



[Université du 7 Novembre à Carthage.](#)



[Agence Universitaire de la Francophonie](#)

[Campus Numérique Francophone de Tunis](#)

## LES ANTIOXYDANTS DANS LES ALIMENTS



Micro Projet réalisé M. HEDHILI Lassaad ( [lassaad.hedhili@issatgb.rnu.tn](mailto:lassaad.hedhili@issatgb.rnu.tn) ) Maitre Assistant à [l'Institut Préparatoire aux Etudes d'Ingénieurs de Nabeul.TUNISIE](#)

En Collaboration de :Pr Chemat Farid de l'UMR A 408 INRA Université d'Avignon. France. M. Jamoussi Bassem Maitre de Conférences à [l'Institut Supérieur de l'Education et de la Formation Continue](#) Tunis. TUNISIE.  
Et Pr Zrira Saadia de l'Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II. Rabat . MAROC

Avec Le soutien de [l'Agence Universitaire de la Francophonie](#)

\*  
*Antioxydant de référence, le glutathion protège les cellules de plusieurs polluants et poisons, incluant certains issus de la combustion de carburants et de la fumée de cigarette. Il retarde également les dommages dus aux radiations tels ceux rencontrés suite à la diminution de la couche d'ozone.*

Ce cours s'articule autour des antioxydants dans les aliments, **Deux** modules sont proposés, chaque module comporte **Deux** unités d'apprentissage.

Le premier module s'articulera autour des différentes classes d'antioxydants ainsi que leurs rôles.

Le deuxième module traitera des différentes techniques d'extractions des antioxydants d'origine végétales et les techniques spécifiques de mesure de l'activité antioxydantes ;

En fin une activité d'apprentissage sera proposée dans le but, de permettre à l'apprenant d'assimiler le contenu des modules et unités d'apprentissages et de mettre la théorie en pratique. Les principaux thèmes retenus pour une telle activité sont :

- 1- Les différentes classes d'antioxydants.
- 2- Rôles des antioxydants.
- 3- Technologies d'extractions des antioxydants.
- 4- Test antioxydants : comment évaluer l'activité antioxydante.

**Public cible et cadre pédagogique :**

- Etudiants en chimie niveau licence, en sciences pharmaceutiques, en médecine, et en sciences agronomiques
- Opérateurs économiques œuvrant dans le domaine agroalimentaire.
- Pré requis :
  - notions fondamentales de chimie organiques niveau DEUG
  - notions fondamentales de Biochimie niveau DEUG

+ Objectifs : [Objectifs généraux](#), [Objectifs spécifiques](#)

+ [Définitions](#)

## MODULE 1

### UNITE D'APPRENTISSAGE 1 : Les différentes classes d'antioxydants

- [Les Caroténoïdes](#), [les Polyphenols](#), [les Vitamines](#) et [les oligo-éléments](#)

### UNITE D'APPRENTISSAGE 2. Rôles des antioxydants

I-[Rôle des antioxydants chez la plante](#). ([Caroténoïdes](#), [polyphenols](#), [Vitamines](#)).

II- [Rôle des antioxydants chez l'homme](#)

#### II.1 Le Stress oxydant et ses conséquences chez l'Homme.

##### II.1.1 Le stress oxydant

###### I.1.1.1 Les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO)

###### I.1.1.2 Autres espèces réactives

##### II.1.2 Conséquences du stress oxydant chez l'Homme

###### II.1.2.1 Athérogenese

III-[Rôle des antioxydants dans les aliments](#)

IV-[Les antioxydants dans le Mécanismes de la peroxydation lipidique in vivo et in vitro](#)

#### IV.1 Autoxydation des Acides Gras Polyinsaturés( AGPI)

##### IV.1.1 Autoxydation des Acides Gras Polyinsaturés( AGPI) par l'oxygène triplet ( $^3O_2$ )

##### IV.1.2.Autoxydation des AGPI par l'oxygène singulet ( $^1O_2$ )

#### IV.2 Mécanismes des anti-lipoperoxydations

##### IV.2.1 Mécanismes d'action des antioxydants préventifs

###### IV.2.1.1 Les chélateurs des métaux de transition

###### IV.2.1.2Les désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet.

###### IV.2.1.3 Elimination des hydroperoxydes

###### IV.2.1.4 Les piègeurs d'oxygène

##### IV.2.2 Mécanismes d'action des antioxydants de type « chaine rompue » « chain breaking »

###### IV.2.2.1 Les donneurs d'hydrogène

###### IV.2.2.1 Les antioxydants « sacrifiés »

### IV.2.3 Mécanismes d'action mixtes des antioxydants

#### MODULE 2

#### UNITE D'APPRENTISSAGE 1 . Extraction des antioxydants d'origine végétale

#### **UNITE D'APPRENTISSAGE 2. Comment évaluer l'activité antioxydante**

## Objectifs généraux

Ce cours a pour objectif de mieux comprendre des notions fondamentales de l'antioxydant en tant qu'additif ou/et éléments naturel présents dans les aliments et leurs bienfaits chez l'homme, il a pour objectifs généraux :

- 1- **Comprendre** les différentes classes d'antioxydants, ainsi que leurs rôles chez l'homme et la plante.
- 2- **Définir** le stress oxydatif (production de radicaux libres) et son rôle dans le développement de différentes maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, respiratoires et neurodégénératives, le diabète et le cancer.
- 3- **Connaître** les moyens de lutte contre le stress oxydative.
- 4- **Maîtriser** les différentes techniques conventionnelles et modernes et ses conséquences dans la dégradation ou la préservation des antioxydants extraits de la matière végétale. Mettre en valeurs la nouvelle variante de la technique d'extraction assistée par micro-ondes avec ou sans solvant, proposé par l'équipe de Pr. Chemat (Université d'Avignon. France).
- 5- **Pouvoir** évaluer l'activité antioxydante de la substance à travers des tests chimiques spécifiques.
- 6- **Tester** les connaissances acquises à travers un système d'évaluation de type QCM.

## Objectifs spécifiques :

A la fin, de ce cours, l'apprenant doit :

- **Identifier** les différentes classes antioxydantes et leurs rôles en tant qu'additif alimentaire.
- **Mettre en valeur** le régime méditerranéen (riche en légumes et fruits) dans la prévention de l'athérosclérose, maladie de Parkinson, Alzheimer, diabète et vieillissement cellulaire.
- **Mettre en place** un protocole expérimental pour évaluation de l'activité antioxydant en fonction des propriétés recherchées de l'antioxydant en tant qu'additif alimentaire.
- **Reconnaître** les différentes technologies d'extractions en fonction de son impact sur le rendement et la qualité de l'antioxydant en tant qu'additif alimentaire extrait de la matrice.
- **distinguer** la méthode d'extraction par Micro ondes, des autres méthodes conventionnelles, par la rapidité et la qualité de l'antioxydant extrait à partir de la matière végétal.

## Définition

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique). Une définition large du terme antioxydant donnée par B. Halliwell [1] est « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat ».

En tant qu'additif alimentaire, un antioxydant est une molécule qui protège les aliments contre les réactions d'oxydations qui accélèrent leur vieillissement. Ceci est dû essentiellement à l'oxygène de l'air, la lumière, les traces de métaux et éventuellement certains enzymes.



*Savez vous : La coloration rose des plumes du flamant est due à l'accumulation de carotène contenu dans son alimentation.*



### Où trouve-t-on les antioxydants ?

Les antioxydants se trouvent dans un grand nombre d'aliments : poivrons, goyave, oseille, citron, orange, kiwi, chou, papaye, fraise, huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, margarine, œuf, foie, beurre, œuf, poissons, œuf, viandes, fruits de mer, viandes, pain complet, légume, fruits et légumes, vin, thé. Comme on peut le remarquer, la plupart de ces antioxydants se trouvent dans les fruits et les légumes.

**Savez vous** : nouvellement [\[2\]](#) un inventaire détaillé sur plus de 100 végétaux, dont les fruits et légumes, mais aussi les noix et les épices à propos de leurs activités antioxydantes. Voici le « Top 20 » des végétaux riches en antioxydants

#### **Le « top 20 » des végétaux riches en antioxydants (activité antioxydante par portion, exprimées en micromoles de Trolox équivalents)**

Petits haricots rouges (secs)	13727
Myrtilles sauvages	13427
Haricot rouge (sec)	13259
Haricot Pinto	11864
Myrtilles cultivées	9019
Cranberry	8983
Artichaut (cuit)	7904
Mûre	7701
Pruneau	7291
Framboise	6058
Fraise	5938
Pomme « Red Delicious »	5900
Pomme "Granny Smith"	5381
Noix de pécan	5095
Cerise	4873
Prune noire	4844
Pomme de terre « Russet » (cuite)	4649
Haricot noir (sec)	4181
Prune	4118

## MODULE 1

### UNITE D'APPRENTISSAGE I : Classification des antioxydants

Les antioxydants se classent en 3 catégories : Les [caroténoïde](#), les [polyphénols](#), les [vitamines](#) et les [oligo-éléments](#) (*Sélénium, Cuivre, Manganèse et Zinc*),

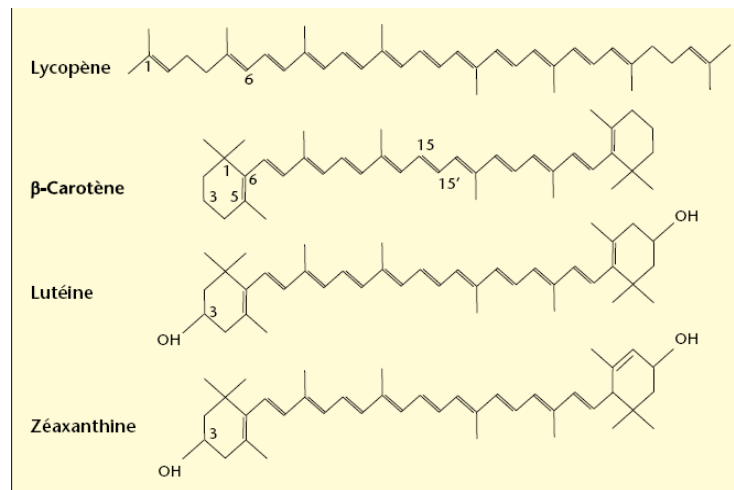
**I-Les caroténoïdes** : Ce sont des pigments végétaux liposolubles contenant une chaîne centrale hautement polyinsaturée pouvant comporter une structure cyclique à chaque extrémité. On distingue :

I.1-Les carotènes : Se sont des composés contenant uniquement du carbone et de l'hydrogène

Exemples : Le lycopène : pigment rouge de la tomate ; Le  $\beta$ -carotène : fruits et légumes de couleurs jaune, orange, rouge et vert foncé (carottes, épinard, patate douce, mangue, spiruline)

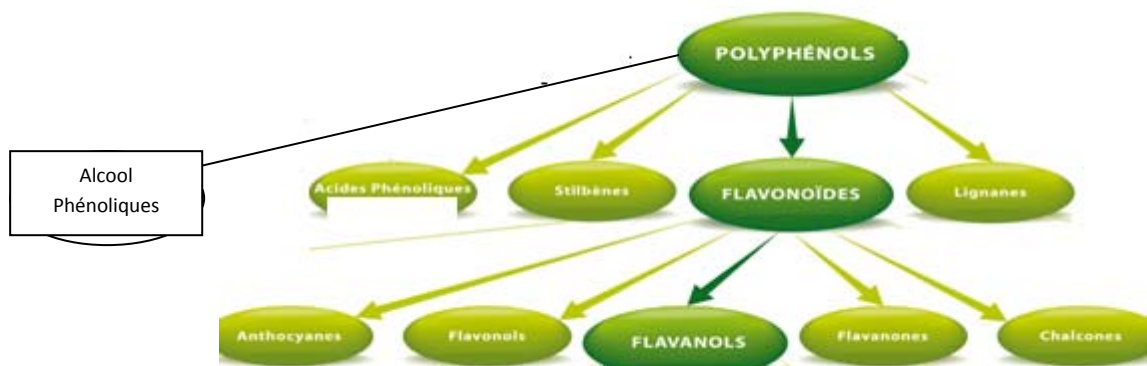
I.2-Les xanthophylles

Ce sont des molécules qui renferment des atomes d'oxygènes (en grec « xantho » signifie jaune) , nous citerons comme exemples le  $\beta$ -cryptoxanthine présent dans le agrumes et la lutéine et l'zéaxanthine (légumes verts à feuille, pois, brocoli, maïs, kaki, tangerine). Notons au passage \*\* au passage que les caroténoïdes sont présents dans le plasma humain insérés dans les lipoprotéines (LDL, VLDL, HDL).



