

## Evaluation of the protective power of cade and myrtle as natural preservatives of frying oil

## Évaluation du pouvoir protecteur du cade et du myrte en tant que conservateurs naturels de l'huile de friture

C. HAFSI<sup>1,2\*</sup>, D. KRICHENE<sup>3</sup>, H. FALLEH<sup>4</sup>, M. BEN JEMAA<sup>4</sup>, H. BEN FRAJ<sup>3</sup>, R. KSOURI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC), BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

<sup>2</sup> Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja, Université de Jendouba, Av Habib Bourguiba BP 382, 9000 Béja, Tunisie.

<sup>3</sup> Laboratoire de Biotechnologie de l'Olivier, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC), BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

<sup>4</sup> Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC), BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

\*Corresponding author: chokrihafsi@gmail.com

**Abstract** - Vegetable oils are known for their health benefits. However, during a heat treatment, such as frying, several degradations can occur, in particular lipid peroxidation. However, this lipid degradation can be avoided through the use of powerful natural antioxidants such as phenolic compounds and essential oils. Thus, the first part of this work was devoted to a phytochemical study of phenolic compounds (two extractions: soxhlet and maceration) and essential oils of two aromatic plants (*Myrtus communis* and *Juniperus oxycedrus*) especially for their antioxidant activities. The second part revealed that the phenolic compounds of myrtle and cade have the potential to be used as natural preservatives of heat-treated edible oils.

**Keywords:** vegetable oils, lipid peroxidation, natural antioxidants, phenolic compounds, essential oils, natural preservative.

**Résumé :** Les huiles végétales sont reconnues pour leurs bienfaits sur la santé. Cependant, lors d'un traitement thermique, telle que la friture, plusieurs dégradations peuvent se produire, notamment la peroxydation lipidique. Néanmoins, cette dégradation lipidique peut être évitée *via* l'utilisation de puissants antioxydants naturels tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles. Ainsi, la première partie de ce travail a été consacrée à une étude phytochimique des composés phénoliques (deux extractions : soxhlet et macération) et des huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Myrtus communis* et *Juniperus oxycedrus*) notamment pour leurs activités antioxydantes. La deuxième partie a révélé que les composés phénoliques du myrte et du cade ont la potentialité d'être utilisés en tant que conservateurs naturels des huiles alimentaires ayant subi un traitement thermique.

**Mots clés :** huiles végétales, peroxydation lipidique, antioxydants naturels, composés phénoliques, les huiles essentielles, conservateur naturel.

### 1- Introduction

Les huiles végétales jouent un rôle essentiel dans notre alimentation. Elles contribuent à l'apport d'énergie, forment une source fiable d'acides gras indispensables, en particulier les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique et d'autres constituants d'intérêt nutritionnel à l'instar des phytostérols ou des composés phénoliques comme est le cas particulier de l'huile d'olive (Cuvelier et Maillard, 2012). Néanmoins, le devenir de ces huiles au cours des opérations de friture dépend des conditions de mise en œuvre en particulier la température au bain de friture qui est en moyenne de 180°C, la durée de chauffage et le nombre de cycles. Malheureusement, la plupart des huiles végétales sont instables en raison de leur susceptibilité d'altérations lipidiques notamment la peroxydation lipidique qui peut se produire sur les

acides gras insaturés (Ferguene, 2015). Il est donc parfois nécessaire de leurs adjoindre certains composés à haut pouvoir antioxydant. En effet, les antioxydants sont largement utilisés comme additifs dans les matières grasses et les huiles de l'industrie alimentaire pour empêcher ou retarder l'altération des aliments. Par ailleurs, l'activité des antioxydants dépend des aliments dans lesquels ils sont ajoutés, de la concentration utilisée ainsi que du traitement subi (Ferguene, 2015). Les variations des teneurs en composés phénoliques et de la composition des huiles essentielles sont souvent considérables d'une espèce à une autre (Ksouri et al., 2009). Les principales sources de variation de ces composés secondaires sont d'ordre génétique (nature des espèces et des variétés existantes) et technologiques telles que les pratiques culturales et les méthodes d'extractions adoptées (Macheix et al., 2005; Ksouri et al., 2008). En effet, la variabilité des huiles essentielles et des teneurs en composés phénoliques et de l'efficacité de leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes entre les différentes espèces peut être très marquée (Falleh et al., 2009; Buer et al., 2010). En outre, la qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est profondément liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé (Falleh et al., 2009). Alors que pour les huiles essentielles, leurs extraction par entraînement par la vapeur d'eau est la méthode de choix. L'extraction par Soxhlet et la macération dans un alcool aqueux semblent faire partie des méthodes d'extraction les plus efficaces et des plus répandus (Niknam et Ebrahimpzadeh, 2002; Bruneton, 2006).

