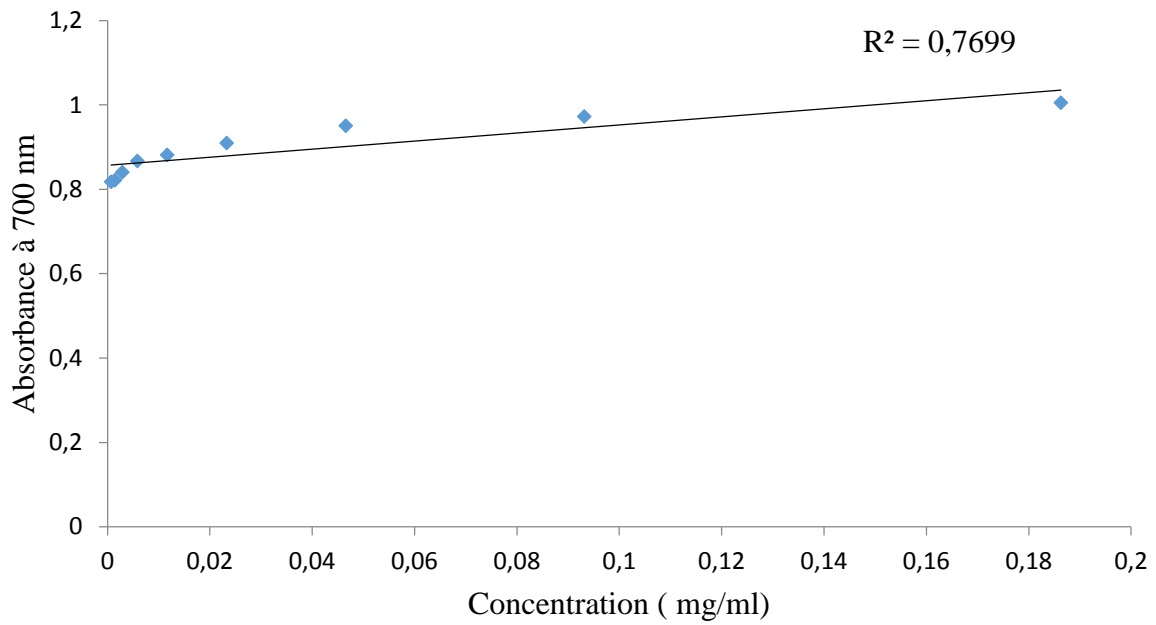
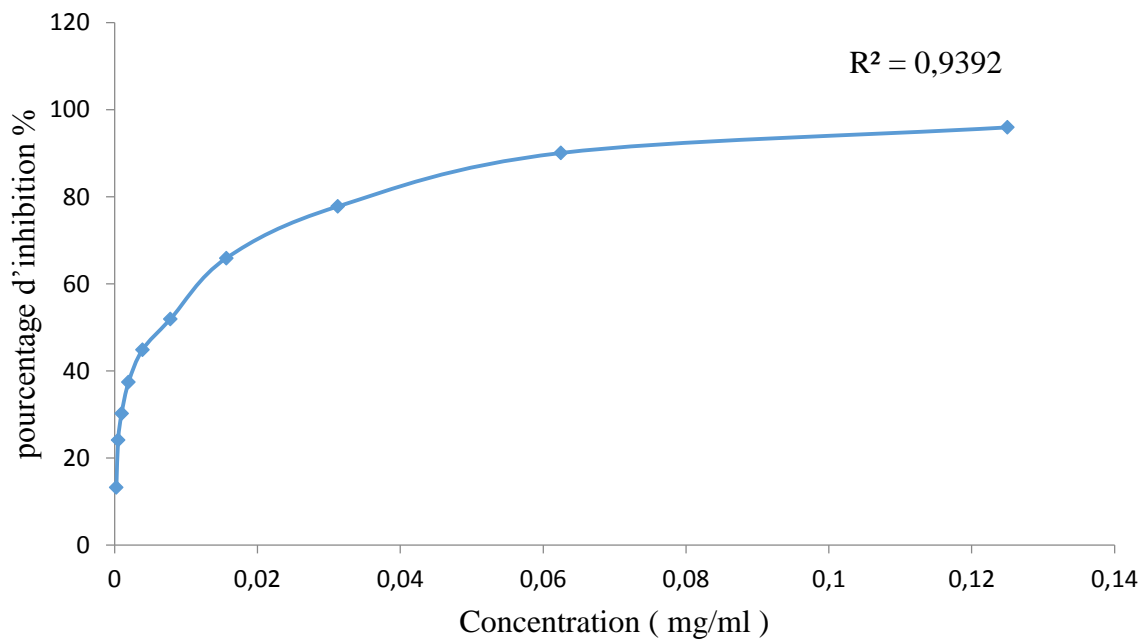
- **Ulubelen A. et Terem B., 1988:** Alkaloids and Coumarins from roots of Ruta chalepensis; Pargamon Journals, Phytochemistry 27 (2): 650-651.

W

- **Waterman P. G., 1975:** Alkaloids of the Rutaceae: their ditribution and Systematic Significance, Biochemical Systematics and Ecology 3; Ed: PERGAMON PRESS, 149-180.
- **World Health Organization.** Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva: World Health Organization; 1993. [Online] Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/> [Accessed on 20 May 2014].