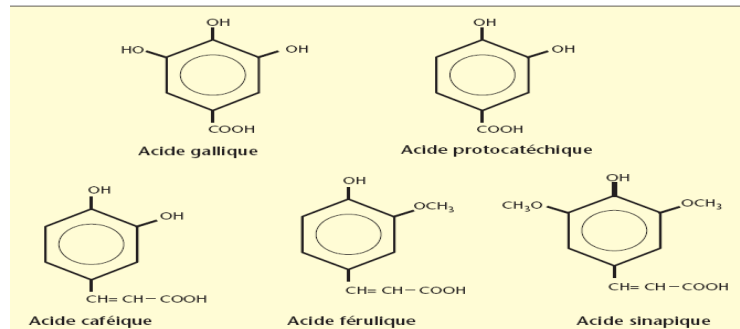


## II- Les Polyphenols *Passer la souris sur les bulles pour avoirs plus de détails*



Bulle	Information
<b>Les polyphenols</b>	<p>Les polyphénols regroupent une grande famille de composés élaborés à partir d'une unité de phénylpropanoïde , ils regroupent une multitude de composés et représentent un des groupes les plus importants distribués dans les végétaux. On peut les classer en 4 familles principales : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes. On trouve les polyphénols aujourd’hui aussi bien dans les aliments courants type chocolat, vin, raisin, pomme, thé, légumes divers que dans les compléments alimentaires ou les cosmétiques où ils sont présents à l’état d’ingrédient isolé et utilisés pour leurs propriétés physiologiques. Les polyphénols sont également utilisés en agroalimentaire pour conserver, aromatiser ou colorer les aliments.</p>

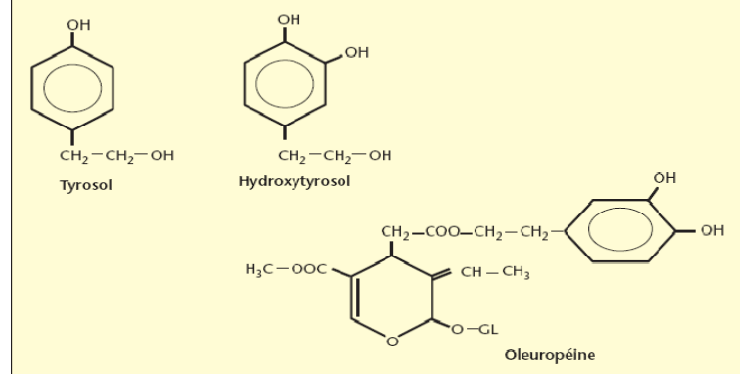
### Acides -Phénols



Un **acide-phénol** (ou **acide phénolique**) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

Exemple Acide gallique ([thé \[3\]](#)), Acide protocatéchique ([épicéa \[4\]](#)), Acide Caféique (forme dérivée : acide chlorogénique dans le grain de [café \[5\]](#)), Acide férulique ([Céréales \[6\]](#)), Acide Sinapique ([Graine de Colza \[7\]](#))

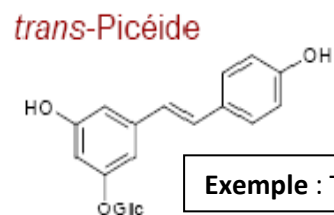
### Alcools-Phénols



Un **Alcool-phénol** (ou **Alcool phénolique**) est un composé organique possédant au moins un Alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique.

Exemples : Tyrosol, Hydrotyrosol, Oleuropéine ([Huile d'olive \[8\]](#))

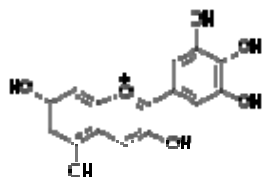
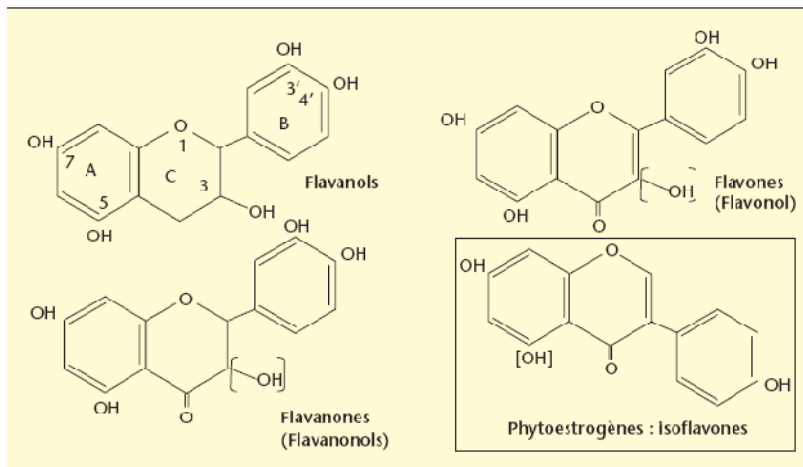
### Stilbènes



Exemple : Trans-Picéide ([Cacao \[9\]](#))

Le **stilbène**, dont il existe deux formes (*trans*-1,2-diphényléthylène (E-Stilbène) et *cis*-1,2-diphényléthylène (Z-stilbène)), est un hydrocarbure aromatique, de formule  $C_{14}H_{12}$ . Le même terme de stilbène désigne aussi la *classe* des dérivés hydroxy-, méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques ou polymériques.

## Flavonoïdes



Anthocyanidines : le Delphinidol

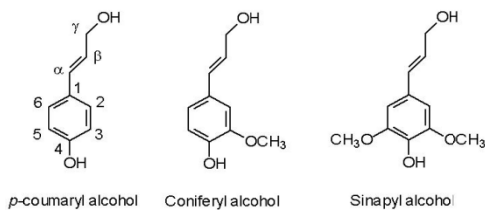
Oignon, Pomme, Thé, Vin et Chocolat [10]

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles

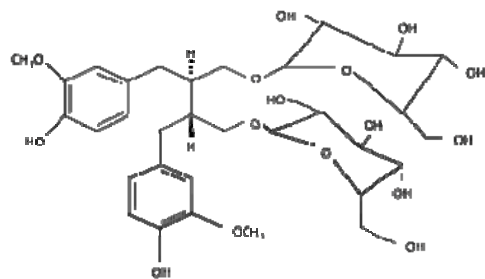
en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3

Leur [biosynthèse](#) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes: flavanone, aurone (jaune), 2,3-dihydroflavonol ou flavanonol, flavone(ivoire), anthocyanidine (rouge-bleu), flavonol(jaune), catéchine ... Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent in vivo : Anthocyanidines + Glucose = Anthocyanes

## Les lignanes

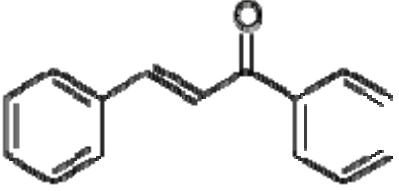


### Structure de trois monolignol



Structure d'un Lignane : secoisolariciresinol diglucoside (SDG) : [graine de lin\[11\]](#)

Les **lignanes** sont des composés phénoliques formés de deux unités **monolignols**. Ces mêmes unités de base servent aussi aux végétaux pour synthétiser un long polymère, au nom proche mais mieux connu, la lignine, présente dans les parois des vaisseaux conducteurs. Il existe de très nombreux lignanes, qui diffèrent par le type de liaison entre les deux unités et les modifications qui interviennent après la dimérisation.

<b>Les Chalcones</b>	 <p>Chalcone</p>	Ce sont des composés phénoliques dérivés du Chalcone ou le 1,3 Diphenylpropenone (benzylideneacetophenone)
----------------------	---	--

[Haut de la Page](#)

### III-Les Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être fournies par l'alimentation. Treize substances répondent à cette définition. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire. Certaines d'entre elles ont des propriétés antioxydantes, on traitera essentiellement la Vitamine [E](#), [C](#) et B1

#### III-1 La Vitamine E

La chimie de la vitamine E est relativement complexe. Le terme vitamine E correspond à 2 grands groupes de molécules : les tocophérols et les tocotriénols, comprenant chacun 32 stéréoisomères. La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et les champignons mais pas chez les animaux.

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols. Cette famille comprend 4 substances : l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurales avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' $\alpha$ -tocotriénol, le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénol et le  $\delta$ -tocotriénol [\[12\]](#)

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones [\[13\]](#). Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol . La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou triméthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11'.

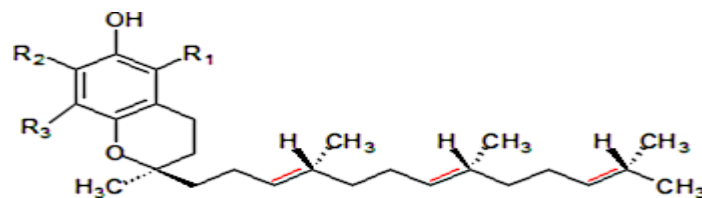


Figure. Structure chimique de la Vitamine E  
Les doubles liaisons indiquées en rouge ne sont pas présentes dans les tocophérols.

	R1	R2	R3
$\alpha$ -tocophérol $\alpha$ -tocotriénol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -tocophérol $\beta$ -tocotriénol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ - tocophérol $\gamma$ -tocotriénol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -tocophérol $\delta$ -tocotriénol	H	H	CH <sub>3</sub>

**Fruits riches en Vit.E:** blé, noix, noisettes, kiwi, myrtille, avocat, châtaigne, citron, mûre, abricot

**Légumes riches en Vit.E:** fenouil, petits pois, salsifis, épinards, persil, choux, poivron, brocoli

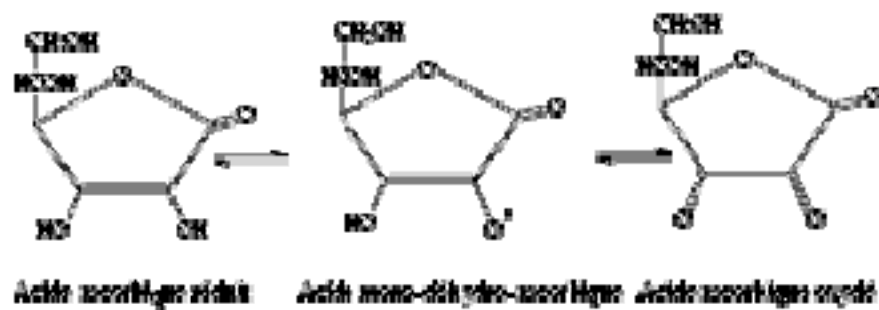
[Haut de la page](#)

### III-2 La Vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une vitamine hydrosoluble, et peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. Sa caractéristique essentielle est d'exister sous trois degrés d'oxydoréduction différents : la forme réduite ou acide ascorbique, la forme semi-réduite ou mono-oxydée, appelée acide mono-déhydro-ascorbique et la forme oxydée ou acide déhydro-ascorbique.

L'acide mono-déhydro-ascorbique est un radical anion relativement inerte, ne réagissant pas avec l'oxygène car il est stabilisé par résonance (effet mésomère) et formation d'une liaison hydrogène intra-moléculaire.

Très fragile en solution, elle est détruite au contact de l'air, par la lumière ou la chaleur. D'où son utilisation fréquente en tant qu'antioxydant. À cet effet, on emploie également la forme R- de l'acide ascorbique qui, à l'inverse de la forme L-, ne présente pas d'activité vitaminique.



**Fruits riches en Vit. C [14] :** Fruits: [acérola](#), [goyave](#), cassis, kiwi, [papaye](#), fraise, agrumes, mangue, [groseille](#)

**Légumes riches en Vit. C :** Légumes: persil, poivron, piment, brocoli, [choux](#), épinard, fenoui



Fruit d'acérola



Fruit de goyave



Fruit de Papayer



Baies du groseillier

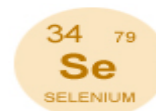


Choux de Bruxelles

### III-3 Les Oligo-éléments

Les **oligo-éléments** appelés aliments protectifs, micronutriments sont présents en très petite quantité dans l'organisme (élément-trace) et indispensables au bon fonctionnement de celui-ci. On les trouve dans la ration alimentaire quotidienne. Parmi les oligoéléments qui présentent une propriété antioxydante, nous citerons essentiellement le Sélénium, Cuivre, Manganèse et le Zinc.

#### Sélénium [15]



Le protecteur universel



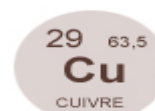
Savez vous !

*Le thé vert est un thé peu oxydé lors de sa fabrication. Ce type de thé est très populaire en Chine et au Japon, où il est réputé avoir les propriétés thérapeutiques les plus efficaces. Il est essentiellement riche en oligo-éléments*

Découvert par J.J. Berzelius et par J.J. Gahn en 1817. Son nom dérive du grec "selène" qui signifie lune.

Oligo-élément essentiel, c'est l'exemple type de ce que l'on appelle un anti-oxydant. On pourrait le qualifier de "protecteur universel".

#### Cuivre [15]



Venu de l'île de Chypre

Le terme cuivre dérive du mot latin "cyprum", qui dérive lui-même de Chypre. C'est sur cette île que fut découvert le gisement de cuivre le plus important dans l'Antiquité, il y a environ 6000 ans.

C'est un oligo-élément essentiel, déjà utilisé dans l'Antiquité pour soigner certains troubles, tels que douleurs et problèmes cutanés. C'est un constituant de nombreuses enzymes, doté de multiples propriétés.