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, l'étude phytochimique du myrte et du cade pour leurs composés phénoliques (par différentes méthodes d'extraction). Ainsi, les extraits éthanoliques ont fait l'objet de dosages des composés phénoliques, d'une évaluation de leurs activités antioxydantes ainsi que d'une analyse individuelle de ces composés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Dans un deuxième temps, les extraits les plus performants ont été sélectionnés pour protéger une huile alimentaire contre la thermo-oxydation. Cette protection a été évaluée grâce à plusieurs paramètres notamment l'indice de peroxyde et l'acidité des échantillons.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Echantillonnage et extractions des échantillons

Les parties aériennes du myrte (*Myrtus communis*) et du cade (*Juniperus oxycedrus*) ont été collectées de la région de « Ouechteta » du Nord-Ouest de la Tunisie. Les échantillons ont été découpés en petits morceaux puis séchés à l'air libre pendant 20 jours puis ils ont été broyés en poudre fine.

**Extraction par macération.** Les extraits sont préparés en ajoutant 25 ml d'éthanol 50% à 3 g de poudre végétale. Après macération pendant 30 minutes et un repos de 24h à 4°C, les extraits sont filtrés à l'aide d'un papier filtre sans cendre. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière pour être utilisés dans les différentes analyses.

**Extraction par Soxhlet.** Un extracteur Soxhlet permet l'extraction à chaud par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Dans ce travail, à 30 g de poudre de myrte ou de cade on ajoute 90 ml d'éthanol 50%. L'ensemble est chauffé et l'extraction dure entre 3 et 4h.

### 2.2. Dosage des composés phénoliques

**Dosage des polyphénols totaux.** Une prise de 125 µl d'extrait convenablement dilué est mélangée avec 500 µl d'eau distillée et 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation vigoureuse et un repos de 3 minutes, 1250 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) sont ajoutés. Enfin, le volume est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée (Dewanto et al., 2002). Après incubation du mélange à température ambiante pendant 90 minutes et à l'obscurité, l'absorbance de l'extrait est mesurée à 760 nm. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG g<sup>-1</sup> MS).

**Dosage des flavonoïdes.** Une prise de 250 µl d'extrait est additionnée à 75 µl de NaNO<sub>2</sub> (5%). Après un repos de 6 minutes, 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10%) fraîchement préparé sont ajoutés au mélange (Dewanto et al., 2002). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 500 µl de NaOH (1 M) sont ajoutés. Le volume final est ramené à 2,5 ml avec de l'eau distillée et la densité optique de l'échantillon est mesurée à 510 nm. Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont alors exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC g<sup>-1</sup> MS).

**Dosage des tanins condensés.** Pour déterminer la concentration des tanins dans les différents échantillons, une aliquote de 25 µl d'extrait est mélangée avec 1500 µl de vanilline (4%). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 500 nm (Dewanto et al., 2002). Comme pour les flavonoïdes, les teneurs en tanins condensés des extraits sont alors exprimées en mg d'équivalents catéchine par gramme de matière sèche (mg EC g<sup>-1</sup> MS).

### 2.3 Mesure des activités antioxydantes

**Activité antioxydante totale.** Cette méthode consiste à ajouter 100 µl d'extrait de plante à 1 ml de la solution contenant de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ; 0,6 M), le phosphate de sodium ( $NaH_2PO_4$ ,  $H_2O$ , 28 mM) et l'heptamolybdate d'ammonium ( $(NH_4)_6MO_7O_{24}$ ,  $4H_2O$ ); 4 mM). Le mélange est ensuite incubé à 95°C pendant 90 minutes (Prieto et al., 1999). Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG  $g^{-1}$  MS).

**Piégeage du radical libre DPPH•.** Le test est réalisé en ajoutant 250 µl de la solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) à 1 ml des extraits à différentes concentrations. Après une agitation vigoureuse, le mélange reste au repos pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité (Hatano, 1988). L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé par la formule suivante:

$$PI (\%) = ((AT-Ag)/AT)*100$$

**Avec :**  
**PI:** Pourcentage d'inhibition  
**AT:** Absorbance du témoin  
**Ag:** Absorbance de l'échantillon

Cette cinétique permet de déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits en termes de  $CI_{50}$  ( $\mu g\ ml^{-1}$ ) qui représente la concentration d'inhibition de 50% des radicaux DPPH.

**Test de réduction du fer.** Pour cet essai, 40 µl d'extrait est mélangé avec 100 µl du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 100 µl de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. Le mélange est incubé dans un bain marie pendant 20 min à 50°C. Puis, il est mélangé avec 100 µl d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. Ensuite, l'ensemble est centrifugé pendant 10 min (Huang et al., 2005). Dans un tube à essais, une fraction de 300 µl du surnageant est mélangée avec 300 µl d'eau distillée et 60 µl de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ,  $6H_2O$ ) à 0,1%. L'absorbance du mélange ainsi obtenu est mesurée à 700 nm. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ( $CE_{50}$ ,  $\mu g\ ml^{-1}$ ), concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0,5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire.

### 2.4. Identification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

**Appareillage.** La chaîne CLHP est constituée des éléments suivants : une pompe à débit constant modèle 600E (Agilent Technologies 1260 (Germany)), une colonne Lichrocart Purospher RP18 (5 µm, 80 Å, 4x250 mm) équipée d'une pré-colonne (4x4 mm) renfermant la même phase, un détecteur à barrettes de diodes modèle 996 (Agilent Technologies 1260 (Germany)), un système d'injection automatique modèle 717 (Agilent Technologies 1260 (Germany)) et une station d'acquisition et de traitement des chromatogrammes avec le logiciel Empower Pro 2010 TM.

