

Type of the Paper (Article)

EXTRACTION DE LA CATÉCHINE À PARTIR DU ROMARIN ET ÉTUDE DE SON ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Filissa Abdenacer^{1,*}, Yahiaoui Hadjer¹ Filissa Ouiem¹, and André Darchen²

¹ Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Ferhat Abbas, Sétif-1, 19000, Algeria. Email: Abdenacer.filissa@gmail.com

² UMR CNRS n° 6226 Institut des Sciences Chimiques de Rennes, ENSCR, 11 Allée de Beaulieu, CS 50837, 35708, Rennes Cedex 7, France. Email: Andre.Darchen@ensc-rennes.fr

* Corresponding authors: Abdenacer.filissa@gmail.com

Résumé

Rosmarinus officinalis L est une plante aromatique médicinale qui représente une source de métabolites secondaires biologiquement actifs tels que les huiles essentielles et les flavonoïdes. L'identification de l'espèce a été réalisée en se basant sur les caractéristiques morphologiques externes qui ont été trouvés identique à ceux décrit au niveau de la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis.L* possèdent plusieurs vertus thérapeutique, la méthode la plus simple utilisée pour les extraire est l'hydrodistillation qu'on a associé à l'extraction liquide-liquide par l'éther de pétrole, cela nous a permis d'avoir un meilleur rendement de 1,69 % qui est conforme au standards international.

L'extraction solide-liquide des flavonoïdes et la catéchine plus précisément a donné un résultat meilleur avec l'extracteur soxhlet (149,79 mg/150 g de matière sèche) par rapport à la macération (72,79mg/150g de matière sèche). L'analyse par CCM et la spectrophotométrie UV-Vis et IR de l'extrait en utilisant la catéchine pure comme témoin nous a permis de confirmer la présence des catéchines dans notre extrait.

L'étude de l'activité antioxydante des catéchines extraites à partir des feuilles du romarin selon la méthode électrochimique a montré que ces dernières possèdent une activité antioxydante importante, ses résultats sont confirmés par un test de piégeage du radical libre DPPH avec une concentration efficace EC50 égale à 25,8 µg/mL, qui n'est pas loin de celle trouvée avec l'acide ascorbique 16,2µg/mL.

Mots clés: Romarin, huile essentielle, extraction, flavonoïdes, catéchines, activité antioxydante.

1. Introduction

Rosmarinus officinalis appelé romarin en langage courant est une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées, poussant à l'état spontané sur le pourtour méditerranéen, cette plante possède plusieurs vertus thérapeutiques grâce a son contenu en polyphénols et les huiles essentielles [1]. De multiples travaux ont été réalisés sur la partie aérienne du romarin dans le but d'extraire ses composants qui ont des vertus thérapeutiques, y'auna des chercheurs qui se sont intéressés aux huiles essentielles du romarin et l'étude de leur activité antioxydante vis-à-vis les dommages gastriques (C. Takayama et al., 2016) [2], et d'autres qui se sont intéressés à l'extraction des huiles essentielles et leurs analyses avec la GC/MS et l'étude de la propriété antibactérienne (S. Ayadi et al., 2011) [3], des recherches aussi basées sur l'analyse par HPLC-DAD et GC-MS des extraits hydroalcooliques, et l'évaluation de leurs activités biologiques, à savoir antioxydante et antimicrobienne par DPPH, ABTS, FRAP et la diffusion sur disque (H. Bendif et al., 2016) [4], un groupe de chercheurs a étudié l'activité antioxydante du résidu aqueux après hydrodistillation, en particulier l'acide rosmarinique et carnosique (A. Wollinger et al., 2016) [5].

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: First name Last name

Received: date: 13/05/2024

Revised: date: 29/05/2024

Accepted: date: 13/06/2024

Published: date: 30/07/2024

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted publication under the terms and conditions of the Creative Commons

Dans ce présent travail on vise à démontrer la présence des flavonoïdes et principalement les catéchines dans les feuilles du romarin de la région de Sétif et de déterminer les meilleures conditions d'extractions et leurs propriétés biologiques et spécifiquement l'activité antioxydante. Pour cela notre étude englobe deux aspects, le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la quantification et l'identification des flavonoïdes et plus exactement les catéchines, par l'utilisation des différentes méthodes spectrales et chromatographiques. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des catéchines vis-à-vis du radical libre DPPH et par méthode électrochimique.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matière végétale

La partie aérienne qui est utilisée dans notre étude est les feuilles de *Rosmarinus officinalis* qui ont été récoltées en mois de janvier 2017 de la région de Sétif en Algérie, elles ont été nettoyées avec de l'eau de robinet et séchées à l'ombre et à la température ambiante pendant une semaine. L'identification de la plante a été réalisée au niveau du laboratoire de botanique pharmaceutique sous l'orientation de Dr Chermate Sabah spécialiste en botanique en utilisant comme référence la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

2.2 Extraction des huiles essentielles des feuilles du romarin

La méthode suivit pour l'extraction des huiles essentielles est celle de Ayadi et al [3]. La masse totale de notre échantillon étudié est de 300 g. Après lavage des feuilles et séchage à l'aire libre, à l'ombre pendant environs une semaine, ces dernières ont été broyées et soumises à l'hydrodistillation pendant quatre heures, La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases:

- 1) Une phase huileuse a été récupérée dans un petit flacon bien fermé.
- 2) Une phase aqueuse (eaux aromatiques ou hydrolat aromatique) contient une quantité non négligeable d'huile soit sous forme solubilisée, soit sous forme de fines gouttelettes dispersées. La récupération de ces huiles est réalisée par une extraction par 20 mL d'éther de pétrole (coupe 40-65°C) 3 fois. Le solvant est évaporé à l'aide d'une plaque chauffante à une température de 60°C (température proche de sa température d'ébullition 65°C).