#### Manganèse [15]



Utilisé au temps de pharaons

Oligo-élément essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, il est présent à l'état de trace dans le monde animal

[Haut de la page](#)



## UNITE D'APPRENTISSAGE II : Rôle des antioxydants

### I. Rôle des antioxydants chez la plante

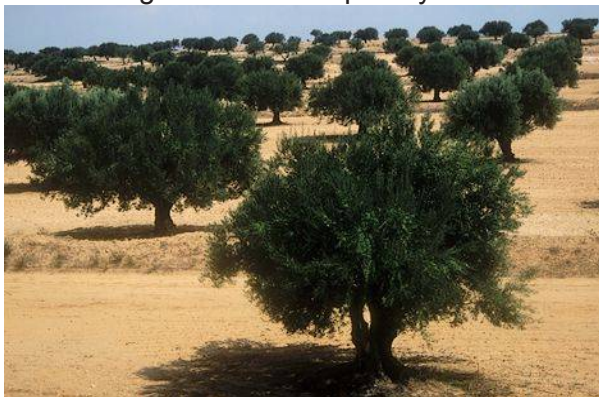
#### I.1 Les Caroténoïdes

Dans la plante, les caroténoïdes ont plusieurs fonctions, nous citerons essentiellement :

- Participation accessoire à la phase claire de la photosynthèse par capture de l'énergie solaire à des longueurs d'onde différentes des chlorophylles et transmission de cette énergie aux molécules de chlorophylle.
- Protection de la chlorophylle contre la photo-oxydation (antioxydant).
- Attraction des animaux par coloration des fleurs et des fruits en vue de la pollinisation et de la dispersion des graines.

*Savez-vous ! Certains herbicides sont actifs en utilisant le mécanisme de blocage de la biosynthèse des caroténoïdes et provoquent le blanchiment des feuilles qui meurent à la lumière.*

Dans l'huile d'olive, un caroténoïde : le  $\beta$ -carotène agit comme protecteur en désactivant l'oxygène singulet produit par les chlorophylles [16]. Il est suggéré, en outre, que le  $\beta$ -carotène aurait pour rôle de filtrer les longueurs d'onde actives des radiations lumineuses en protégeant ainsi l'huile contre l'activation de l'oxygène par la lumière [17]. Kiritsakis et Osman [18] ont montré que l'effet du  $\beta$ -carotène diminue progressivement au cours de l'exposition de l'huile à la lumière. Les pigments caroténoïdes sont facilement dégradés en présence de la lumière et de températures élevées [19, 20]. Les travaux de Steenson et Min [21] effectués sur l'huile de soja ont montré que les produits de dégradation thermique du  $\beta$ -carotène agissent comme prooxydants à l'obscurité alors qu'ils n'ont pas d'effet significatif à la lumière.



Olivier de SFAX (Sud-est de la Tunisie)



Huile d'olive fraîchement pressé

## 1.2 Les polyphenols

Les polyphenols interviennent dans la couleur (rôle attracteur pour pollinisation, dissémination des graines), dans les mécanismes de défense : composés amers ou astringents, limitant la palatabilité, la digestibilité de certaines plantes, voire toxiques ; synthèse accrue en réponse à des attaques (champignons, insectes, ...) ou à divers éliciteurs [22] ; processus de lignification, de subérisation, de brunissement enzymatique limitant la progression des pathogènes.

De même, Les composés phénoliques sont des métabolismes secondaires qui sont associés à de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la dormance des bourgeons et la floraison.. Certains ont des effets attracteurs sur les insectes et oiseaux pollinisateurs.

### *Savez-vous !*

*Le brunissement est accéléré si la pomme est talée ou meurtrie, car dans ce cas les **enzymes** et les **phénols** sont déjà en contact. D'autres facteurs comme la chaleur et la lumière, ou la présence de métaux favorisent l'oxydation : ils agissent comme catalyseurs*



## 1.3 Les vitamines

Les vitamines ont des rôles multiples dans la plante, nous citerons essentiellement comme exemple : Vit.E, Vit.C et la vitamine B11.

Vitamine E: protège les acides gras membranaires de l'oxydation

Vitamine C: précurseurs de coenzyme, antioxydant

La Carnitine (Vit. B11) permet le transfert acides gras longue chaîne dans les mitochondries. A cet effet, la Vit B11, joue un rôle dans le métabolisme des acides gras dans la plante [23].

## **II. Role des antioxydants chez l'Homme**

Les organismes vivant en aérobiose possèdent des systèmes de défense ; ainsi à l'état physiologique il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes antioxydants. Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des défenses antioxydantes ; on parle alors de stress oxydant.

Les antioxydants ont un rôle de lutte contre ce stress. Ce sont généralement des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), non enzymatique (sequestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique).

### **II.1 Le Stress oxydant et ses conséquences chez l'Homme.**

#### **II.1.1 Le stress oxydant**

Le stress oxydant a été défini par Sies [24] comme un déséquilibre prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. Les composés incriminés dans la production des radicaux libres sont Les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO), qui oxydent des molécules biologiques menant ainsi à la formation de radicaux carbonés qui peuvent réagir avec  $O_2$  en donnant des composés réactifs tel que : les radicaux alkoxyles et peroxyles ( $RO^\circ$ ,  $ROO^\circ$ ) et les alkylperoxydes ( $ROOH$ ). C'est le cas des acides gras à longues chaînes insaturés lors de la peroxydation lipidique [25].

##### **I.1.1.1 Les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO)**

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie mais il peut être toxique par lui-même et par la formation de radicaux libres qui ont de nombreux effets délétères. Les ERO sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivé de l'oxygène.

Lors de sa réduction le dioxygène peut conduire à des dérivés réactifs, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont : le radical superoxyde  $O_2^{\circ-}$ , et son acide conjugué (le radical hydroperoxyde  $HO_2^\circ$ ), le radical hydroxyle  $OH^\circ$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  [25]

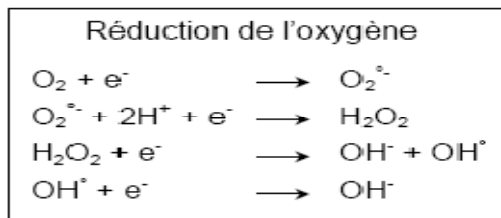


Figure. Formation d'espèces réactives de l'oxygène.

### I.1.1.2 Autres espèces réactives

Les oxydes d'azote Soumis à des températures très élevées, le diazote de l'air s'unit au dioxygène pour former le monoxyde d'azote ( $NO^\cdot$ ). A la sortie du foyer de combustion, l'oxyde d'azote refroidi se transforme en dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), un gaz toxique. Puis à l'humidité de l'air,  $NO_2$  est converti en acide nitrique ( $HNO_3$ ), un puissant oxydant. Le  $NO^\cdot$ , qui est produit naturellement en très faible quantité, par exemple par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins comme vasodilatateur, est aussi un oxydant. En présence du radical superoxyde, il forme le peroxytnitrite, un oxydant fort. [25] :  $NO^\cdot + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO$

### II.1.2 Conséquences du stress oxydant chez l'Homme

Le stress oxydant, à travers la production des ERO, vont oxyder les acides gras polyinsaturé, contenu dans les lipides membranaires, c'est ainsi qu'une altération de leur fonctionnalité aura lieu (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). De même, l'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules [26]. Les lipoprotéines telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les LDL oxydées sont fortement incriminées dans **l'athérogenèse**. De nombreuses autres pathologies sont associées à la peroxydation des lipides. C'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement...

#### II.1.2.1 Athérogenèse

Les lipoprotéines de faible densité (**LDL**) natives (particules macromoléculaires contenant essentiellement des lipides, mais aussi des protéines et de la vitamine E), qui sont catabolisées par la voie des récepteurs LDL, ne sont pas athérogènes. C'est l'oxydation de certaines lipoprotéines qui est aujourd'hui considérée comme une étape importante de l'athérogenèse. En effet, les LDL oxydées ne sont pas reconnues par les récepteurs habituels (récepteur cellulaire B/E) et sont alors catabolisées par d'autres voies. Elles vont s'accumuler dans les cellules spumeuses (Macrophage gonflé de LDLox) observées au stade initial de la formation de la **plaque d'athérome** qui implique automatiquement une réduction du diamètre de vaisseau, se traduisant par une HTA (Hyper Tension Artérielle). La rupture de la **plaque d'athérome**, provoque une obstruction, d'où une embolie. Si le vaisseau endommagé par la plaque se localise au niveau du myocarde on parle alors de **l'infarctus du Myocarde**.

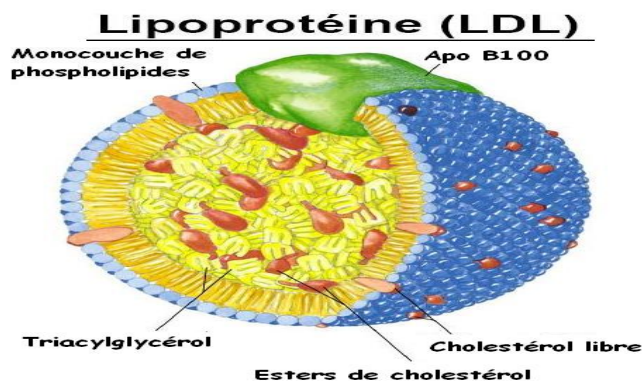


Figure. Structure tridimensionnel des LDL.

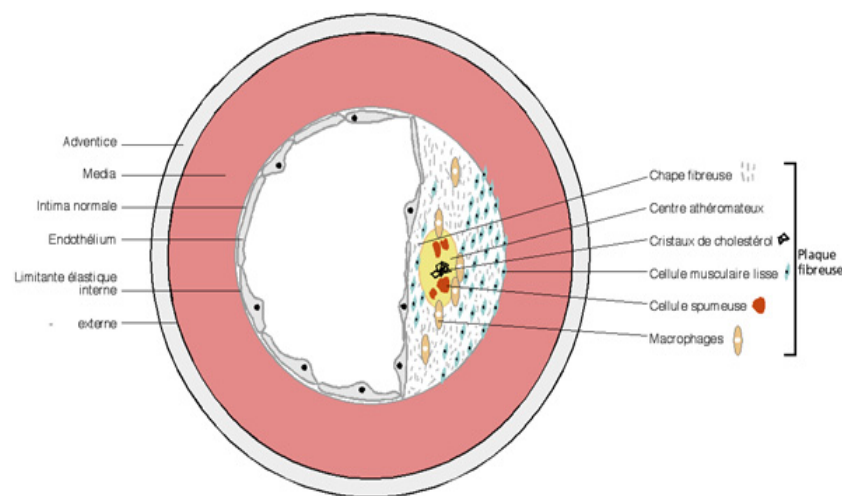


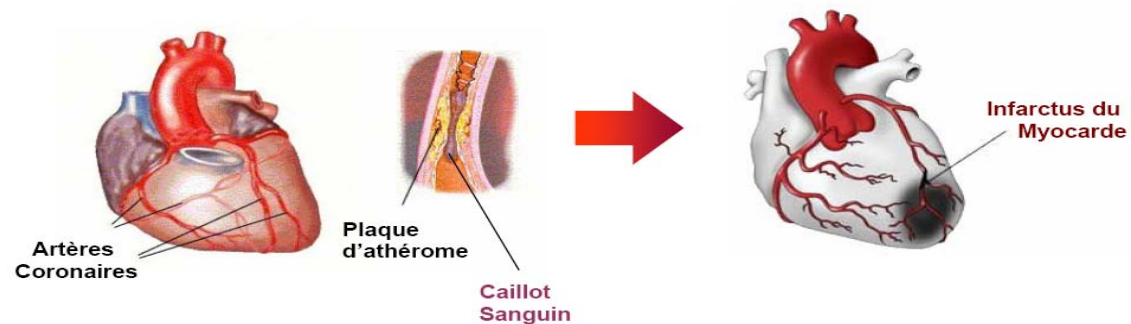
Figure. Structure d'une plaque athérome

**Savez vous !** Halliwell, qui est un grand spécialiste du stress antioxydant, a étudié la plaque athéromateuse. Il a pris, sur des artères de cadavres, des boues athéromateuses et y a mis des métaux, du fer et du cuivre. Il a constaté, le lendemain, que le fer était totalement rouillé et le cuivre totalement oxydé, notamment dans les plaques athéromateuses jeunes. Cela veut dire que la plaque athéromateuse est un bouillon oxydant, un milieu très prooxydant et que probablement le stress oxydant joue un rôle beaucoup plus important dans les maladies cardio-vasculaires ou dans les accidents cardio-vasculaires du sujet jeune

# Athérosclérose : Définition

## Lésion Artérielle = La Plaque d'Athérome

Remaniement de la paroi artérielle caractérisé par la présence de dépôts lipidiques extracellulaires et de cellules spumeuses.



### III. Rôle des antioxydants dans les aliments

Les produits agroalimentaires sont riches en fraction lipidique susceptible de subir des transformations chimiques et des dégradations sous l'influence de facteurs extérieurs tel que la chaleur, la lumière, la présence d'oxygène... Cela peut conduire non seulement à la perte des propriétés odoriférante, organoleptique ou nutritionnelles mais aussi parfois à l'apparition de problèmes d'irritation ou allergie dus aux produits formés. Les dégradations résultent le plus souvent d'un processus oxydatif impliquant des radicaux. Une autre voie de dégradation, moins souvent prise en compte, fait intervenir l'oxygène singulet, un oxydant puissant formé par action combinée de la lumière, d'un colorant et d'oxygène.

Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés. L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt dû aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé. *In vitro*, l'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire qui utilise de plus en plus des acides gras hautement insaturés tels que ceux de la série n-3 ( $\omega$ -3) très susceptibles à l'autoxydation. L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement), nutritionnelles (perte en vitamines) voir même une toxicité due aux produits issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes).