**Conditions d'analyses.** Les extraits sont analysés grâce à une élution en gradient à l'aide d'un mélange de solvants A (acétonitrile) et B (acide acétique à 2,5% v/v). Le gradient du programme d'élution est le suivant : 0-5 mn, 3% A; 5-15 mn, 9% A; 15-45 mn, 16% A; 45-48 mn, 50% A; 48-51 mn, 90% A; 51-55 mn, 90% A. Le volume d'injection est de 10 µl, le débit est fixé à 1 ml  $mn^{-1}$  et la température de la colonne est fixée à 30°C. Les composés séparés sur la colonne sont analysés par leur spectre UV-visible entre 240 et 600 nm.

**Identification des composés phénoliques.** Sur les chromatogrammes, les principaux pics enregistrés à 280 nm sont caractérisés par leurs temps de rétention comparés à ceux de composés standards et leurs spectres UV spécifiques. L'observation des spectres UV permet de différencier les différentes classes de composés phénoliques présents dans les extraits.

### 2.5. Étude de l'effet protecteur des extraits des plantes contre l'oxydation lipidique

#### 2.5.1. Incorporation et traitement de la matrice alimentaire

La matrice alimentaire étudiée est l'huile de maïs (l'une des huiles alimentaire les plus fréquemment consommé en Tunisie) achetée à partir d'un supermarché local. Un volume bien déterminé de cette huile a été additionné de résidu sec de myrte ou de cade de façon à avoir une concentration finale égale à 100 mg RS/L Huile. L'ensemble est agité continuellement pendant 48h. Par la suite, ces huiles (en plus d'un

témoin négatif constitué d'huile pure) ont fait l'objet d'un traitement thermique de 180°C pendant 6 heures afin d'étudier l'effet des résidus secs sur leurs thermo-oxydation.

### 2.5.2. Étude des paramètres d'oxydation de l'huile

**Acidité.** Pour 5 g d'huile, un volume de 30 ml d'alcool neutralisé est additionné. Après agitation pour dissoudre les acides gras dans l'alcool, la solution obtenue est titrée par la soude de normalité 0,177 N en présence d'un indicateur coloré : la phénolphthaléine (à 1% d'alcool absolu). Les acides gras libres sont totalement neutralisés lorsque la phénolphthaléine vire au rose persistant durant au moins 10 secondes. L'acidité exprimée en pourcentage est calculée selon la relation suivante:

$$\text{Acidité} = V \times C \times M / 10 \times m$$

Avec :

**M** : Masse molaire de l'acide oléique exprimée en grammes/mole.

**V** : Volume en millilitres de la solution de soude utilisée pour la titration.

**C** : Concentration exprimée en mol/l de la solution de NaOH utilisée.

**m**: Masse de l'échantillon d'huile (g).

**Indice de peroxyde.** L'indice de peroxyde est la méthode chimique la plus commune pour estimer le degré de détérioration oxydatif des huiles. Le protocole consiste à dissoudre 1 g d'huile avec 10 ml de chloroforme, puis cette solution est additionnée de 15 ml d'acide acétique et de 1 ml de la solution saturée d'iodure de potassium, fraîchement préparée. Après agitation et un repos pendant 5 minutes à l'abri de la lumière, 50 ml d'eau distillée est ajoutée à cette solution puis l'iode libéré est titré par une solution aqueuse de thiosulfate de sodium (N/100) en présence d'empois d'amidon (2%) comme indicateur. L'indice de peroxyde est calculé selon la formule suivante :

$$\text{IP (MEQ O}_2\text{/KG CORPS GRAS)} = 10 (V - V_0) / P$$

Avec :

**V** : Volume de la solution de thiosulfate de sodium (ml)

**V<sub>0</sub>**: Volume de la solution de thiosulfate de sodium pour l'essai à blanc (ml)

**P** : Masse de l'échantillon d'huile (g)

**Teneurs en pigments.** Les chlorophylles et les caroténoïdes ont été déterminés par colorimétrie selon la méthode de Minguez-Mosquera et al. (1991). L'absorption maximale à 670 nm est due à la fraction des chlorophylles et celle à 470 nm est due à la fraction des caroténoïdes. Les valeurs des coefficients d'extinction spécifique appliquées étaient  $E_0 = 613$  pour la phéophytine en tant que composant principal dans la fraction des chlorophylles et  $E_0 = 2000$  pour la lutéine en tant que composant principal dans la fraction des caroténoïdes. Ainsi, les pigments sont évalués sur des échantillons d'huiles (1,5 g) dilués dans 5 ml de cyclohexane. Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes, exprimées respectivement en mg de phéophytine/Kg d'huile et en mg de lutéine/Kg, sont calculées comme suit :

$$\text{Chlorophylles (mg/kg)} = A_{670} \times 10^6 / E_0 \times 100 \times d$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/kg)} = A_{470} \times 10^6 / E_0 \times 100 \times d$$