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la plante traité. Les rendements d'extractions des huiles essentielles: phase organique (RHEorg), phase aqueuse (RHEaq) et le rendement total (RT) sont définis comme suit:

RHEorg = (masse des huiles essentielles phase organique)/(Masse initiale de matière végétale sèche)

RHEaq = (masse des huiles essentielles phase aqueuse)/(Masse initiale de matière végétale sèche)

$$\mathbf{RT = RHEorgt + RHEaq}$$

2.3 Extraction des flavonoïdes (catéchines):

2.3.1. Extraction solide-liquide

Après avoir éliminé les huiles essentielles de notre échantillon on sèche la poudre pendant 24h à l'air libre à l'abri de la lumière, puis on passe à l'extraction hydroalcoolique des flavonoïdes dans les quelles se trouvent les catéchines. L'extraction liquide solide a été réalisée avec 2 méthodes dans le but de faire une étude comparative concernant la teneur en flavonoïdes et catéchines.

Extraction par l'appareil de soxhlet en utilisant 300 mL d'un solvant hydroalcoolique (eau, éthanol), (80/20) (V/V) sachant que les 20% d'eau contient notre hydrolat après avoir éliminé les huiles de ce dernier, l'extraction s'est déroulé pendant 5 cycles. Pour

une même masse de la poudre traitée avec l'extracteur soxhlet on a utilisé la macération utilisant un mélange éthanol/eau (80/20) (V/V), pendant 48 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Nos deux filtrats sont soumis à une évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60°C.

2.3.2. Extraction liquide-liquide

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de Brunethon [6] avec une légère modification. Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. Le fractionnement de l'extrait hydroéthanolique brut a été mené en utilisant successivement trois solvants organiques de polarités croissantes, l'éther de pétrole, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. Nous avons récupéré la fraction d'acétate d'éthyle, qui a subi une évaporation pour l'obtention d'un résidu brun sur lequel on a effectué nos analyses qualitatives et quantitatives. La Figure 1, résume les étapes de fractionnement de l'extrait brut.

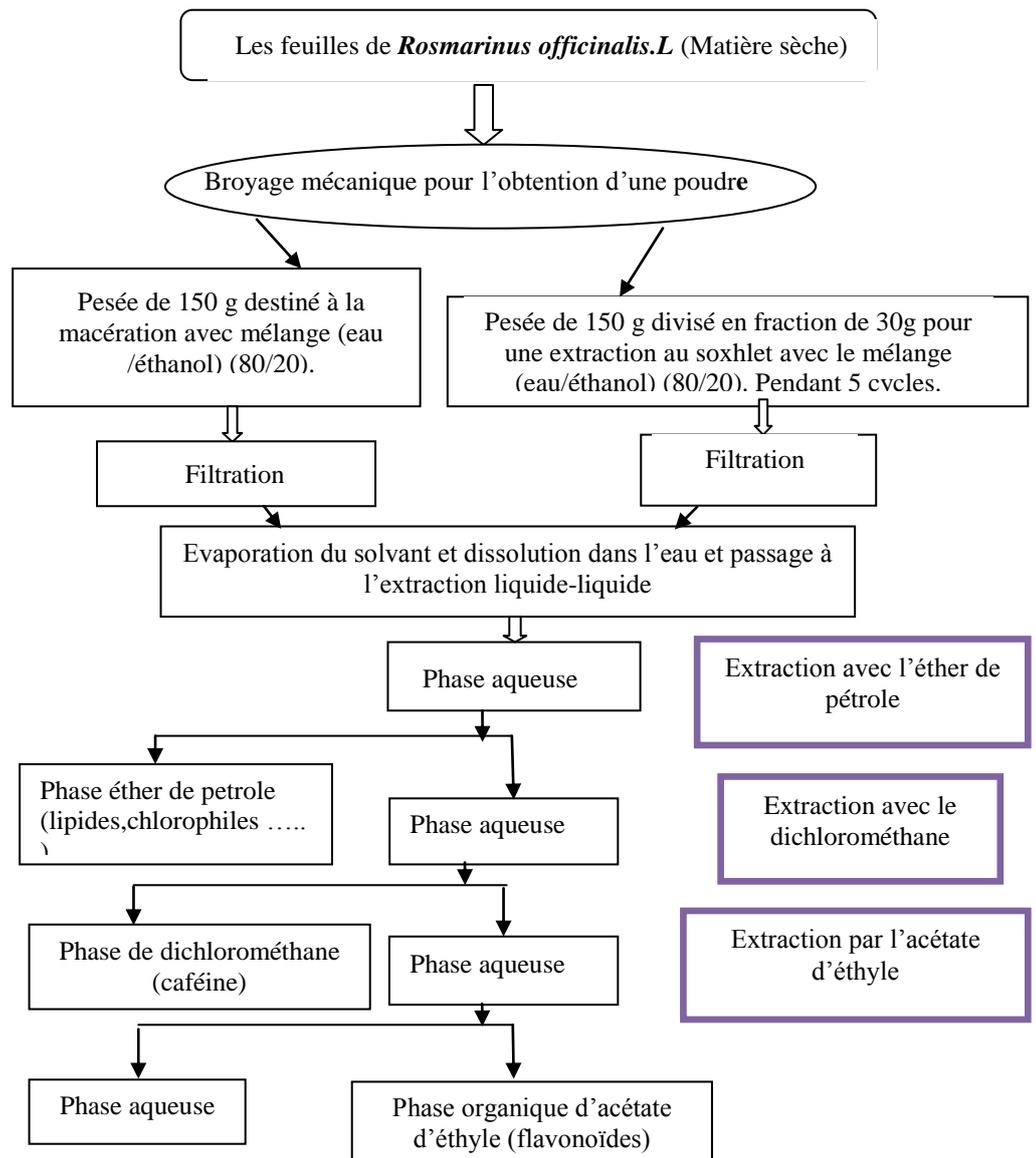


Figure 1. Etapes des extractions des flavonoïdes et la catéchine du ramarin

2.4. Caractérisation qualitatives et quantitatives des catéchines extraites

2.4.1 Caractérisation des catéchines par CCM

L'identification des catéchines dans nos deux extraits après extraction liquide-liquide obtenu par macération et par l'extracteur soxhlet s'est faite à l'aide d'un témoin positif qui est la (+)-Catéchine à 1 mg/mL et un autre flavonoïde qui est la quercétine. L'usage de la quercétine a pour but de distinguer les catéchines des autres flavonoïdes par le calcul des rapports frontaux.