### IV. Les antioxydants dans le Mécanismes de la peroxydation lipidique [27].

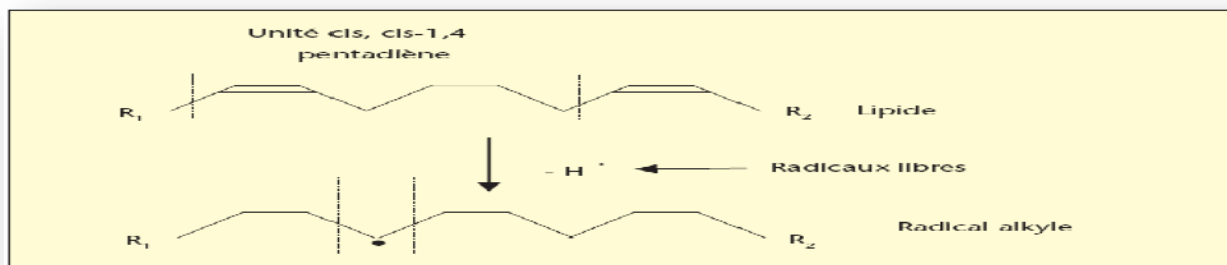
D'abord traitons le mécanisme des peroxydations lipidiques, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, le mécanisme est identique.

#### IV.1 Autoxydation des Acides Gras Polyinsaturés( AGPI)

##### IV.1.1 Autoxydation des Acides Gras Polyinsaturés( AGPI) par l'oxygène triplet ( $^3\text{O}_2$ )

L'oxydation directe des acides gras insaturés par  $^3\text{O}_2$  est impossible pour des raisons de spins opposés entre les lipides et  $^3\text{O}_2$ . Pour surmonter cette barrière, une étape d'initiation par des radicaux libres est nécessaire pour permettre la fixation d'oxygène sur l'acide gras.

**Initiation** : C'est l'élimination d'un atome d'hydrogène de l'acide gras situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons (ce qui conduit à la formation d'un radical alkyle).



Les radicaux qui vont initier la peroxydation des AGPI sont principalement les radicaux hydroxyles (OH $\cdot$ ) et hydroperoxyde (HOO $\cdot$ ) ainsi que les radicaux lipidiques tels que les radicaux alcoyle (LO $\cdot$ ) et peroxyde LOO $\cdot$ ).

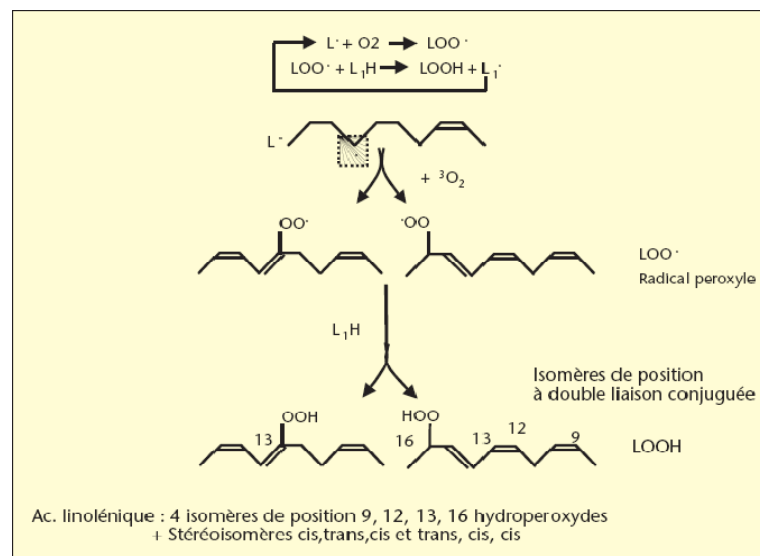
Les sources de radicaux libres sont nombreuses. Il existe deux grandes voies de formation des radicaux libres : la première voie consiste au *transfert d'électrons* catalysé par les métaux de transition (fer, cuivre) et par les enzymes. Tandis que la deuxième se fait au niveau de la *scission homolytique* des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière (UV, visible), la chaleur, les ultrasons, la lyophilisation

### Propagation

Le radical alkyle formé dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec  $^3\text{O}_2$  pour donner un radical peroxyde. Cette étape est très rapide comparée à la réaction suivante où il y a transfert d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine pour former un hydroperoxyde. C'est l'étape de propagation de la peroxydation car l'acide gras qui vient de donner son hydrogène est transformé en radical alkyle qui retourne dans le cycle pour réagir avec  $^3\text{O}_2$  et donner un radical peroxyde.

Les isomères, résultats de la peroxydation lipidique contiennent des doubles liaisons conjuguées ce qui permet leur détection en UV. En outre des peroxydes cycliques peuvent se former ainsi que d'autres produits comme les isoprostanes qui sont les marqueurs de la peroxydation lipidique *in vivo* considérés comme les plus fiables actuellement



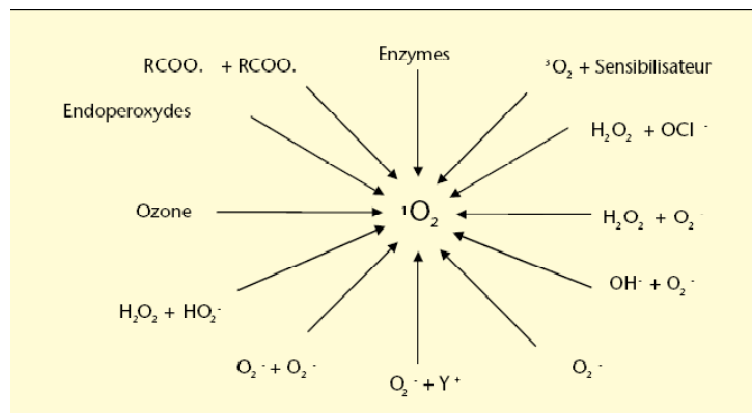


### Terminaison

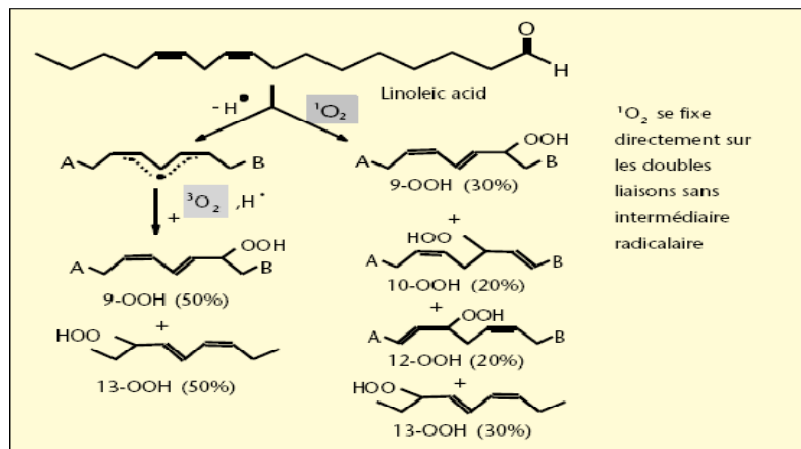
La réaction de dimérisation des radicaux peroxydes, constitue l'étape finale de la réaction radicalaire :  $LOO\cdot + LOO\cdot = LOOL + O_2$

#### IV.1.2.Autoxydation des AGPI par l'oxygène singulet ( $^1O_2$ )

Comme le montre la figure suivante, les sources de l'oxygène singulet sont :



La figure suivante illustre comment l'oxygène singulet s'additionne directement sur les doubles liaisons des acides gras pour donner des hydroperoxydes : cas de l'acide linoléique. En comparaison avec l'autooxydation avec l'oxygène triplet, les composés issus de l'autooxydation par l'oxygène singulet sont mineurs. Elle fournirait principalement les hydroperoxydes qui par décomposition en radicaux libres serviraient d'initiateurs de la réaction d'autoxydation par  $^3\text{O}_2$ .



## IV.2 Mécanismes des anti-lipoperoxydations

Selon Buettner [28] les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux types : les *antioxydants préventifs* qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation et les *antioxydants « chain breaking »* qui interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique et retardent la peroxydation (période d'induction).

### IV.2.1 Mécanismes d'action des antioxydants préventifs

#### IV.2.1.1 Les chélateurs des métaux de transition

Le cycle redox de certains métaux responsable dans la production des radicaux libres sont bloqués par des chélateurs de métaux. Ce sont des protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le **fer**, la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le **cuivre** [29].

Notons au passage que les flavonoïdes sont de bons chélateurs du fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante [30][31]

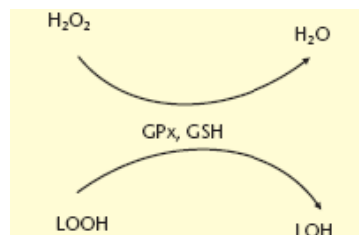
#### IV.2.1.2 Les désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet.

Selon Buettner [28], ils peuvent agir par désactivation chimique en se fixant sur une molécule telle qu'un acide gras pour donner un hydroperoxyde :  $^1\text{O}_2 + \text{LOH} = \text{LOOH}$

Ou encore par désactivation physique éliminant l'énergie d'excitation sans changement chimique :  $^1\text{O}_2 + \beta\text{-carotène} = \text{O}_2 + \beta\text{-carotène}^*$   
Les caroténoïdes sont particulièrement efficaces. Le lycopène est le plus réactif.

#### IV.2.1.3 Elimination des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes sont générateurs des radicaux libres, leurs éliminations prévient l'oxydation des biomolécules. Les hydroperoxydes (LOOH) peuvent être réduits par des enzymes. La glutathion peroxydase (GPx) élimine les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )



#### IV.2.1.4 Les piègeurs d'oxygène.

Ce sont des molécules telles que les sulfites ou l'acide ascorbique.

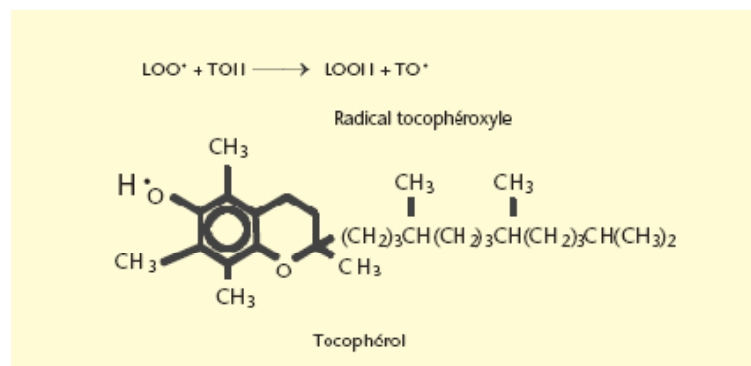
## IV.2.2 Mécanismes d'action des antioxydants de type « chaîne rompue » « chain breaking »

Cette catégorie d'antioxydants va réagir le plus souvent avec les radicaux peroxydes ( $\text{LOO}\cdot$ ) ou alcoxydes ( $\text{LO}\cdot$ ), interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation. Cette catégorie d'antioxydants va réagir le plus souvent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes, interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation. Il est à noter que ces antioxydants n'inhiberont pas par conséquent l'autoxydation des lipides par l'oxygène singulet. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes

### IV.2.2.1 Les donneurs d'hydrogène

Ces antioxydants sont principalement des composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés (tocophérols, tocotriénols, BHT, BHA, flavonoïdes...). Ils sont susceptibles de céder un hydrogène au radical alcoxyde et au radical peroxyde.

Après la réaction d'oxydation, l'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant. Le tocophérol donnera un radical tocophéroxyle qui évoluera vers un composé d'oxydation non radicalaire tel que la tocophérylquinone ou un composé de dimérisation ou de polymérisation supérieure.



Notons enfin, qu'il existe un système de recyclage des antioxydants entre eux en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Ainsi l'acide ascorbique est bien connu pour recycler le tocophérol.

Composé	Potentiel E (mV)
$\alpha$ -Tocophéroxyle $\cdot$ / $\text{H}^+$ / $\alpha$ -Tocophérol	500
Ascorbate $\cdot^-$ / $\text{H}^+$ / Ascorbate	282

#### IV.2.2.1 Les antioxydants « sacrifiés »

Le qualificatif de « *chain breaking antioxidant sacrificial* » employé par Buettner concerne des molécules, elles mêmes radicalaires, qui réagissent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation. Deux radicaux sont connus pour se combiner avec les radicaux peroxydes : le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ).



**Savez-Vous !** Récemment il a été montré que l'ingestion alimentaire de petites quantités de nitrates (2 mmoles, ce qui est une quantité normalement présente dans une laitue) produisait une quantité importante de NO dans l'estomac et que ce NO avait un effet protecteur dans les gastrites dû à ses effets antioxydants.

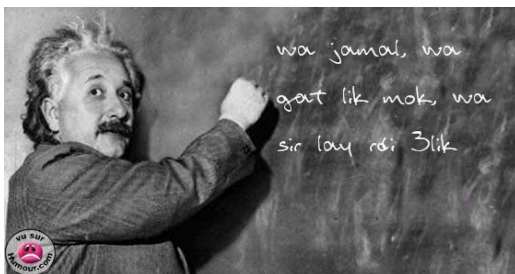
#### IV.2.3 Mécanismes d'action mixtes des antioxydants

Certains antioxydants ont des modes d'action mixtes. Deux exemples peuvent illustrer ces mécanismes multiples :

– **L'acide ascorbique** est un désactivateur de l'oxygène singulet, il élimine aussi l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et aux radicaux tocophéroxydes pour régénérer le tocophérol.