Avec :

**A** : Absorbance

**d** : Epaisseur de la cuve (1 cm).

**Les diènes et les triènes conjugués.** Dans ce travail, l'extinction spécifique des échantillons dissous dans le cyclohexane a été déterminée selon la Réglementation de l'Union Européenne (CEE n°. 2568/91). Ainsi, 0,1 g d'huile est dissout dans 10 ml du cyclohexane. Après homogénéisation et en utilisant comme référence le solvant employé, on mesure les extinctions aux longueurs d'onde 232 nm et 270 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Perkin-Elmer Lambda-Bio, Beacosfield, UK). L'extinction spécifique d'une solution à la concentration de 1% mesurée pour un trajet optique de 1 cm à une longueur d'onde  $\lambda$ , est donnée par les formules suivantes :

$$K_{232} = [Abs1 + Abs2 / 2] / P * 10$$

$$K_{270} = [Abs1 + Abs2 / 2] / P * 10$$

**K<sub>232</sub>** : extinction spécifique à  $\lambda$ : 232 nm

**K<sub>270</sub>** : extinction spécifique à  $\lambda$ : 270 nm

**P** : Poids de l'échantillon d'huile (g)

## 2.6. Analyse statistique

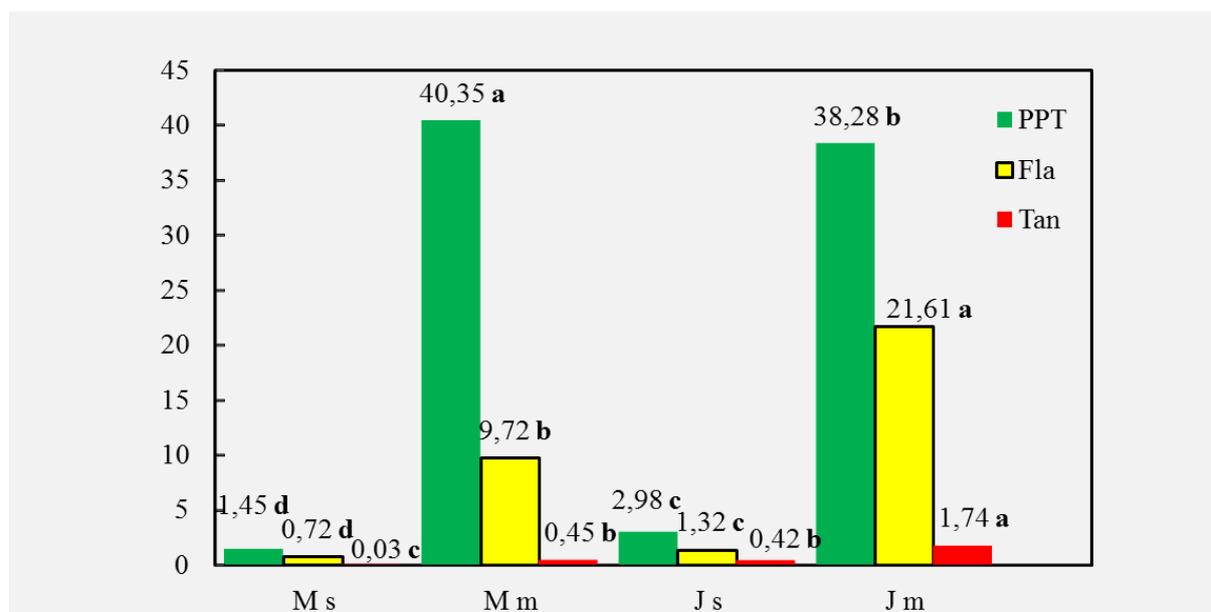
Pour chaque extrait, nous avons utilisé trois répétitions dans les différentes déterminations analytiques décrites ci-dessus. Des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les traitements ont été calculées en utilisant une analyse de variance (ANOVA à un facteur) et le test de comparaison multiple de Duncan.

## 3. Résultats

### 3.1. Quantification et identification des composés phénoliques

**Teneurs en polyphénols.** Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a permis de comparer l'efficacité des méthodes d'extractions testées à solubiliser et à extraire ces composés et de déterminer les teneurs dans les deux plantes. Indépendamment de la plante étudiée, les résultats montrent que les macérât montrent les teneurs les plus importantes en composés phénoliques (figure 1). Ces teneurs varient de 38,3 à 40,3 mg EAG  $g^{-1}$  MS alors qu'elles sont inférieures à 5 mg EAG  $g^{-1}$  MS pour les extractions par soxhlet. Par ailleurs, la comparaison des deux plantes montre que le myrte est statistiquement plus riche en polyphénols que le cade, avec des teneurs atteignant les 40 mg EAG  $g^{-1}$  MS.