Annexe

Annexe1: Test de molybdate**Annexe2:** Test de DPPH

Annexe3: Test de FRAP**Annexe4: Test de l'ABTS**

عنوان المذكرة: مساهمة في النشاط المضاد للأوكسدة لاستخلاصات الفينولات من السداب الأذقر "فيجل".
اللقب: كحلش
الاسم: -إبراهيم الخليل
رق: -إسماعيل
المؤطر: قنان هجيرة

الملخص:

في هذا العمل، اهتمنا بدراسة المركبات الفينولية وتقييم النشاط المضاد للأوكسدة لنبته الفيجل. تُعد *Ruta graveolens* نبتة عطرية تنتمي إلى فصيلة الروتاسيا، وتُعرف شعبياً لدى السكان المحليين باسم "فيجل" تنمو هذه النبتة بشكل تلقائي، وهي واسعة الانتشار في شمال إفريقيا، وخاصة في الجزائر. لا تزال تُستخدم في الطب التقليدي كمضاد للالتهابات، ومضاد للتشنجات، وكعلاج لأمراض الجلد. أظهرت التقديرات الكمية للبوليفينولات الكلية والفلافونويدات، باستخدام طريقة فولين سيوكاليتو وطريقة ثلاثي كلورو ايثيلين الألمنيوم على التوالي، أن المستخلص غني بهذه المركبات 3.36 ± 1.47 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غرام من المادة الجافة و 1.12 ± 0.38 ملغ مكافئ روتين/غرام من المادة الجافة على التوالي. وقد تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام أربعة اختبارات DPPH، ABTS، وفوسفو مولبيدات، و FRAP. وقد أظهر المستخلص الهيدروإيثانولي نشاطاً مضاداً للأوكسدة ملحوظاً في اختبار DPPH و ABTS ($IC_{50} = 0.031 \pm 0.012$ و 0.037 ± 0.002 ملغ/مل على التوالي)، في حين أظهر نشاطاً ضعيفاً في اختباري الفوسفو مولبيدات و FRAP ($VCEAC = 0.0038 \pm 0.0011$ م و 0.0141 ± 0.002 م على التوالي).

الكلمات المفتاحية: *Ruta graveolens*، مضادات الأوكسدة، البوليفينول، الفلافونويد، DPPH، FRAP، ABTS.

Memory title: Contribution to the Antioxidant Activity of Phenolic Extracts from *Ruta graveolens* «Fidjel».

Name: -Kahlaleche **First name:** -Brahim El Khalil **Directed by:** Guenane Hadjira
-Regue -Ismail

Abstract :

In this study, we focused on the investigation of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant activity of *Ruta graveolens*. *Ruta graveolens* is an aromatic plant belonging to the Rutaceae family, commonly known by the local population as "Fidjel." It grows wild and is widely distributed across North Africa, particularly in Algeria. It is still used in traditional medicine for its anti-inflammatory, antispasmodic properties, and in the treatment of skin disorders.

The quantitative estimation of total polyphenols and flavonoids using the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively, showed that the extract is rich in these compounds (3.36 ± 1.47 mg GAE/g DW and 1.12 ± 0.38 mg RE/g DW, respectively).

The antioxidant activity was evaluated using four tests: DPPH, ABTS, phosphomolybdate, and FRAP.

The hydroethanolic extract showed significant antioxidant activity in the DPPH and ABTS assays ($IC_{50} = 0.031 \pm 0.012$ and 0.037 ± 0.002 mg/mL, respectively), while it exhibited lower activity in the phosphomolybdate and FRAP assays ($VCEAC = 0.0038 \pm 0.0011$ M and 0.0141 ± 0.002 M, respectively).

Keyword : *Ruta graveolens*, antioxidant, polyphenols, flavonoid , FRAP , DPPH, ABTS.

Titre du mémoire : Contribution à l'activité antioxydant des extraits phénoliques de *Ruta graveolens* «Fidjel».

Nom : -Kahlaleche **Prénom :** -Brahim El Khalil **Encadreur :** Guenane Hadjira
-Regue -Ismail

Résumé :

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante de *Ruta graveolens*. *Ruta graveolens* est une plante aromatique, appartenant à la famille des Rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. Elle est encore utilisée dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire, antispasmodique et pour le traitement des pathologies cutanées. L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par la méthode de Folin Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminium, respectivement montre que l'extrait est riche en ces composés $3,36 \pm 1,47$ Mg EAG/g MS et $1,12 \pm 0,38$ Mg ER/g MS respectivement). L'évaluation de l'activité anti-oxydante a été réalisée par quatre tests (DPPH, ABTS, Phosphomolybdate et FRAP). L'extrait hydroéthanolique présenté une activité antioxydante intéressante vis-à-vis le test de DPPH et d'ABTS ($IC_{50} = 0,031 \pm 0,012$ et $0,037 \pm 0,002$ mg/ml respectivement) et une faible activité pour le test de phosphomolybdate et de FRAP ($VCEAC = 0,0038 \pm 0,0011$ M, $0,0141 \pm 0,002$ M respectivement).

Mot clé : *Ruta graveolens*, antioxydant, polyphénols, flavonoïde, FRAP, DPPH, ABTS.