– **Les flavonoïdes** tels que les anthocyanines, les catéchines, les flavones, les flavonols, les isoflavones et les proanthocyanidines sont chélateurs de métaux, piègeurs d'anions superoxyde et donneurs d'hydrogène.

#### Ce qu'il faut retenir !



Les acides gras insaturés contenus dans les lipides sont la cible des oxydations. L'oxygène moléculaire dans son état fondamental ( $^3O_2$ ) est peu réactif et ne se fixera sur les acides gras qu'après une étape d'initiation induite par les radicaux libres. L'oxygène peut exister sous une forme excitée ( $^1O_2$ ) qui permet une addition rapide et directe de l'oxygène sur l'acide gras. L'oxydation des acides gras libère des peroxydes qui se décomposent rapidement pour donner de très nombreux produits de décomposition qui vont contribuer à propager des dommages vis-à-vis d'autres molécules comme les protéines, les acides nucléiques et d'autres lipides. Les conséquences dommageables de la peroxydation lipidique constituent le problème épineux pour l'industrie alimentaire confrontée à la préservation des aliments mais également pour la santé humaine car elle est associée principalement à l'Athérosclérose définie comme une maladie inflammatoire des artères coronaires, les artères carotides internes qui permettent la vascularisation du cerveau, l'aorte dans son ensemble, les artères cérébrales et les artères des membres (artères iliaque, fémorale).

## **UNITE D'APPRENTISSAGE 1 .** **Extraction des antioxydants d'origine végétale**

Trois principales méthodes utilisées dans l'extraction des antioxydants seront développée:

### **I. Extraction par solvant organique**

En première étape, on macère la plante dans le solvant qui peut être soit : hexane, acétone, acétate d'éthyle, méthanol, éthanol, eau, chloroforme. On procède ensuite à une agitation à température ambiante

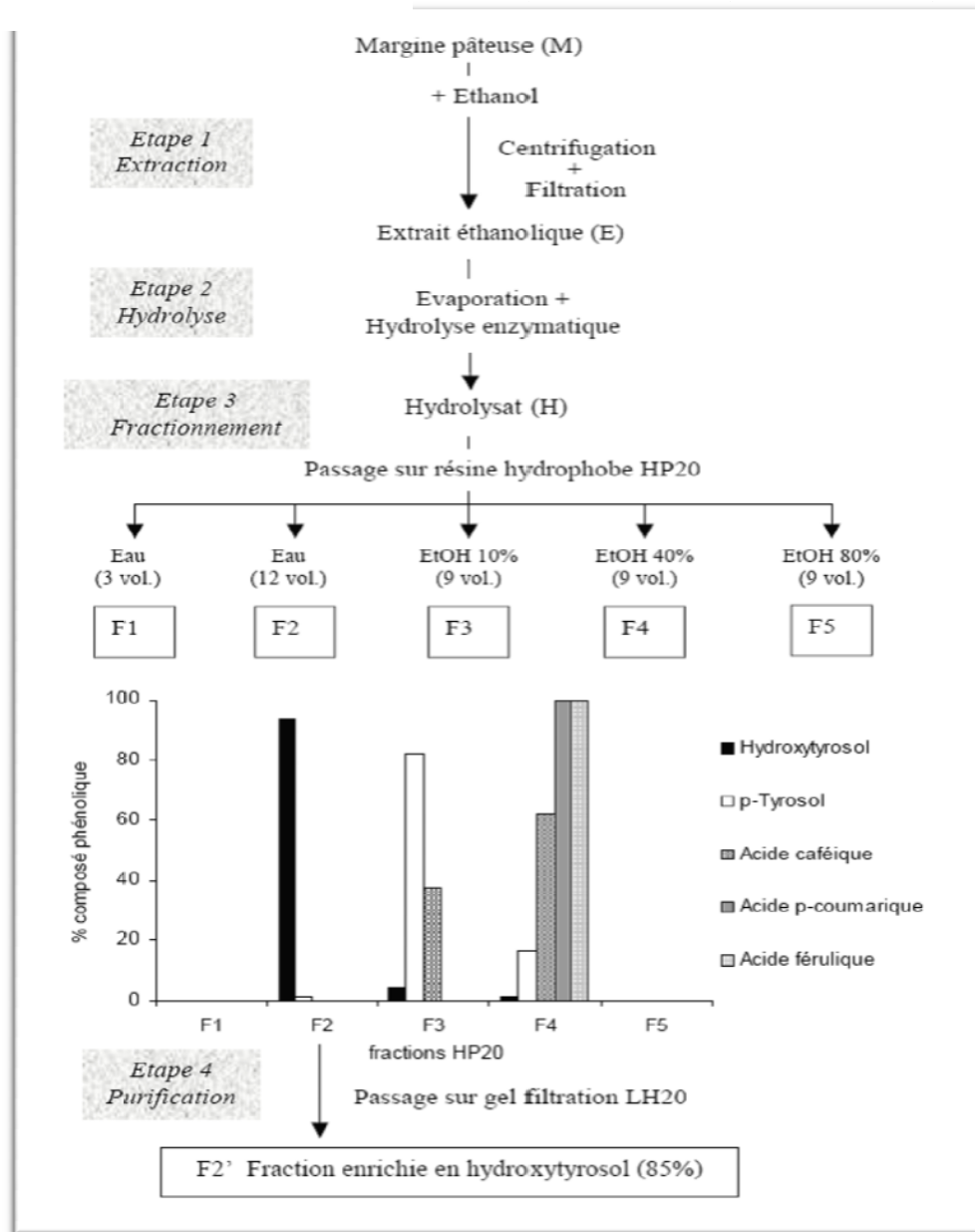
L'extrait est ensuite soumis à une distillation moléculaire, passage sur résine HP20 (exemple : [extraction des polyphénols de la margine \[32\]](#)), dans le but d'extraire les fractions contenant les composés doués d'une activité antioxydante. La distillation moléculaire, ou distillation à court trajet, permet aussi de :

- purifier des substances liquides ou solides (point de fusion < 150°C), même thermosensibles et/ou de masses moléculaires élevées, qu'elles soient d'origine naturelle ou synthétique,
- purifier de nombreux polymères souillés par des monomères ou des oligomères,
- désodoriser et/ou décolorer de nombreux produits,
- désolvater diverses substances d'origine naturelle ou synthétique.
- élaboration de vitamines à partir d'huiles animales, pour la concentration des essences aromatiques
- la fabrication des huiles performantes (par exemple, perfluoropolyéthers) utilisées dans les pompes à vide



#### **I.1 Quelques Protocoles expérimentales d'extraction des polyphénols.**

## Exemple d'extraction1.



D'après les travaux de Roche. M [32][34] portant sur l'extraction de composés phénoliques à partir de margines d'olive, quatre étapes essentielle, exempts de contamination chimique, mise au point par l'auteur, afin d'extraire les composés polyphenoliques de la margine.

Une phase liquide (E) est obtenue par extraction éthanolique à partir de la margine pâteuse initiale (M) où les composés phénoliques représentent 32,3 % (masse/masse)

Afin de libérer les polyphenols des polysaccharides, l'extrait est traité avec une enzyme spécifique.

On obtient un hydrolysate (H) lors de l'étape 2. Les concentrations en acides caféique, *p*-coumarique et férulique augmentent, de même l'auteur remarque la libération les alcools phénoliques (ex hydroxytyrosol).

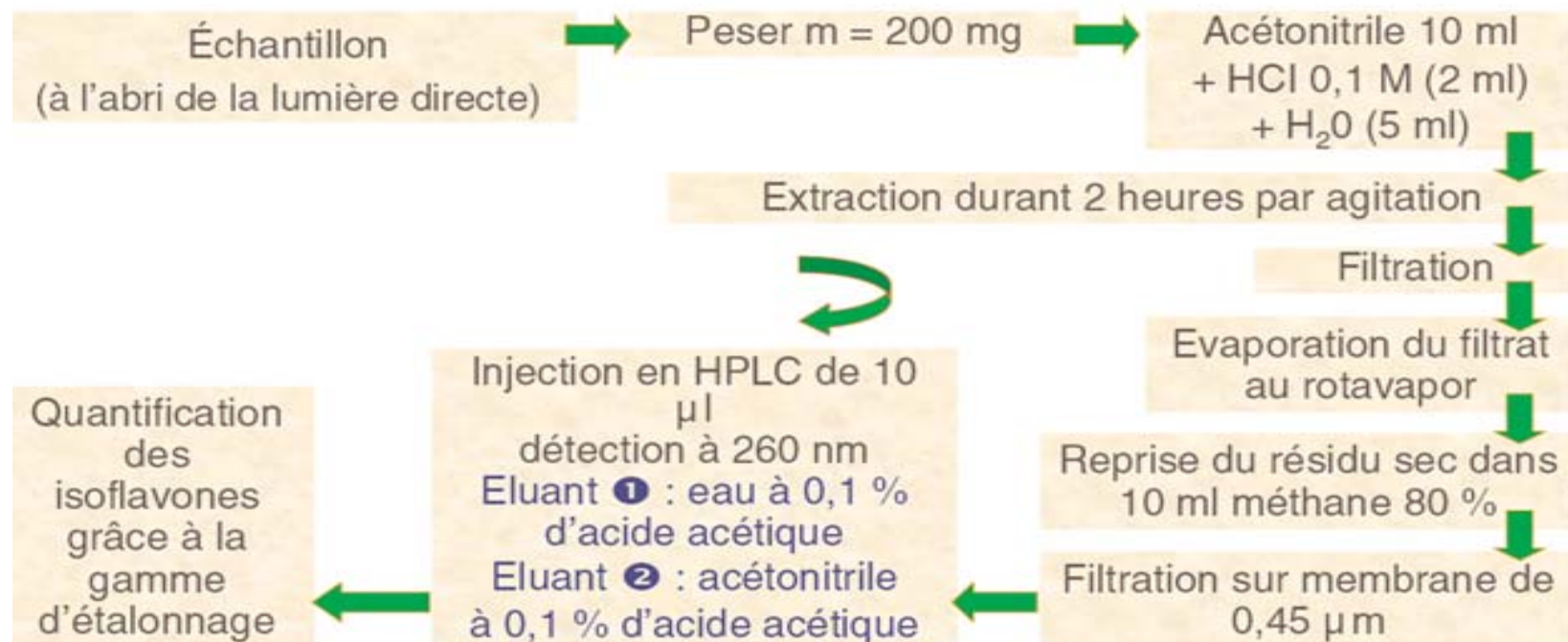
L'hydrolysate est ensuite fractionné (étape 3) à l'aide d'une résine non ionique (HP20) et élué grâce à un gradient composé d'eau et d'éthanol

Les composés phénoliques sont séparés grâce à leurs différences de lipophilie. Les fractions F2, F3, F4, caractérisées par spectrométrie de masse, contiennent respectivement en majorité, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides cinnamiques (acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique). Les mêmes phénols pourront être extrait de la matrice par traitement alcalin des extraits.[33]

**Savez-Vous !** En Tunisie, les margines et les grignons d'olives, sous produits de l'huilerie obtenus après trituration des olives, sont de plus en plus prisés en égard à leurs bienfaits, notamment, en agriculture. Une campagne de mise en valeur de ces déchets a démarré depuis quelque temps en Tunisie, classée deuxième en oléiculture, avec des superficies totales d'un million 670 mille ha.