**Teneurs en flavonoïdes.** Les résultats présentés sur la figure 1 montrent des teneurs statistiquement supérieures en flavonoïdes pour les macérât (entre 9 et 22 mg EC  $g^{-1}$  MS) que par soxhlet ( $< 1,3$  mg EC  $g^{-1}$  MS). La concentration maximale en ces composés se trouve dans le macérât du cade (21,6 mg EC  $g^{-1}$  MS) suivie par le macérât du myrte (9,7 mg EC  $g^{-1}$  MS) et finalement les extraits par soxhlet dont les teneurs en ces composés ne dépassent pas 1,3 mg EC  $g^{-1}$  MS. Aussi, *J. oxycedrus* présente des teneurs en flavonoïdes statistiquement supérieures à celle du myrte.



**Figure 1.** Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG  $g^{-1}$  MS), flavonoïdes (mg EC  $g^{-1}$  MS) et tanins condensés (mg EC  $g^{-1}$  MS) des parties aériennes du Myrte et du cade. Ms : Extrait du myrte par soxhlet ; Mm : Extrait du myrte par macération ; Js : Extrait du cade par soxhlet ; Jm : Extrait du cade par macération. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

**Teneurs en tanins condensés.** Les tanins condensés ou les proanthocyanidines sont présents dans tous les extraits étudiés mais en faibles teneurs par rapport aux flavonoïdes et aux polyphénols totaux. D'après la figure 1, la même tendance que pour les polyphénols totaux et les flavonoïdes se retrouve pour les tanins condensés. En effet, la teneur la plus importante en tanins condensés est enregistrée dans les extraits par macération par rapport à ceux provenant par soxhlet (1,7, 0,4 et 0,03 mg EC  $g^{-1}$  MS, respectivement). Concernant les plantes, *J. oxycedrus* semble être plus riche en ces composés (1,74 et 0,4 mg EC  $g^{-1}$  MS) que le myrte (0,4 et 0,03 mg EC  $g^{-1}$  MS).

**Identification par CLHP en phase inverse.** Les résultats présentés dans les tableaux 1 et 2 montrent une grande variabilité de la composition quantitative et qualitative des composés phénoliques du myrte et du cade en fonction de la méthode d'extraction. Quantitativement, et conformément au résultat obtenu par le dosage colorimétrique, le myrte présente des teneurs globales plus élevées que celles du cade,

respectivement de 54 et 44 mg g<sup>-1</sup> MS. Aussi les teneurs les plus élevées ont été enregistrées pour les extraits par macération pour les deux plantes.

**Tableau 1.** Identification et quantification (exprimée en mg g<sup>-1</sup> MS) des composés phénoliques dans les parties aériennes de *M. communis* extraits macération et par soxhlet. TR : Temps de rétention ; NI : composé non identifié. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à P < 0,05.

HPLC	TR	soxhlet	macération
NI	6,420	0,147	0
NI	7,505	0,344	0
NI	7,793	0,694	7,824
Acide gallique	8,423	0,210	4,006
NI	8,804	0,161	3,924
NI	9,212	0,653	8,620
Résorcinol	10,336	0,230	1,910
NI	11,744	0	0,800
Catéchol	12,143	1,007	9,540
NI	13,158	0,357	2,931
NI	13,283	0	1,389
NI	13,334	0,300	1,506
NI	18,704	0,308	1,991
NI	19,530	0,210	2,463
Acide p-coumarique	19,750	0	0,640
Acide férulique	20,243	0,730	0,590
Myricitrine	20,715	0,110	0,140
Acide ellagique	22,101	0,950	0
Myricetine	22,507	0,020	0,099
Isorhamnetin 3 O rutinoside	22,837	0,100	0
NI	23,339	0,173	0
Lutéoline	24,848	0,010	0
Kaempférol	25,222	0,280	1,820
NI	26,475	0,371	0
NI	29,485	0,190	2,554
NI	30,417	0,377	1,698
<b>Total</b>		<b>7,931 b</b>	<b>54,446 a</b>