Le rapport frontal est donné par la relation: $Rf = d / D$.

D: la distance parcouru par le front du solvant.

d: distance entre la ligne de dépôt et le centre de spot.

2.4.2 Identification des catéchines par spectrophotométrie infrarouge IR

Après séchage totale de l'extrait, 4 mg de la poudre est broyée avec 100 mg de KBr. Le mélange est introduit dans une matrice en acier soumise à une forte pression, cela permet d'obtenir une pastille transparente analysée ensuite par un spectrophotomètre infrarouge, et on procède de la même manière pour la catéchine de référence. Le but de ces essais est d'enregistrer les spectres infrarouges et les commenter par le biais des pics afin de rechercher et identifier les catéchines dans notre échantillon et faire une comparaison avec le spectre infrarouge de référence. Le balayage a été réalisé entre 400 à 4000 cm^{-1} .

L'appareil utilisé: C'est un spectrophotomètre de marque (SHIMADZU FTIR-8400S).

2.4.3 Caractérisation qualitatif des catéchines extraite par spectrophotométrie UV-Vis :

Pour identifier les catéchines au niveau de notre extrait on a réalisé une dilution de 1/250 de l'extrait contenue dans l'acétate d'éthyle avec le même solvant, et on l'a analysé par un spectrophotomètre UV Visible, en faisant un balayage de 250-350 nm. Pour confirmer le type de catéchine de référence, on a réalisé une dilution de 1/50 d'une solution de 1mg/ml de la catéchine pure dissoute dans l'acétate d'éthyle et on a suivi la même procédure d'analyse.

D'après l'étude réalisée par Gadkari et al [7], les différents types de catéchines ont un maximum d'absorption dans l'UV-Vis aux longueurs d'ondes entre 210- 280 nm.

L'appareil utilisé: C'est un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1800.

2.4.4 Dosage des flavonoïdes par spectrophotométrie UV-Vis

La méthode utilisée pour l'estimation du taux des flavonoïdes totaux est celle de JB. Harborne et al [8] au chlorure d'aluminium. Un volume de 1mL de chacun de nos deux extraits sec obtenu par Soxhlet ou par macération dilué dans l'éthanol est ajouté à 1 mL d'une solution éthanolique de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g/75 mL d'éthanol). Après 10 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, un complexe jaunâtre est formé et on mesure son absorbance à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme contrôle positif.

2.4.5 Dosage des catéchines par spectrophotométrie UV-Vis

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la (+)-catéchine pure, et par la mesure de l'absorbance de nos 2 échantillons obtenus par soxhlet et par macération à 280 nm après dilution à 1/50 dans de l'acétate d'éthyle, on est arrivé à déterminer la teneur des catéchines dans nos deux extraits, ainsi faire une comparaison quantitative entre ces deux derniers. les résultats sont exprimés en mg de catéchine par gramme d'extrait.

2.5 Etude de l'activité anti oxydante

2.5.1 La méthode électrochimique

Le principe général de la voltampérométrie cyclique est l'obtention d'une réponse courant/potentiel responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant une exploration et variation progressive du potentiel d'électrode (balayage de potentiel) [9].

Appareillage

- Potentiostat/galvanostat/ZRA Référence 3000.
- Une cellule basée sur un système à trois électrodes immergées dans la solution à analyser.
- Trois électrodes:
 - 1) Une électrode de travail (électrode indicatrice) de carbone vitreux.
 - 2) Une électrode de référence au calomel ECS permettant la mesure du potentiel de l'électrode indicatrice.
 - 3) Une électrode auxiliaire (contre-électrode) de platine.
- Agitateur magnétique.
- Gaz : azote.
- Solutions :
 - (Na₂SO₄, 5H₂O) (0,1 M).
 - Solution de 0,3 mg/mL solution mère à partir de la quelle on a préparé 2 dilutions de facteurs 1/5 et 2/5 (0.06 et 0.12 mg/mL).

Mode opératoire de l'étude électrochimique de l'extrait

L'étude des propriétés antioxydante de l'extrait en milieu Na₂SO₄ (0,1 M) a été effectuée sur une plage de potentiel allant de -120 a -1200 mV/ECS.

On a réalisé 5 tests d'électrochimie avec les solutions suivantes:

- Solution de 0.1 M Na₂SO₄
- Solution de 0.1 M Na₂SO₄ + azote
- Solution de 0.1 M Na₂SO₄ +0,06 mg/mL d'extrait de catéchine.
- Solution 0.1 M Na₂SO₄ +0,12 mg/mL d'extrait de catéchine.
- Solution 0.1 M Na₂SO₄ +0,30 mg/mL d'extrait de catéchine.

Le test se base sur le degré de réduction d'O₂ en présence de l'extrait.

2.5.2 Test de piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical stable libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à une longueur d'onde de 515 à 518 nm. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [10]. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune, Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie [11].