## Exemple d'extraction2.

### protocole d'extraction et de quantification des isoflavones (technique de Wang et Mur)

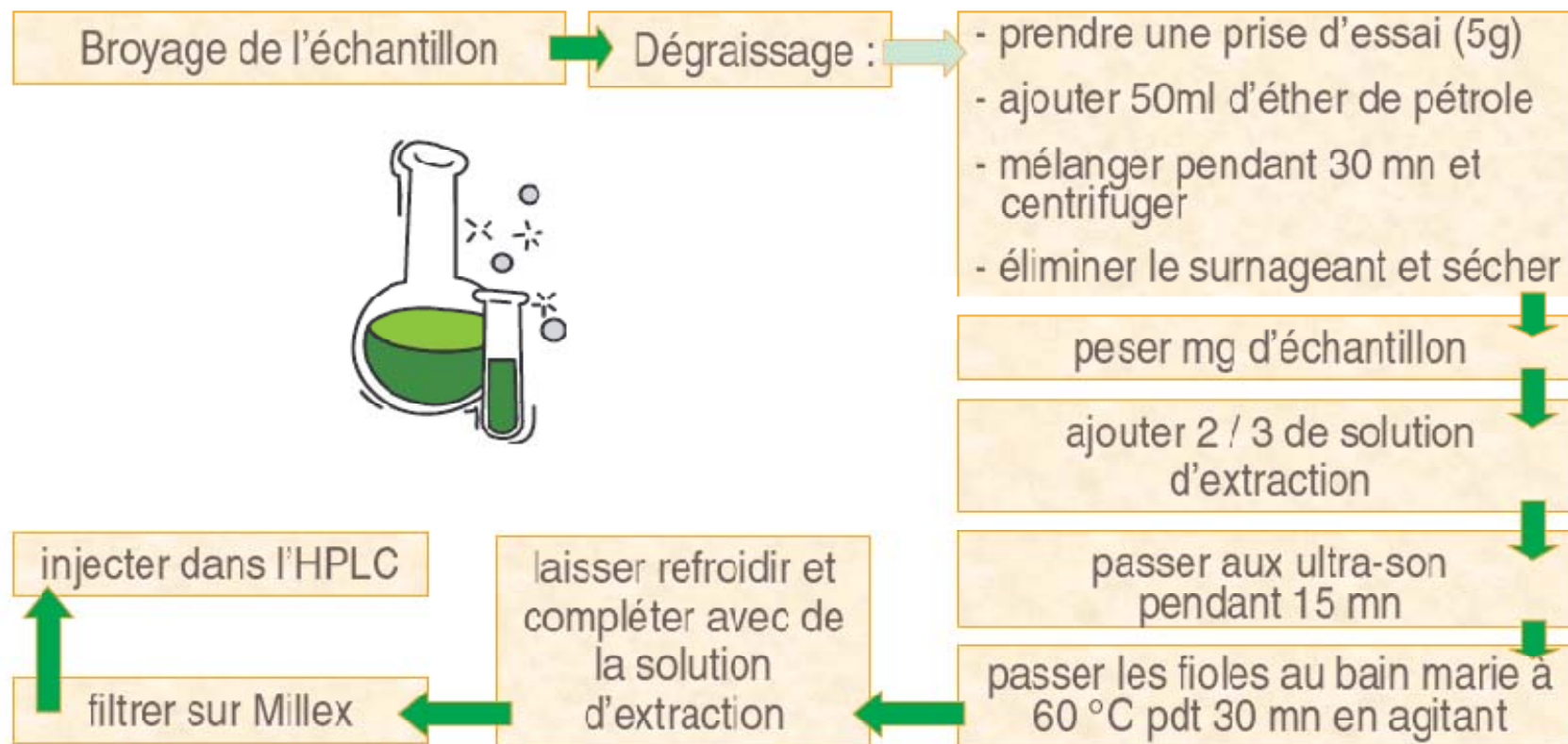


Les différentes formes de ces composés sont additionnées afin de déterminer la quantité totale en isoflavones dans l'échantillon



### Exemple d'extraction3.

## cas du thé vert et du chocolat



## II. Extraction en phase huileuse grasse

Dans ce cas, l'herbe ou l'épice micro-ionisé est mis en contact avec une huile ou grasse alimentaire. Contrairement à l'enfleurage, le mélange est soumis à une agitation à température ambiante pendant 12 heures minimum. Par la suite on procède à un lavage et distillation moléculaire. L'avantage requis de cette méthode est qu'elle ne met pas en jeu les solvants, de même le rendement d'extraction est très élevé.

## III. Extraction par micro ondes

La technique d'extraction par micro-ondes la plus utilisée est incontestablement l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (« MAE », ou « MAP »). Si sa rapidité de mise en œuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu n'est en aucun cas une huile essentielle. De plus l'utilisation de solvant organique présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale, et sa valorisation future. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés.

Les avantages sont multiples, essentiellement :

### 1- La rapidité de l'extraction

Dans la majorité des articles étudiés, le paramètre le plus valorisé est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions assistées par micro-ondes est en général la seconde voire tout au plus la minute.

### 2- Le choix du solvant

Les solvants les plus utilisés en extraction par micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. Le choix du solvant va définir le type de chauffage. Si le solvant est transparent aux micro-ondes, c'est-à-dire s'il possède une permittivité  $\epsilon'$  faible, c'est directement le matériel végétal qui captera le rayonnement micro-ondes. En revanche, si le solvant absorbe les micro-ondes ( $\epsilon'$  élevé), le chauffage sera plutôt un chauffage de type conducteur : les micro-ondes vont permettre le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera le matériel végétal. Le choix du solvant va donc déterminer le type de chauffage et par conséquent le mécanisme d'extraction et la composition du produit final.

### 3- La puissance micro-ondes

A quelques exceptions, les puissances appliquées sont relativement élevées (supérieure à 500W) par rapport à la quantité de végétal à traiter (inférieure à 100g). Cependant la quantité de puissance appliquée est étroitement liée au temps d'extraction mais reste aussi en étroite relation avec la température de la matrice. Au cours de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, les puissances appliquées sont jusqu'à 45 fois supérieures à la masse de végétal à traiter. Mais les temps d'extraction varient entre 10 secondes et une minute. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD) nécessite des puissances sensiblement plus élevées (1200W) pour des temps d'extraction de 15 minutes en moyenne. La distillation sèche assistée par micro-ondes applique des puissances en rapport de puissance ». Cette valeur est généralement de 2 Watts par gramme de matière végétale traitée.

#### 4-La composition chimique

D'un point de vue quantitatif, l'extraction assistée par micro-ondes dans son ensemble apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport aux méthodes classiques utilisées comme références. Dans tous les cas les temps d'extraction des techniques de références sont supérieurs à 90 minutes. Les rendements en huiles essentielles ou en extraits aromatiques obtenus par les techniques assistées par micro-ondes sont généralement du même ordre de grandeur ou supérieurs à ceux obtenus par des méthodes de références pour des temps d'extraction beaucoup plus faibles (10s à 15 minutes). D'un point de vue qualitatif, les différences interviennent surtout au niveau des pourcentages de certains composés aromatiques. Lors de l'extraction des feuilles de myrte des marais, le pourcentage de nonacosane dans l'extrait micro-ondes s'élève à 71,2%, alors qu'il est nul dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. Au contraire, le pourcentage de myrcène très faible dans l'extrait micro-ondes (0,4%), passe à 17,4% dans l'huile essentielle.

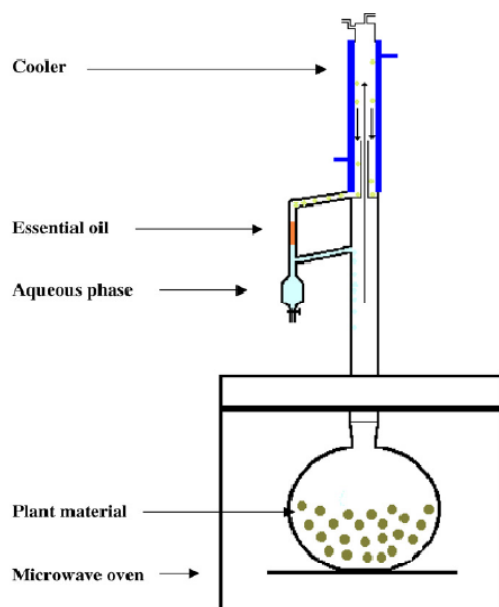


Figure. Variété de montage d'extraction par micro onde: Le Dry Dist™ [\[35\]](#)

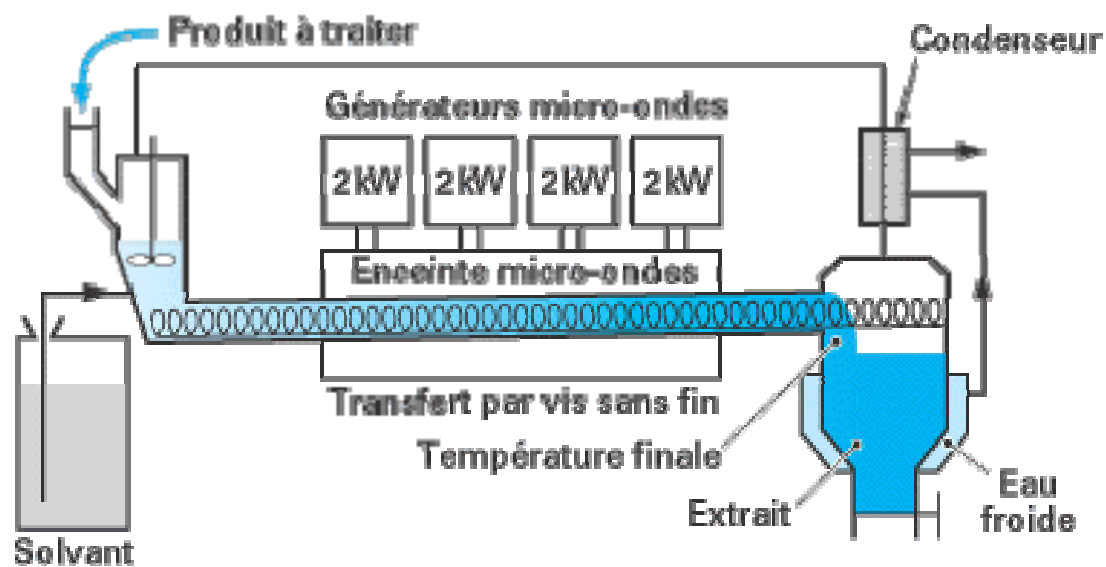


Figure. Outil pilote d'Extraction par Solvant Assisté par Micro ondes en continu

**Autres procédés extractions:**

- Ultrafiltration [\[36\]](#)
- Ultrasonication [\[37\]](#)
- Extraction Flash détente [\[38\]](#)

## UNITE D'APPRENTISSAGE 2 .

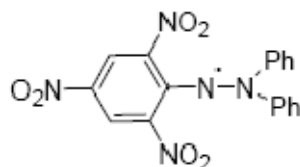
### **Évaluation du potentiel antioxydant d'un produit**

La mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels. Le premier mode relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé. Le deuxième mode, plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés...) dans les dérivés des constituants d'origine

#### **Mode 1. Evaluation de l'aptitude du compose a piéger des radicaux libres**

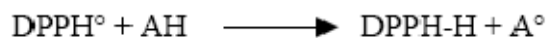
##### **I. Test de réduction du radical stable, le DPPH°**

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit ont été rassemblées selon leurs principes. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) est un radical stable et coloré, qui est centré sur l'azote



**Figure Structure du radical stable DPPH°.**

Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol. La réduction du radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical (A°).



Le composé à tester est ajouté à une solution de DPPH° (MeOH ou EtOH). Après 10 à 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance du DPPH° à 515 ou 517 nm est mesurée par spectroscopie UV-visible (voir tableau suivant).

**Tableau : Effet antiradicalaire d'antioxydants sur le radical DPPH°**

Composés	Absorbance	Pourcentage de réduction de DPPH° (Pr)
Contrôle	1,159 (0,005)	-
Acide caféique	0,576 (0,028)	51,5 (2,44)
Acide férulique	0,879 (0,012)	24,8 (1,06)
Acide chlorogénique	0,749 (0,035)	36,3 (3,00)
$\alpha$ -Tocophérol	0,791 (0,004)	32,5 (0,35)
BHT	1,052 (0,012)	8,9 (1,06)

$Pr = [A(\text{antioxydant})/A(\text{contrôle})] \times 100$ , [DPPH°]=0.1 mM, [antioxydant]=20  $\mu$ M EtOH, 30 min, noir, à 25°C.

Mesure de l'absorbance à 517 nm. Les valeurs correspondent à des moyennes (écart type) de 3 répétitions.

Le rapport DPPH°/antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH° doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser; il permet donc de comparer un grand nombre de composés. De plus, les conditions utilisées (solvants organiques, faible température) évitent l'autoxydation des molécules testées. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH° :

$Pr = [A(\text{antioxydant})/A(\text{contrôle})] \times 100$  où A est l'absorbance pour une concentration en antioxydant et un temps donné.

L'acide caféique réduit de moitié la quantité de radicaux tandis que le BHT, un antioxydant de synthèse utilisé dans l'industrie alimentaire, n'a presque pas d'activité réductrice.

L'EC<sub>50</sub> (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH°) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. On définit alors une grandeur appelé activité antioxydante AA= EC<sub>50</sub>/ [DPPH°] initiale.

Exemple : des extraits d'olive et d'huile peuvent être testés en déterminant auparavant la concentration en composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu et être comparés avec les produits purs. Les EC<sub>50</sub> des variétés d'olive et d'huile présentées dans le Tableau suivant sont inférieures aux composés purs. Cela est dû au fait que dans les composés totaux des extraits, certains sont moins actifs abaissant ainsi l'EC<sub>50</sub>. Ce test permet néanmoins de tester précisément la capacité antioxydante des variétés d'olive avant d'en faire de l'huile.

**Tableau : Activité antioxydante d'extraits d'Olives de différentes variétés**

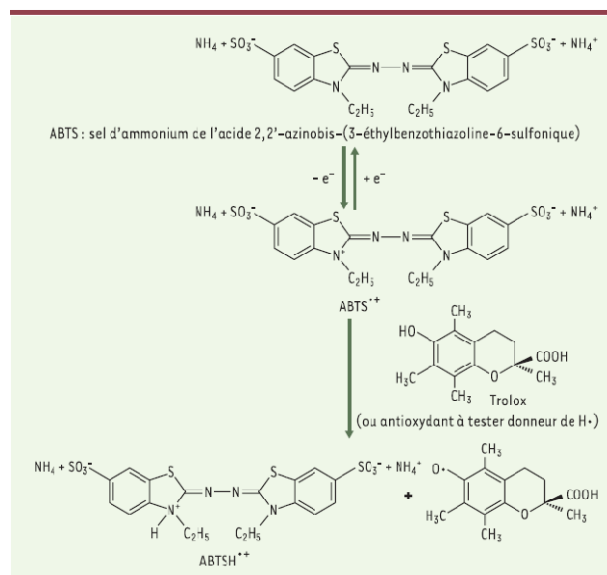
Composés phénoliques (CP)	Activité antioxydante (AA= $EC_{50}/[DPPH^{\circ}]_{initiale}$ )
Extraits d'olive variété SUT	0,52 (0,00)
Extraits d'huile d'olive	0,49 (0,01)
Extraits d'olive variété SUE	0,40 (0,00)
Extraits d'olive variété A	0,35 (0,01)
$\alpha$ Tocophérol	0,28 (0,01)
Oleuropéine	0,22 (0,01)
Acide caféique	0,20 (0,01)

[DPPH<sup>°</sup>]= 60 $\mu$ M, [CP]= 0 à 30  $\mu$ M, dans MeOH, pendant 15 min, dans le noir, 25°C.