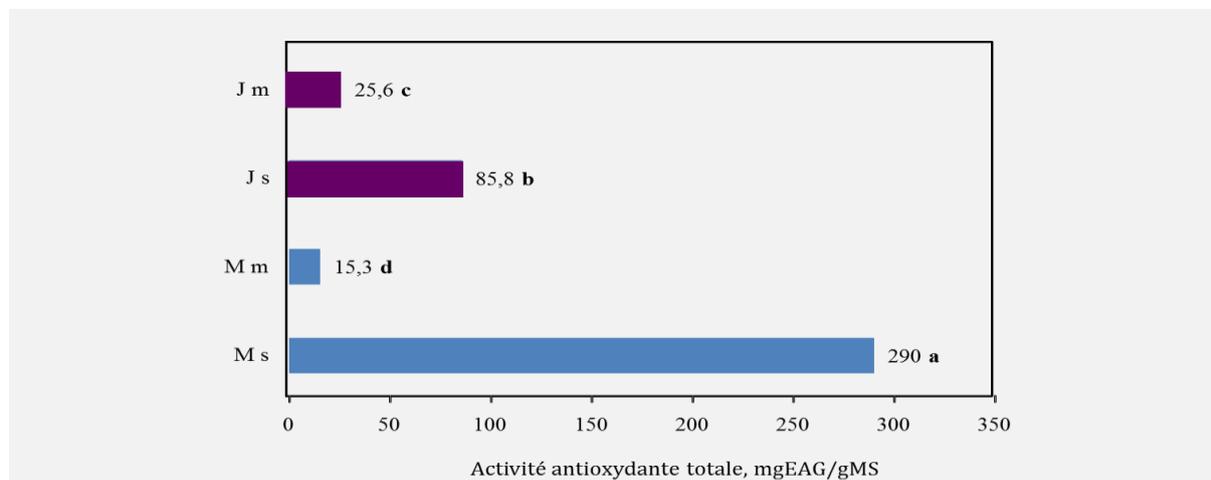
Aussi, le tableau 2 montre que le composé majoritaire du cade est le catéchol (9,5 et 1 mg g<sup>-1</sup> MS, respectivement pour le macérât et le soxhlet), alors que, d'après le tableau 1, c'est l'acide chlorogénique ou un composé non identifié pour le myrte selon que l'extraction soit faite par soxhlet ou macération (13,2 et 2,25 mg g<sup>-1</sup> MS, respectivement). En outre, les teneurs en certains composés phénoliques présentent des différences significatives entre les deux extractions. Par exemple, l'extrait par macération est plus riche en acide gallique (4 mg g<sup>-1</sup> MS) par comparaison à celui par soxhlet (0,2 mg g<sup>-1</sup> MS).

**Tableau 2.** Identification et quantification (exprimée en mg g<sup>-1</sup> MS) des composés phénoliques dans les parties aériennes de *J. oxycedrus* extraits macération et par soxhlet. TR : Temps de rétention ; NI : composé non identifié. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à P < 0,05.

HPLC	TR	Soxhet	Macération
NI	6,892	1,574	10,95
NI	7,773	0,099	0
NI	9,192	0,124	0
NI	11,21	0	0,65
NI	11,91	0	0,40
NI	12,73	0	0,42
NI	12,952	0,144	2,89
NI	13,108	0,186	0
Epigallocatechine	14,85	0	4,40
Acide chlorogénique	15,801	0,280	13,25
NI	19,107	0,234	2,06
Acide férulique	20,224	0,140	0
Myricitrine	20,689	0,070	0,15
Acide rosmarinique	21,63	0	2,30
NI	22,079	0,259	0
ND	23,78	0	0,42
Kaempférol	25,395	1,110	6,32
NI	26,449	0,249	0
NI	29,468	2,530	0
NI	30,156	0,495	0
NI	30,371	0,894	0
<b>Total</b>		<b>8,388 b</b>	<b>44,200 a</b>

### 3.2. Activité antioxydante et antiradicalaire des composés phénoliques

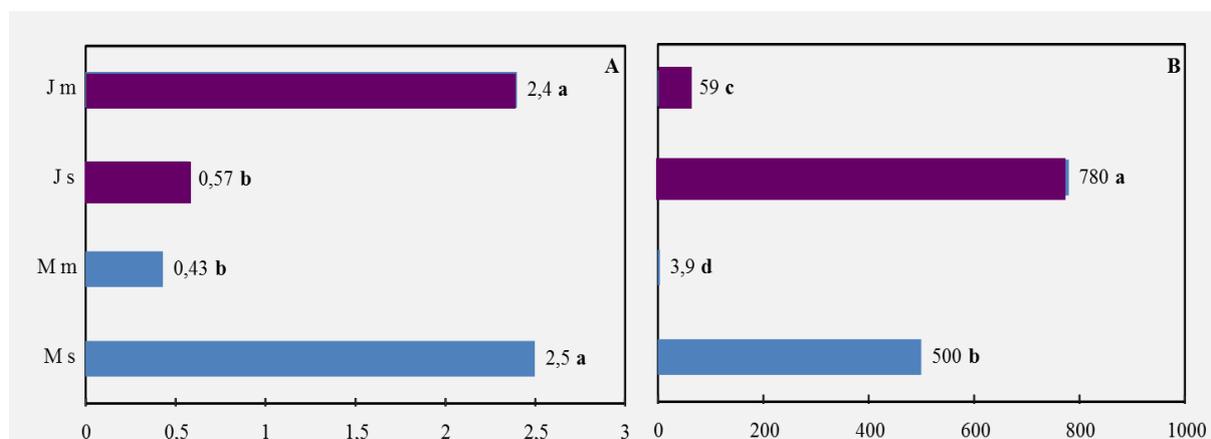
**Activité antioxydante totale.** Les résultats représentés dans la figure 2 montrent des différences significatives selon la plante et la méthode d'extraction utilisée avec des valeurs variant de 15,3 à 290 mg EAG g<sup>-1</sup> MS. Les extraits par soxhlet se distinguent par les meilleures capacités, en particulier très élevée pour l'extrait de myrte (290 mg EAG g<sup>-1</sup> MS). Tandis que les extraits par macération montrent, pour les deux plantes, des activités antioxydantes moins importantes avec des valeurs ne dépassant pas les 25,6 mg EAG g<sup>-1</sup> MS.