Protocole

Ce protocole a été déjà suivi par Fadili et al [12], dans leur étude réalisé sur la teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. Le choix de la solution mère a été réalisé en effectuant plusieurs dilutions à partir d'une solution éthanolique de l'extrait de concentration de 10 mg/mL. 2,8 mL d'une solution éthanolique de DPPH (0.024g/l) est ajouté à 200 µL de chaque dilution, après agitation manuel et incubation pendant 30 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière, on a remarqué un virage vers le jaune entre deux dilutions de concentration 24 µg/mL et 32 µg/mL. Donc la solution mère est de concentration 32µg/mL, 200µL de chaque dilution préparé à différentes concentrations (16µg/mL, 18µg/mL, 20µg/mL, 22µg/mL, 24µg/mL, 26µg/ml, 28µg/mL et 32ug/mL.) est ajoutée à 2,8mL de solution éthanolique de DPPH (0.024g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 200µL de l'éthanol avec 2,8 mL de la solution éthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide

ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH (PI%).

$$PI\% = [(Abs\ de\ contrôle - Abs\ de\ échantillon) / Abs\ de\ contrôle] * 100$$

Les valeurs des IC50 sont déterminées graphiquement par la régression linéaire. Vu qu'il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique.

3. Résultats et discussions

3.1 Extraction de l'huile essentielle des feuilles du romarin.

3.1.1 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle du Romarin

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation et extraction par un solvant (éther de pétrole) de la poudre sèche des feuilles de *Rosmarinus officinalis L.*, sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau 1: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L.*

	Aspect	couleur	Odeur
AFNOR	Liquide mobile limpide	Presque incolore à jaune pale	Plus au moins camphrée selon l'origine
huiles extraites	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Amphrée

3.1.2 Rendement en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles extraite dans la phase organique et la phase aqueuse ainsi que le rendement totale sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 2: Les rendements en huile essentielle.

RHEorg	RHEaq	RT
1,54 %	0,15 %	1,69%

Le rendement 1.69 % est conforme avec la norme donnée par l'ONIPPAM (1,5 à 2%) en accord avec afnor [13].

3.2 Caractérisation qualitatives et quantitatives des catéchines extraites :

3.2.1 Caractérisation des catéchine par CCM

Après l'utilisation de plusieurs systèmes d'élution on a retenu les trois systèmes cités si dessous qui ont donné une bonne élution par rapport aux autres:

Tableau 3 : Les systèmes utilisés pour l'identification des catéchines.

Systèmes utilisés	Volumes (v/v)
méthanol/eau/acide acétique	(9/0.5/0.5)
méthanol/eau/acide acétique	(4/0.8/0.2)
dichlorométhane/acétate d'éthyle	(2.5/2.5)

Les rapports frontaux obtenus avec les trois systèmes utilisés sont résumé dans le tableau suivant:

Tableau 4: Rapports frontaux des extraits et témoins utilisés

Systèmes d'élution	Rf de la catéchine témoin ECG	Rf de la quercétine	Rf de l'extrait par macération	Rf de l'extrait de soxlet
methanol/eau/acide acétique (9/0.5/0.5)(V/V/V)	Rf=0.97	/	Rf=0.96	Rf=0.95
methanol/eau/acide acétique (4/0.8/0.2) (V/V/V).	Rf=0.97	Rf=0.92	/	/
dichloromethane/ acétate d'éthyle (2.5/2.5)(V/V/V)	Rf=0.58	Rf=0.83	Rf1=0.63	Rf1=0.63

Interprétation des résultats des Rfs

Au niveau du premier système d'élution on remarque que les Rfs de la (+)-catéchine et de nos 2 extraits sont presque les mêmes, ce qui prouve la présence des catéchines dans notre extrait. Alors qu'au deuxième système les Rfs de la (+)-catéchine et de la quercétine et de nos 2 extraits sont très proches. Dans le troisième système on a eu une séparation meilleure des composants de nos 2 extraits avec une migration différente des 2 flavonoïdes témoins quercétine et catéchine, le résultat prouve la présence des catéchines majoritairement dans notre extrait avec un spot beaucoup plus foncé avec la présence d'autres flavonoïdes comme la quercétine mais à concentration plus faible vu la faible coloration du spot obtenu.

3.2.2 Identification des catéchines par spectrophotométrie infrarouge IR

La figure 2 représente le Spectre IR comparatif entre la catéchine pure de référence (C) et notre extrait. Dans cette partie on essayera de faire une comparaison entre les deux spectres obtenus dans le but de confirmer la présence des catéchine dans notre échantillon.

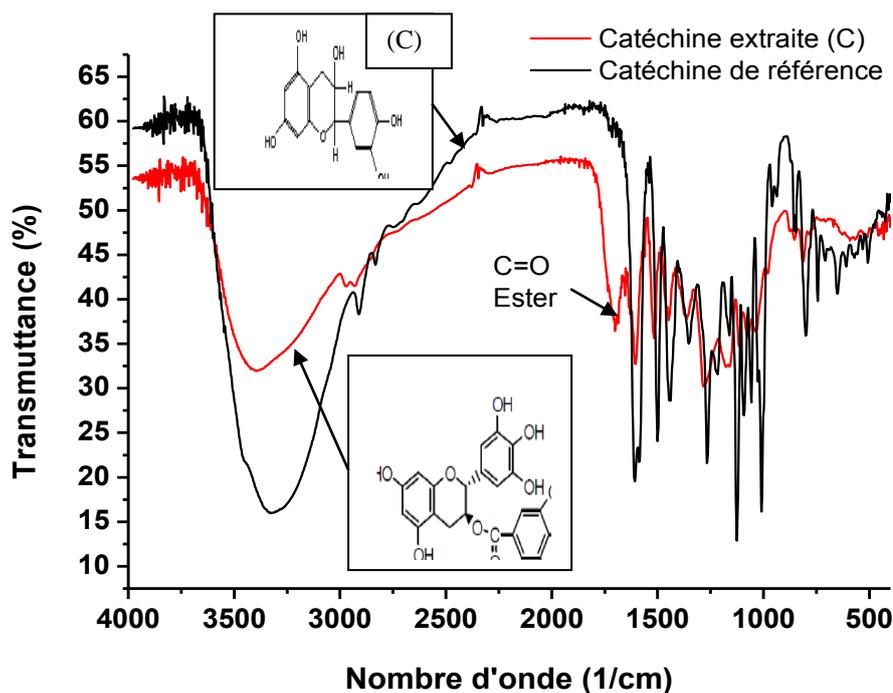


Figure 2 : Spectre IR comparatif entre la catéchine pure de référence (C) et notre extrait