Mesure de l'absorbance à 515 nm. Les valeurs correspondent à des moyennes (écart type) de 3 répétitions.

## **II. Test TEAC ( Trolox equivalent antioxidant capacity) de réduction du radical-cation ABTS<sup>+0</sup>(2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique acid)**

Dans la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup>, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6- hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine [39] ou *horseradish peroxidase*) [40] en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse [41, 42] ou persulfate de potassium [43]). Le radical ABTS<sup>•+</sup>, en contact avec un donneur de H<sup>•</sup> conduit à l'ABTS<sup>+</sup> (**figure suivante**) et à la décoloration à 734 nm de la solution [44].



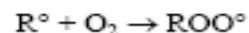
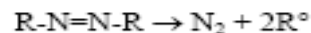
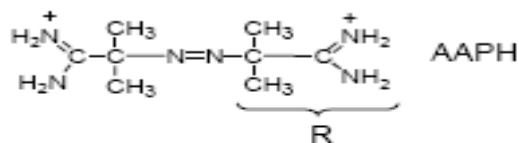
**Figure. Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•.** Le radical ABTS•+ (absorbant à 734nm) est formé par arrachement d'un électron  $e^-$  à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H•), l'atome d'azote concerné piège un H•, conduisant à l'ABTSH•+, ce qui entraîne la décoloration de la solution [44]

D'autres auteurs utilisent l'acide 2,2'- azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ou ABTS<sup>-</sup>, à la place de son sel d'ammonium et analysent l'inhibition du radical ABTS<sup>•-</sup>, produit par un initiateur de radicaux thermolabiles, l'ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropane) HCl) [45]. La cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction. La capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester, jus de fruit par exemple [39]. La littérature fournit le TEAC de certains antioxydants, respectivement pour la vitamine C et le β-carotène : 0,99 mM [39] et 1,9 mM [42]

### III. Tests de capture des radicaux peroxydes

Dans des modèles d'oxydation comme la peroxydation lipidique la génération de radicaux libres à taux constant est idéale. Le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH) est un générateur hydrophile de radicaux libres, tandis que le 2,2'-azobis-(2,4-méthylvaléronitrile) (AMVN) est lipophile. Ils ont l'avantage de se décomposer à vitesse constante en fonction de la température appliquée. A l'air, les radicaux R<sup>•</sup> se combinent très rapidement avec O<sub>2</sub> pour former les radicaux peroxydes ROO<sup>•</sup> (Figure suivante)





L'AMVN n'étant plus disponible commercialement, seul l'AAPH est utilisé dans les tests qui suivent.

### **III.1 Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

La particularité de ce test ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) est de mesurer séparément à partir d'une même solution biologique la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui la composent. Les deux types d'antioxydants de l'échantillon aqueux sont séparés par une extraction à l'hexane. Puis les antioxydants hydrophiles et lipophiles sont analysés en utilisant le même générateur de radicaux peroxydes l'AAPH à 37°C (voir figures suivantes). Les composés sont évalués pour leur capacité à empêcher l'oxydation de la fluorescéine par les radicaux peroxydes pendant 30 min. La lecture de la fluorescence de la solution est faite toutes les minutes et permet d'obtenir une cinétique de dégradation de la fluorescéine en fonction du temps qui sera stoppée (temps de latence) ou juste ralentie par les antioxydants présents. Ce test est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et aux extraits de fruits et légumes.

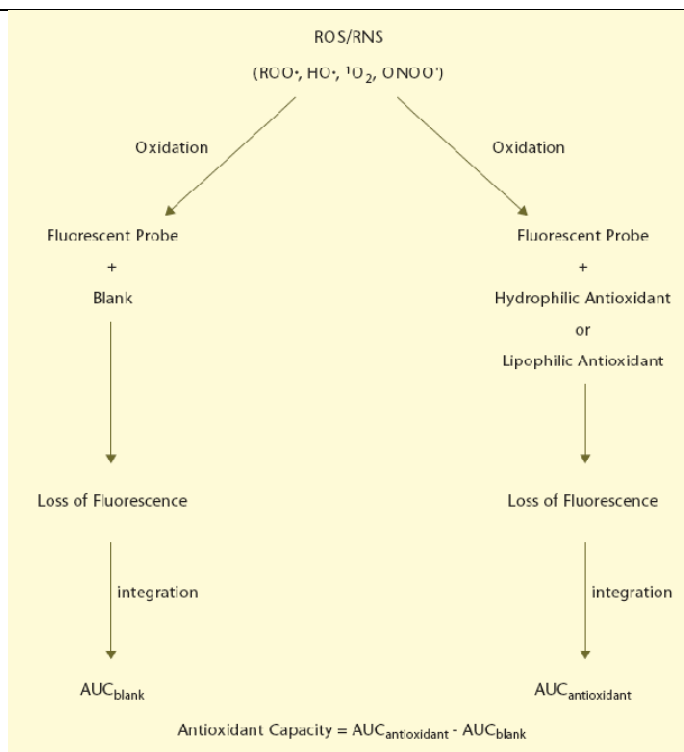


Figure. Etapes de mesure de l'activité antioxydante selon le test ORAC

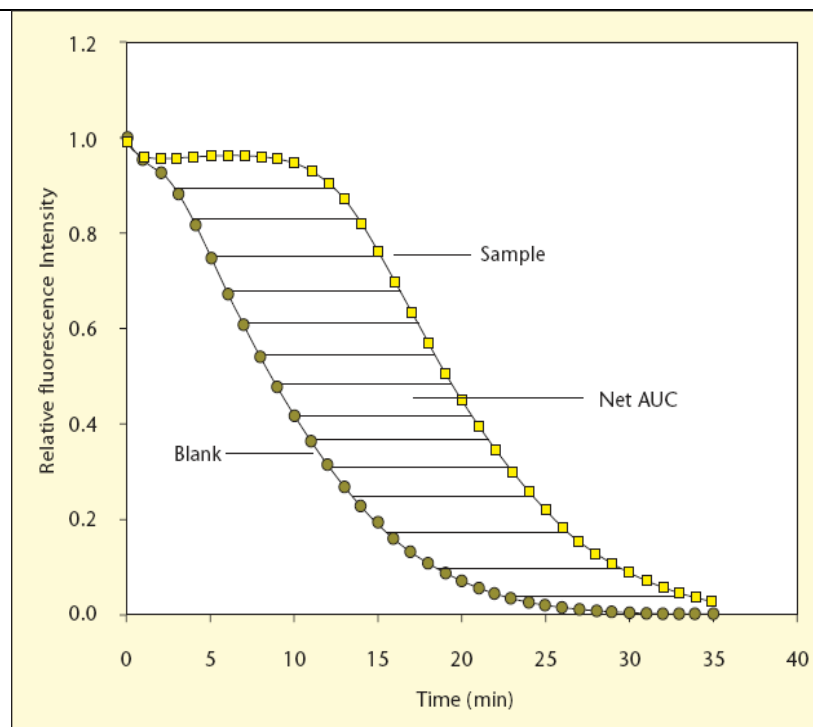
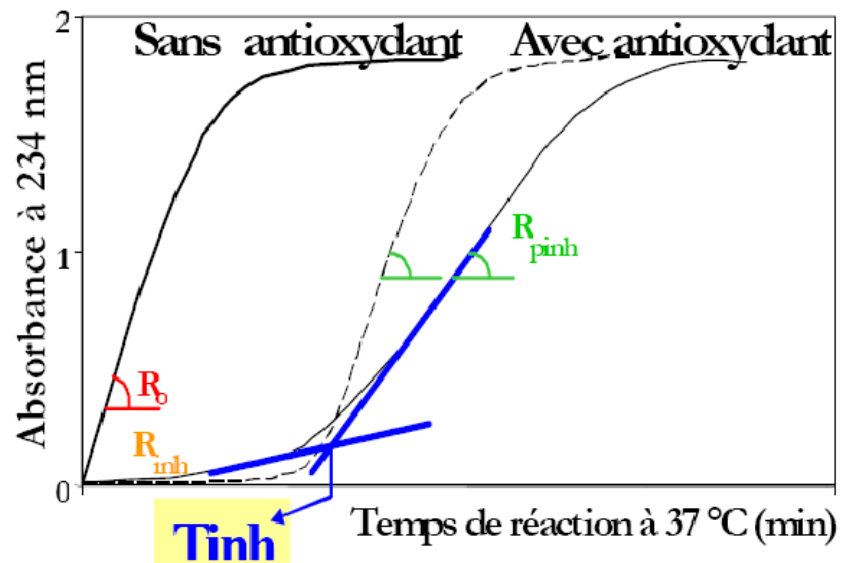
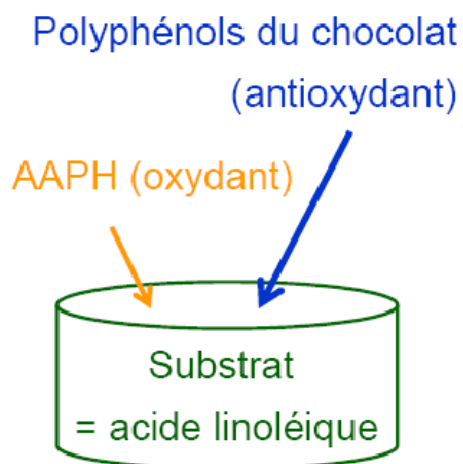


Figure. Mesure de la fluorescence de la fluorescéine à blanc et dans une solution antioxydante

### III.2 test TRAP

Dans le test TRAP (total radical trapping antioxidative potential), l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol, la R-phycoérythrine et la dichlorofluorescéine. Les radicaux peroxydes issus de l'APPH oxydent l'indicateur donnant des radicaux qui émettent de la fluorescence. La capacité des antioxydants à empêcher l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. Ce test est souvent utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin.

## Oxydation par l'AAPH de l'acide linoléique dans l'eau



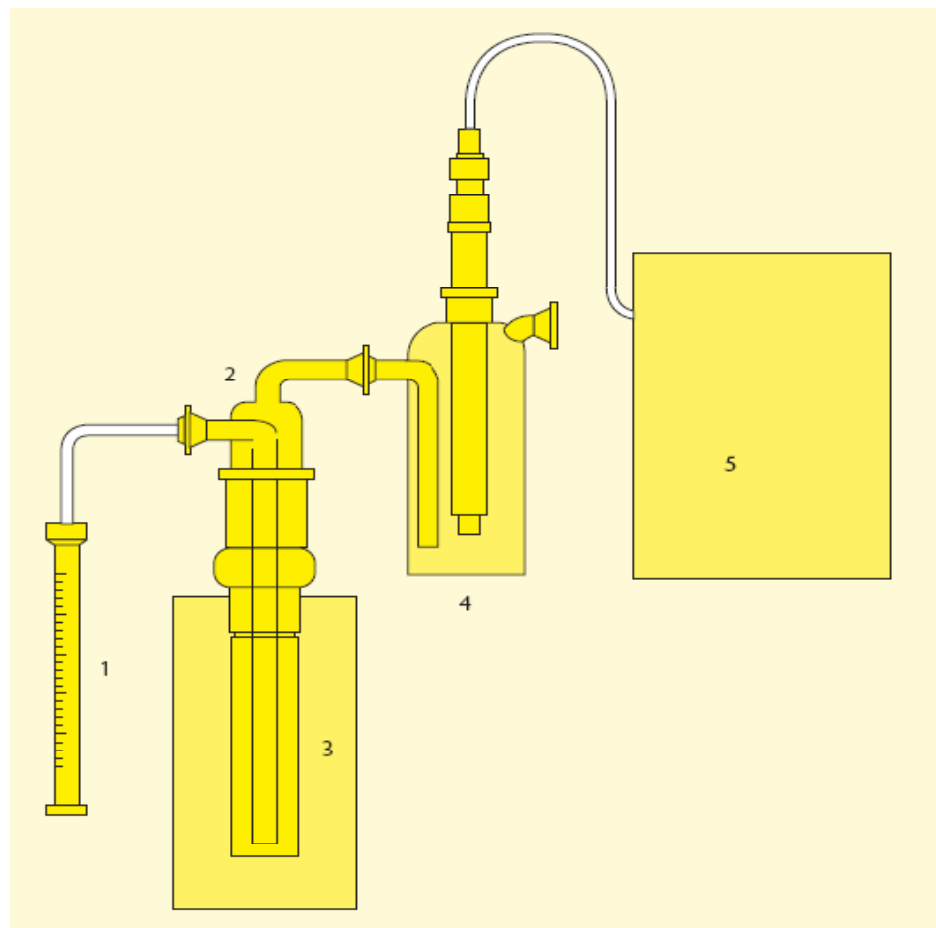
→ Mesure de l'absorbance à 234 nm en f(temps) (diènes conjugués)

→ Déduction d'un Temps d'inhibition

### Exemple

#### IV. Test Rancimat

Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une autooxydation accélérée, dans un appareil automatisé (figure suivante) qui chauffe les solutions à 100 °C environ avec un apport d'air constant (20 L/h). Cet appareil détecte les composés volatils libérés qui indiquent indirectement le degré d'oxydation du corps gras. Un temps de latence (d'induction ou d'inhibition) pendant lequel le corps gras n'est pas altéré est évalué. A titre d'exemple, les huiles d'olive non raffinées sont testées sans addition de phénols pour comparer leurs résistances face à la dégradation thermique. D'autre part, des antioxydants peuvent aussi être ajoutés. Les corps gras typiquement testés sont les huiles végétales (olive plus ou moins raffinée, tournesol) voire les graisses animales.