**Figure 2.** Activité antioxydante totale, exprimée en mg EAG g<sup>-1</sup> MS des parties aériennes du myrte et du cade. Ms : Extrait du myrte par soxhlet ; Mm : Extrait du myrte par macération ; Js : Extrait du cade par soxhlet ; Jm : Extrait du cade par macération. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à P < 0,05.

**Capacité d'éliminer le radical DPPH.** L'analyse de la figure 3 A montre que l'extrait du myrte macération présente la meilleure capacité à neutraliser le radical libre DPPH puisqu'il exhibe la plus faible valeur de CI<sub>50</sub> (0,43 µg/ml) suivie de près par l'extrait de J. soxhlet (CI<sub>50</sub> = 0,57 µg/ml). Alors que les extraits du cade macération et myrte soxhlet possèdent les CI<sub>50</sub> significativement plus élevées, de l'ordre de 2,5 µg/ml.

**Le pouvoir réducteur.** L'analyse des résultats de la figure 3 B montre que les extraits des deux plantes ont des activités réductrices qui diffèrent significativement selon la méthode d'extraction utilisée et corroborent partiellement avec les précédentes activités antioxydantes. En effet, les deux extraits par macération possèdent les meilleures capacités de réduction des ions ferriques avec des valeurs de la CE<sub>50</sub> allant de 3,9 à 59 µg/ml et dépassent d'une manière significative les extraits par soxhlet dont les CE<sub>50</sub> atteignent 780 µg/ml. Par ailleurs, les extraits du myrte présentent une activité réductrice du fer significativement meilleure que celles du cade.



**Figure 3.** Activité antiradicalaire, exprimée en CI<sub>50</sub> (A) et pouvoir réducteur de fer, exprimé en CE<sub>50</sub> (B) des parties aériennes du myrte et du cade. Ms : Extrait du myrte par soxhlet ; Mm : Extrait du myrte par macération ; Js : Extrait du cade par soxhlet ; Jm : Extrait du cade par macération. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à P < 0,05.

### 3.3. Évaluation des paramètres d'oxydation de l'huile

**Indice de peroxyde.** L'examen du tableau 3 montre que les valeurs de l'indice de peroxyde des différentes huiles sont hautement variables en fonction du traitement appliqué. En effet, les valeurs de cet indice varient de 0 MEQ O<sub>2</sub>/Kg corps gras (huile témoin non oxydée) jusqu'à 6 MEQ O<sub>2</sub>/Kg corps gras pour l'huile oxydée. Concernant le traitement par les plantes, il est à noter que les extraits du myrte sont significativement plus protecteurs que ceux du cade avec des valeurs de l'indice de peroxyde de 0,5 et de 1 MEQ O<sub>2</sub>/Kg corps gras, respectivement. Notant que ces deux valeurs sont nettement plus proches de l'huile témoin que de l'huile oxydée.

**Acidité.** L'acidité de l'huile alimentaire est un paramètre très important dans la détermination de sa stabilité oxydative. Selon les résultats illustrés dans le tableau 3, l'acidité de l'huile témoin est de 0,5% d'acide oléique et elle augmente en fonction de l'oxydation thermique jusqu'à 1,5% d'acide oléique (huile oxydée). Pour les huiles traitées, les effets de l'oxydation sur l'acidité semblent être bien bridés étant donné que l'acidité de l'huile/cade et celle de l'huile/myrte sont égales à 0,5 et 0,7% d'acide oléique, respectivement.

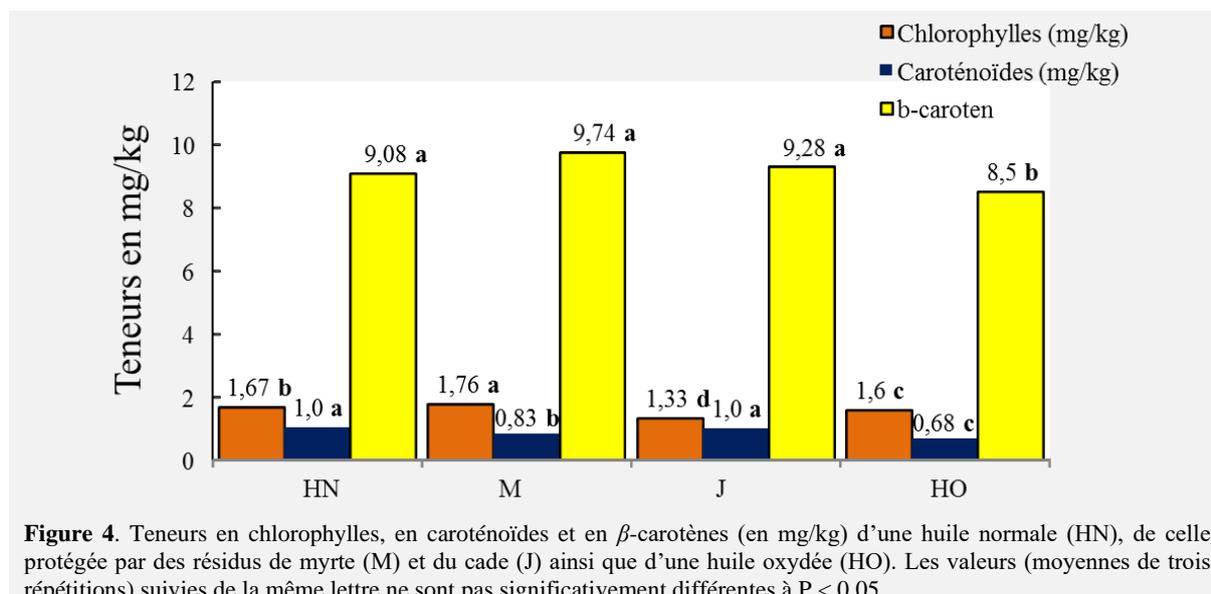
**Indice de blancheur.** L'analyse du tableau 3 montre que les valeurs de l'indice de blancheur sont significativement différentes entre les quatre huiles étudiées. En effet, les valeurs de cet indice varient de 69 jusqu'à 70,4, pour l'huile témoin et celle oxydée respectivement. Concernant les huiles additionnées de plantes, les huiles traitées par le myrte ou le cade (67,8 et 68,8) sont bien plus proches de celui de l'huile témoin que celui de l'huile oxydée.