Tableau 5: Résultats de caractérisations des catéchines extraites et (+)-catéchine de référence par IR

Bandes d'absorptions IR	(+)-Catéchine de référence (Nombre d'onde cm-1)	Catéchines extraites (Nombre d'onde cm-1)
Elongation OH lié d'intensité forte et large	3400-3200 (3335.12)	3400-3200 (3395.02)
Elongation C=C variable Aromatique	1680-1600 (1631.66)	1680-1600 (1607.22)
Elongation aliphatique C-H faible	3000-2900 (2925.60)	3000-2900 (2962.66)
Elongation C=O plus au moins forte de l'ester formé avec l'acide gallique		1750-1700 (1706.45)
Elongation C-O d'un alcool secondaire avec une bande forte	1125 -1000 (1036.07)	
Elongation C-O d'un ester 2 bandes fortes		1300-1050 1ère bande à 1174,86 2ème bande à 1282,54
Déformation O-H d'un alcool secondaire forte	1350-1260 (1287,54)	
Elongation C-O d'un phénol d'intensité forte	1200-1125 (1148,18)	1200-1125 (1125.54)
Déformation O-H	1410-1310 (1380.96)	1410-1310 (1362 .84)

Après avoir comparé entre les différentes bandes caractéristiques des liaisons existantes dans la (+)-catéchine qu'on a utilisée comme référence et celle de notre extrait, on constate que ces bandes sont similaires sauf que notre extrait présente une liaison ester

de plus par rapport à la référence ce qui prouve que nos catéchines extraites sont de forme estérifiées.

3.2.3 Caractérisation qualitatif des catéchines extraite par spectrophotométrie UV-vis

Les résultats de l'analyse spectrale UV visible sont montrés dans la figure

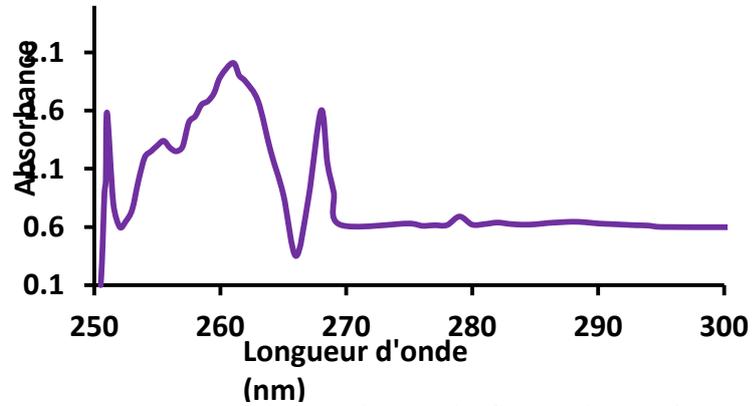
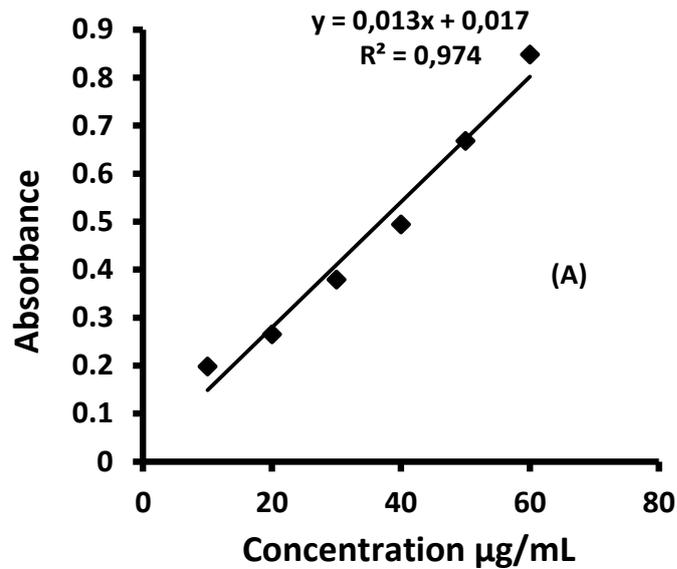


Figure 3 : Spectre d'absorption UV des flavonoïdes extraits.

Le spectre si dessus montre plusieurs bandes d'absorptions UV-Vis dans l'intervalle 250-324 nm et selon le tableau présentait par Gadkari et Balaraman [7] qui représente les caractéristiques physiques de quelques catéchines majoritaires, les catéchines extraites absorbent à 269 et 280 nm, donc elles sont de forme (-)-Epicatechine, (+)-Catéchine (C), (-)-Epigallocatechine EGC et (-)-Epicatechine gallate ECG et d'autre formes qui absorbent entre 210 et 280 nm donnant une bande d'absorption importante à 261 nm.

3.2.4. Dosage des flavonoïdes et catéchines par spectrophotométrie UV-Vis

La spectrophotométrie UV-Vis a permis de quantifier le taux des flavonoïdes et catéchines dans les 2 extraits obtenus par macération et par Soxhlet les résultats sont représentés par les figures VI 10 et VI.11.