Vue schématique du dispositif d'un test Rancimat. 1) Débitmètre (flux d'air 20 L/h) ; 2) fiole contenant l'échantillon d'huile ou de graisse ; 3) bloc de chauffage en aluminium ; 4) récipient contenant l'eau distillée et l'électrode ; 5) amplificateur du signal de conductivité et enregistreur 6 voies.

#### V. test de $\beta$ -carotène : un indicateur d'oxydation

Une émulsion est préparée contenant du  $\beta$ -carotène et de l'acide linoléique puis elle est solubilisée dans une solution aqueuse de Tween-40. L'antioxydant (solubilisé dans le

MeOH) est ajouté et la solution est portée à 50°C pendant 120 min. Le  $\beta$ -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation. Or l'ajout d'un second antioxydant va permettre sa préservation; c'est cette protection qui va être mesurée. Ainsi l'absorbance du  $\beta$ -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant. Une activité antioxydante (AA) est calculée pour chaque antioxydant à une concentration donnée :

$$AA = (A_{\text{antiox } 120} - A_{\text{témoin } 120}) / (A_{\text{antiox } 0} - A_{\text{témoin } 120})$$

Avec respectivement  $A_{\text{antiox } 0}$  et  $A_{\text{antiox } 120}$ , les absorbances de la solution en présence d'antioxydant à 0 et 120 min et  $A_{\text{témoin } 120}$ , l'absorbance de la solution sans antioxydant à 120 min.

## VI. test FRAP

Le pouvoir antioxydant d'une solution comme le plasma est déterminé grâce au test FRAP (Ferric reducing ability of plasma). A faible pH et à 37 °C, le complexe tripyridyltriazine ferreux (TPTZ-Fe<sup>3+</sup>) est ajouté à l'échantillon. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme Fe<sup>2+</sup> et son absorbance est lue à 593 nm toutes les 15 s durant la période de mesure. Ce test est rapide et donne des résultats reproductibles pour des solutions biologiques ainsi que pour des solutions pures d'antioxydants où la réaction est indépendante de la concentration car la réponse est linéaire.

### Mode 2. Evaluation de produits résultant de l'oxydation

L'efficacité des antioxydants (traduite en rapport d'inhibition, IR) correspond à :

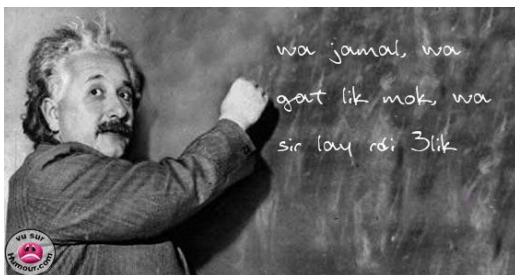
$$IR (\%) = [(a-b) / (a-c)] \times 100$$

$a, b, c$  sont les concentrations en dérivés oxydés respectivement, sans antioxydant et en présence de l'antioxydant à tester après incubation et sans antioxydant avant incubation. Le dosage des produits formés (en particulier des hydroperoxydes) est effectué par des techniques photométriques plus ou moins directes (tableau suivant)

Spectrophotométrie directe d'hydroperoxydes insaturés
Dosage chimique des dérivés oxydés
<ul style="list-style-type: none"><li>• Évaluation des peroxydes</li><li>• Dosage d'hydroperoxydes</li><li>• Détermination du malonaldéhyde</li></ul>
Examen de dérivés carbonylés sous forme de dinitrophénylhydrazones
Évaluation de la dégradation du $\beta$ -carotène en présence d'acide linoléique

Tableau : Techniques d'évaluation des produits résultants de l'oxydation [46, 47, 48, 49, 50, 51, 52,53]

### ***Ce qu'i faut retenir !***



Les méthodes d'évaluations du potentiel antioxydant d'une substance sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H<sup>•</sup>. Parmi les méthodes d'évaluation, celles comparant l'aptitude du produit à celle du Trolox® (la méthode TEAC en particulier) sont intéressantes. En effet, elles mesurent directement la réactivité d'un composé donneur de H<sup>•</sup>, sans examen d'un produit de dégradation. L'examen au laboratoire de la méthode du TEAC a montré qu'elle était applicable dans différents solvants (diméthylsulfoxyde, méthanol, éthanol ou tampon phosphate) quelle qu'en soit l'hydrophile ou l'hydrophobie. La méthode automatisée ORAC diffère de celle du TEAC et du DPPH en évaluant l'activité antioxydante de manière dynamique avec des radicaux actifs sur le plan pathologique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1]. LAROCHE M, ANTON PM, GARCIA-VILLAR R, *et al.* Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *Br J Nutr* 2003 ; 89 : 777-86.
- [2] Wu X *et al.* *J Agric Food Chem.* 2004
- [3] <http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89pic%C3%A9a>
- [4] KH Ekborg-Ott, A Taylor and DW Armstrong (1997) Varietal Differences in the Total and Enantiomeric Composition of Theanine in Tea. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 353-363
- [5] P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, *Les polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 2006, 398 p. (ISBN 2-7430-0805-9)
- [6] John H. Grabber , John Ralph , Catherine Lapiere , Yves Barrière. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants' *Comptes Rendus Biologies, Volume 327, Issues 9-10, September-October 2004, Pages 847-860*
- [7] Usha Thiyam, Annette Kuhlmann, Heiko Stöckmann, Karin Schwarz Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential *Comptes Rendus Chimie, Volume 7, Issues 6-7, June-July 2004, Pages 611-616*
- [8] M. Esti, M. Contini, E. Moneta, F. Sinesio Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage *Food Chemistry, Volume 113, Issue 4, 15 April 2009, Pages 1095-1100*
- [9] J.F. Hammerstone, S.A. Lazarus, A.E. Mitchell, R. Rucker, H.H. Schmitz, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 490–496.
- [10] CZECZOT Hanna, Biological activities of flavonoids : A review, *Polish journal of food and nutrition sciences* ISSN 1230-0322 . 2000, vol. 9, no4, pp. 3-13 (177 ref.)
- [11] S.M. Willför, A.I. Smeds, B.R. Holmbom Chromatographic analysis of lignans *Journal of Chromatography A, Volume 1112, Issues 1-2, 21 April 2006, Pages 64-77*
- [12] PENNOCK J.F., HEMMING F.M., KERR J.D. A reassessment of tocopherol chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 542-548.
- [13] FERNHOLZ E.J. Constitution of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60, 700-710.
- [14] Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T., & Oota, T. (2004). Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other Actinidia species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5472–5475.
- [15] Cabrera, C., Artacho, R., & Gimenez, R. (2006). Beneficial effects of green tea. A review. *Journal of American College of Nutrition*, 25, 79–99
- [16] RAHMANI M. Mise au point sur le rôle des pigments chlorophylliens dans la photo-oxydation de l'huile d'olive vierge. *Olivae* 1989 ; 26 : 30-2.
- [17]. TSIMIDOU M, PAPADOPOULOS G, BOSKOU D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. Part I. *Food Chem* 1992 ; 45 : 141-4.
- [18] SALVADOR MD, ARANDE F, GOMEZ-ALONSO S, FREGAPANE G. Cornicabra virgin olive oil : a study of five successive crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem* 2001 ; 74 : 267-74.
- [19] MARTY C, BERSET C. Degradation products of trans-beta-carotene produced during extrusion cooking. *J Food Sci* 1988 ; 53 : 1880-6.
- [20] MINGUEZ-MOSQUERA MI, JAREN-GALAN M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J Sci Food Agric* 1995 ; 67 : 153-61.

- [21] STEENSON DF, MIN DB. Effects of beta-carotene and lycopene thermal degradation products on oxidative stability of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 2000 ; 27 : 1153-60.
- [22] Fengde Wang, Guihua Feng, Kaoshan Chen Defense responses of harvested tomato fruit to burdock fructooligosaccharide, a novel potential elicitor *Postharvest Biology and Technology*, Volume 52, Issue 1, April 2009, Pages 110-116
- [23] Benoîte Bourdin, Hervé Adenier, Yolande Perrin Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 45, Issue 12, December 2007, Pages 926-931
- [24] SIES introduction. In : ,Oxidative stress : oxidants and antioxidants. Academic Press : London, 1991, XV-XXII
- [25] Saulnier L, Vigouroux J, Thibault JF. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr Res* 1995;272:241-53.
- [26] NAKAGAWA Y. Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 2004 ; 1011 : 177-84.
- [27] Josiane CILLARD Pierre CILLARD Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations OCL - Oleagineux - Corps Gras – Lipides 2006 Vol 13 N°1 pp.24-30
- [28] BUETTNER G. Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant : a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochem Photobiol* 1999 ; 70 : 858-67.
- [29] MUGGLI R. Free radical tissue damage : the protective rôle of antioxidant nutrients. In : Conrongiu F, Banni S, Dessi MA, Rice-Evans C, eds. *Free Radicals and Antioxidants in Nutrition*. London : Richelieu press, 1993 : 189-204.
- [30] VAN ACKER S, BAST A, VAN DER VIJGH W. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In : Rice-Evans C, Packer L, eds. *Flavonoid in health and disease*. Marcel Decker New York, 1998 : 221-51.
- [31] MOREL I, LESCOAT G, COGREL P, *et al.* Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures. *Biochem Pharmacol* 1993 ; 45 : 13-9.
- [32] ROCHE Marjolaine THÈSE. Ecole doctorale "Sciences et Agronomie" (ED 380). ETUDE CINETIQUE ET MECANISMES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES PHENOLS DE L'OLIVE DANS DIFFERENTS SYSTEMES MODELES Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique lié au sérum albumine. Université d'Avignon 5 Mars 2005.
- [33] L. Lesage-Meessen, D. Navarro, S. Maunier, J-C. Sigoillot, J. Lorquin, M. Delattre, J-L. Simon, M. Asther, M. Labat Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems *Food Chemistry*, Volume 75, Issue 4, December 2001, Pages 501-507
- [34] Ourdia Bouzid, David Navarro, Marjolaine Roche, Michèle Asther, Mireille Haon, Michel Delattre, Jean Lorquin, Marc Labat, Marcel Asther, Laurence Lesage-Meessen Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product *Process Biochemistry*, Volume 40, Issue 5, April 2005, Pages 1855-1862
- [35] Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. F. Chemat, M.E. Lucchesi, J. Smadja. Brevet Américain, US 2004/0187340 A1, 2004.



- [36] Jeon, Y. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35, 471–478.
- [37] Sotirios Kiokias, Charikleia Dimakou, Vassiliki Oreopoulou Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions *Food Chemistry, Volume 114, Issue 4, 15 June 2009, Pages 1278-1284*
- [38] REZZOUG S.A., BAGHDADI M.W., LOUKA N., BOUTEKEDJIRET C. & ALLAF K. " Study of a New Extraction Process : Instantaneous Controlled Decompression. Application for Extraction of Essential Oil from Rosemary Leaves " *Flavour & Fragrance Journal*, Vol. 13, N°4, 251-258 [1998].
- [39] Miller NJ, Rice-Evans CA. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem* 1997 ; 60 : 331-7.
- [40] Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 2001 ; 73 : 239-44.
- [41] Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, *et al.* Antioxidant activity of phenolics extracted from olea europaea L leaves. *Food Chem* 2000 ; 68 : 457-62.
- [42] Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, *et al.* Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 1996 ; 384 : 240-2.
- [43] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 26 : 1231-7.
- [44] Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 26 : 285-94.
- [45] Van Den Berg R, Haenen GR, Van Den Berg H, *et al.* The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem* 2000 ; 70 : 391-5.
- [46] Krings U, El-Saharty YS, El-Zeany BA, *et al.* Antioxidant activity of some extracts from roasted wheat germ. *Food Chem* 2000 ; 71 : 91-5.
- [47] Pryor WA, Cornicelli JA, Devall LJ, *et al.* A rapid screening test to determine the antioxidants potencies of natural and synthetic antioxidants. *J Org Chem* 1993 ; 58 : 3521-32.
- [48] McDonald RE, Hultin HO. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J Food Sci* 1987 ; 52 : 15-27.
- [49] Yen GC, Duh PD, Chuang DY. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chem* 2000 ; 70 : 437-41.
- [50] Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric Biol Chem* 1981 ; 45 : 735-9.
- [51] Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 2001 ; 73 : 285-90.
- [52] Siu GM, Draper HH. A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *J Food Sci* 1978 ; 43 : 1147-9
- [53] Mansour EH, Khalil AH. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. *Food Chem* 2000 ; 69 : 135-41.