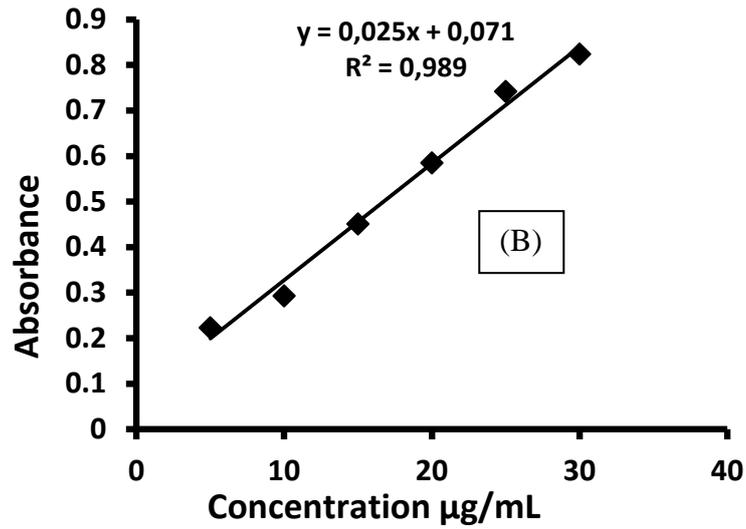
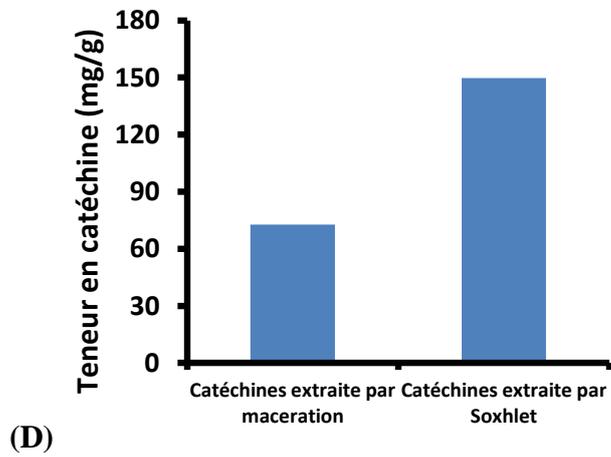
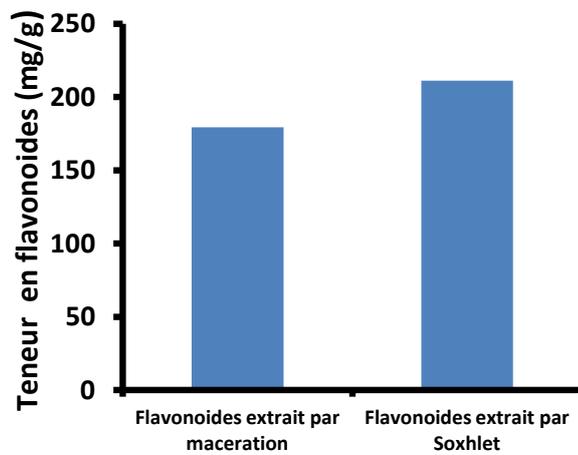


Figure 4 (A) et (B): Courbes d'étalonnages réalisés pour le dosage des flavonoïdes et catéchines respectivement.



(D)



(C)

Figure 5: Teneur des flavonoïdes (C) et catéchines (D) dans l'extrait obtenu par macération et par Soxhlet

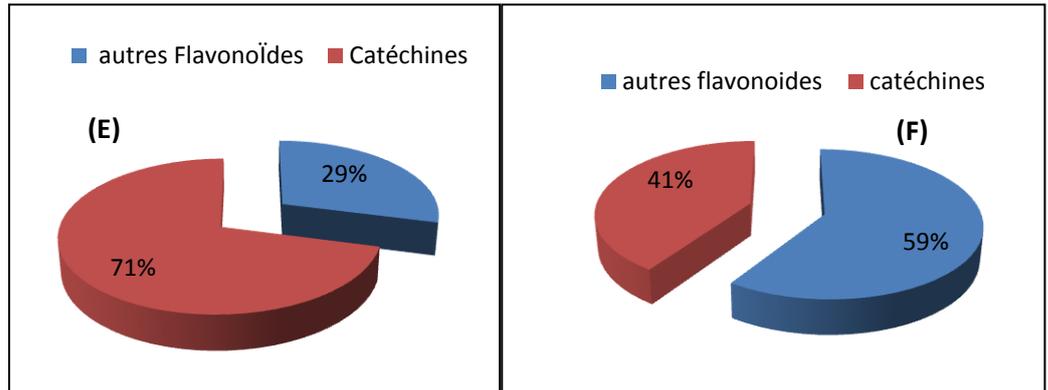


Figure 6: (E) Pourcentage des catéchines dans les flavonoïdes totaux extrait par Soxhlet et (F) par macération à partir de 150 g de matière sèche.

D'après les résultats obtenus à partir des courbes et les figures si dessus, on constate que les teneurs en flavonoïdes et catéchines plus précisément sont meilleures dans l'extrait de Soxhlet par rapport à celui obtenu par macération, donc le Soxhlet est une des meilleurs méthodes d'extraction solide-liquide qui permet d'avoir un meilleur rendement d'extraction des flavonoïdes.

3.3 Etude de l'activité anti oxydante

3.3.1 La méthode électrochimique

Le tracé des courbes voltampérométriques des cinq solutions sont représentées par la Figure VI.15.

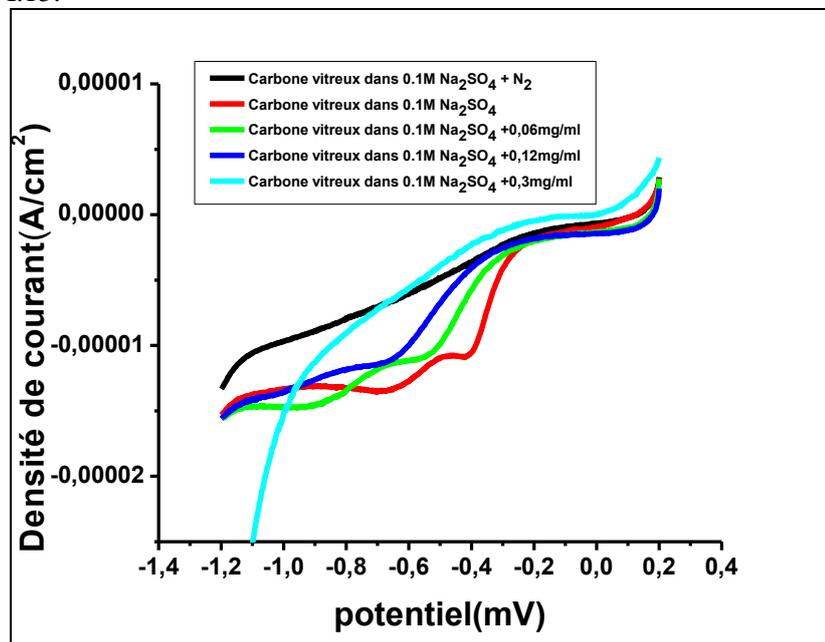


Figure 7: Voltamétrie cyclique d'une solution aqueuse contenant 0.1 M ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) comme électrolyte support et (0.06 mg/ml; 0.12 mg/mL; 0.3 mg/mL) de catéchines extraites à $V_b = 50 \text{ mV/s}$ sur une électrode de carbone vitreux (ET); électrode de référence (ER) en ECS et une électrode auxiliaire (EA) de platine.

Le domaine d'étude est limité entre -120 à -1200 mV/ECS pour pouvoir observer le couple redox O_2/O_2^- , on trace la courbe $I=f(E)$ du côté cathodique en fixant la vitesse de

balayage a 50mV/s, jusqu'à l'apparition clair du pic de réduction de l'O₂, ce qui signifie que nous sommes en présence d'un transfert de charge (réaction électrochimique) démontré par une intensité de courant. Le premier voltamogramme a été obtenu dans une solution saturée en O₂, qui montre l'apparition d'un pic cathodique a -410 mV attribué a la réduction d'O₂ (saturation avec l'O₂). Après un barbotage avec N₂ ce pic disparaît ce qui montre que le pic est attribué à la réduction de l'O₂. Après l'ajout de 0.06 mg/mL de l'extrait et en présence d'O₂, le courant du pic cathodique diminue, et pour confirmer la diminution du courant de pic cathodique la concentration de l'extrait a été doublé (0.12 mg/mL), donnant une importante diminution du pic de réduction de l'oxygène. L'intensité de courant a diminué encore en augmentant la concentration de l'extrait jusqu'à 0.3 mg/mL, cette nouvelle diminution d'intensité de courant présente une inhibition presque totale de la réduction de O₂ puisque elle devient presque superposable avec le pic caractérisant la courbe en absence d'O₂ (Après barbotage avec l'azote).

La diminution de la densité de courant en fonction de la concentration de l'extrait prouve la diminution de la réduction d'O₂ en O₂⁻ et cela confirme la disparition des O₂ par le phénomène de réduction réalisé par ce extrait. Cette méthode démontre le caractère antioxydant très puissant de l'extrait, qu'on va confirmer en suite par le test de piégeage du radical libre DPPH.

3.3.2 Test de piégeage du radical libre DPPH

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés par la figure 8.

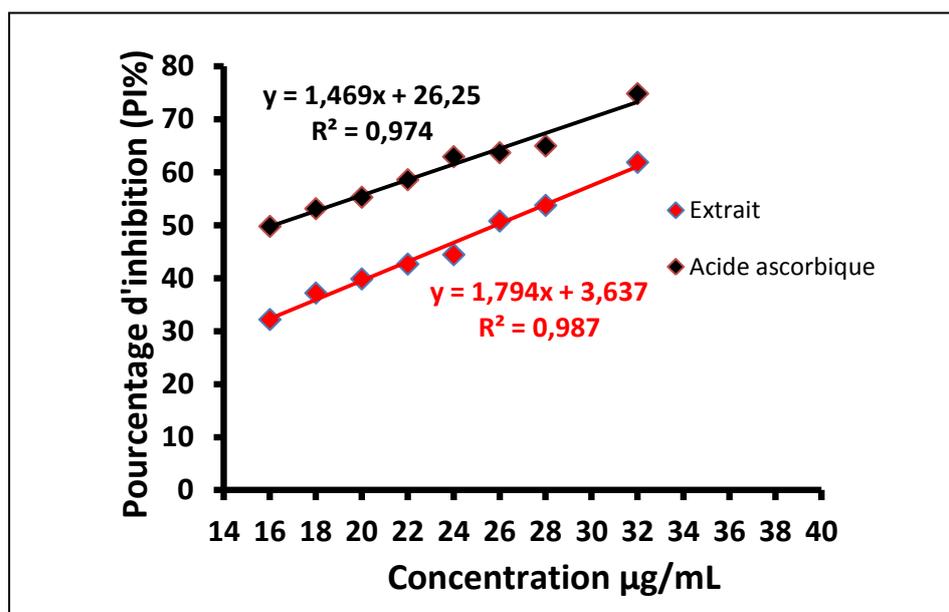


Figure 8: Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de notre extrait, comparés à ceux d'acide ascorbique pris comme référence.

La figure 8 montre les résultats de mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait. Ils montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait du romarin.

Détermination d'IC₅₀

L'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé parce qu'il exprime la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en solution dans l'éthanol, plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

-Graphiquement par la régression linéaire, on trouve que la concentration efficace 50 ou l'IC₅₀ est égale à 25,8 µg/mL.

-Les résultats montrent que l'IC₅₀ obtenu à partir de notre extrait 25,8 µg/mL est supérieur à celui de l'acide ascorbique 16,2 µg/mL pris comme antioxydant puissant de référence, sachant que la capacité antioxydante est inversement proportionnel à l'IC₅₀, on déduit que notre extrait a une forte activité antioxydante mais moins que celle de l'acide ascorbique. Ce qui prouve les résultats obtenu par le test électrochimique.

Comparant nos résultats à ceux de Fadili et al [12] qui ont traité 30 g de poudre végétale (feuilles et sommités fleuries) on a eu une activité antioxydante meilleur vu que la masse traité est de 150 g de poudre de feuilles qui a donné une quantité importante d'antioxydants et cette corrélation entre la concentration en polyphénols et l'activité antioxydante a été confirmé par plusieurs études Hua Li et al [14], Angelov et al [15], Makris et al [16] et Berrin Bozan et al [17], tenant en compte aussi d'autres facteurs influençant la teneur en polyphénols tels que, les conditions climatiques la période de la récolte, le solvant d'extraction, les conditions de stockage[18] ainsi que leurs distribution dans les différentes parties de la plantes tel que la température, l'exposition solaire, sécheresse, salinité [19, 20].

4 Conclusion

Le romarin est une plante aromatique cosmopolite riche en composés à divers vertus thérapeutiques. Dans ce travail on s'est basé sur l'étude du caractère antioxydant d'un flavonoïde contenu dans cette plante qui est la catéchine dont la structure chimique lui confère une grande capacité à piéger les radicaux libres, et par conséquent une réduction du stress oxydant impliqué dans de très nombreuses maladies comme un facteur déclenchant.

Ce travail nous a permis de maîtriser les plus simples techniques Analytiques. Commenant par l'extraction des huiles essentielles présentent dans les feuilles du romarin en utilisant deux méthodes l'hydrodistillation et l'extraction par un solvant organique apolaire, avec un rendement très important (1,62%) par rapport aux autre travaux réalisé sur la même espèce, passant à l'extraction des catéchines avec une étude quantitatif qui nous a permit de déduire la meilleure méthode d'extraction solide-liquide qui est l'extraction par le système soxhlet en la comparant à la macération, et en fin a partir des analyses qualitatifs réalisés par la CCM et les méthodes spectrales UV-Vis et IR, on a prouvé la présence de plusieurs formes de catéchines au niveau des feuilles du romarin.

L'évaluation de l'activité antioxydante des catéchines extraites selon la méthode électrochimique a montré que ces dernières possèdent une activité antioxydante importante, et ses résultats sont confirmés par un test de piégeage du radical libre DPPH avec une concentration efficace EC50 égale à 25,8 µg/mL, qui n'est pas loin de celle trouvée avec l'acide ascorbique 16,2µg/mL.

Le but de toutes ces recherches est d'inciter les chercheurs à utilisé ces plantes pour une meilleure prévention et médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt.

Références :

- [1] AD. Pilar, S. Camargo, M. Herrero, Rosemary. (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient, recent scientific evidence, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.12.003>.
- [2] C. Takayama, FM. Defaria, AC. Alves de almeida, RJ. Dunder, LP. Manzo, EA. RabeloSocca, LM. Batista, MJ. Salvador, AR. Monteiro Souzabrito, A. Luizferreira, Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat, Asian pacific journal of tropical biomedicine, 2016; 11-13.

- [3] S. Ayadi, C. Jerribi, M. Abderraba, Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* dans trois régions différentes de la Tunisie, J.soc.Alger.chim 2010; 21(1): 25-33.
- [4] H. Bendif, M. Boudjeniba, D. Miara, L. Biqiku, M. Bramucci, G. Caprioli, G. Lupidi, L. Quassinti, G. Sagratini, LA. Vitali, S. Vittori, F. Maggi, *Rosmarinus eriocalyx* alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds, Food chemistry, (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.063>.
- [5] A. Wollinger, E. Perrin, J. Chahboun, V. Jeannot, D. Touraud, k. Werner , Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays, Compte rendu chimie, (2016) 1-12.
- [6] J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème Éd) Editions médicales internationales 11, 20 1999; 310-353.
- [7] PV. Gadkari, M. Balaraman, Catechins: Sources, extraction and encapsulation, food and bioproducts processing, review 2014.
- [8] JB. Harborne, CA Williams, Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry 2000; 55 (6): 481-504.
- [9] K. Grosser, Cyclic voltammetry simulation and analysis of reactions mechanisms, VCH Publishers (1993) 20-48.
- [10] C. Boubekri, Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum longena* par des techniques électrochimiques, Université de Biskra 2014; 78.
- [11] B. Bayala, Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes, Thèse pour l'obtention de grade de docteur d'université en physiologie et génétique moléculaire, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014; 68.
- [12] K. Fadili, S. Amalich, SKN. Dedianhoua, M. Bouachrine, M. Mahjoubi, F. El hilali, T. Zair, Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*; International journal of innovation and scientific research 2015; 17: 24-33.
- [13] S. Weckesser, Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with, Dermatological relevance phyto medicine, (In press) 2007.
- [14] Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. Journal of Food and Drug Analysis 2008; 16(6): 67-73.
- [15] Angelov G., Boyadzhiev L., Georgieva S. Antioxidant properties of some Bulgarian wines. Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies, 2008; 3(1): 143-150..
- [16] Makris D. P., Boskou G., Andrikopoulos N. K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. Bioresource Technology 2007; 98: 2963-2967..
- [17] Berrin Bozan, Goksel Tosun, Derya Ozcan. Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxidant activity. Food chemistry 2008; 209: 426-430.
- [18] Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT 2007; 40: 1-11.
- [19] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 2008; 331: 372-379.
- [20] Yosr Zaouali ; Taroub Bouzaine ; Mohamed Boussaid; Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chem. Toxicol. 2010; 48: 3144–3152..