**Tableau 3.** Coefficients d'extinction, indice de blancheur, indice de peroxyde et acidité d'une huile normale, de celle protégée par des résidus de myrte et du cade ainsi que d'une huile oxydée. Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

	<b>K<sub>232</sub></b>	<b>K<sub>270</sub></b>	<b>Indice de blancheur</b>	<b>Indice de peroxyde</b>	<b>Acidité</b>
<b>Huile normale</b>	5,820 a	5,820 b	68,991 b	0 d	0,549 c
<b>Huile + myrte</b>	5,482 b	5,682 c	67,785 c	0,50 c	0,748 b
<b>Huile + cade</b>	6,174 a	6,251 a	68,876 b	1,00 b	0,449 d
<b>Huile oxydée</b>	5,670 b	5,994 b	70,443 a	5,96 a	1,547 a

**Évaluation des coefficients d'extinction K<sub>232</sub> et K<sub>270</sub>.** La détermination des coefficients K<sub>232</sub> et K<sub>270</sub> renseigne sur la présence ou l'absence de produits d'oxydation dans l'huile. Les hydro-péroxydes des premiers stades d'oxydation absorbent à 232 nm, alors que les produits d'oxydation secondaires tels que les cétones insaturées-dicétones absorbent au voisinage de 270 nm. L'analyse des résultats de l'extinction spécifique illustrés dans le tableau 3 a montré qu'il y a une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre l'huile oxydée et l'huile enrichie avec l'extrait du cade. En effet, les extinctions spécifiques de l'huile traitée par le cade est statistiquement la même que celle de l'huile témoin (6,2 et 5,8, respectivement) et celle de l'huile traitée par le myrte est pratiquement la même que celle de l'huile oxydée (5,8 et 5,7, respectivement). Avec une moindre amplitude, cette même tendance se retrouve quant à l'absorption spécifique à 270 nm, avec les résidus secs du cade qui semblent conserver un bon statu oxydatif de l'huile traitée thermiquement.

**Teneurs en pigments.** L'analyse de la figure 4 montre que la teneur en chlorophylle de l'huile additionnée de résidu sec de myrte est supérieure à celle de l'huile seule (1,8 et 1,7 mg/kg, respectivement). Toutefois, la teneur en chlorophylle de l'huile additionnée de cade est inférieure à celles des huiles témoin et oxydée. Une tendance différente est retrouvée en ce qui concerne la  $\beta$ -carotène dont les teneurs des huiles traitées est statistiquement la même que celle de l'huile normale, et est supérieure à celle de l'huile oxydée (8,5 mg/kg). Pour les caroténoïdes, des différences statistiquement significatives peuvent être remarquées. En effet, les teneurs en caroténoïdes des huiles additionnées par le myrte ou le cade sont nettement plus proches de l'huile normale que celle de l'huile oxydée (1,0 et 0,7, respectivement).



**Figure 4.** Teneurs en chlorophylles, en caroténoïdes et en  $\beta$ -carotènes (en mg/kg) d'une huile normale (HN), de celle protégée par des résidus de myrte (M) et du cade (J) ainsi que d'une huile oxydée (HO). Les valeurs (moyennes de trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

#### 4. Discussion

La quantification des polyphénols totaux des parties aériennes du myrte et du cade a révélé une multitude de teneurs significativement différentes variant de 1,45 jusqu'à 40,35 mg EAG  $g^{-1}$  MS. D'autre part, les extraits obtenus par macération sont significativement plus riches en ces composés que les extraits de l'appareil de Soxhlet et ce pour les deux plantes étudiées. En plus, l'examen de la variabilité de la composition des polyphénols contenus dans les parties aériennes des deux plantes a révélé des fluctuations de la quantité de leurs différentes classes étudiées (flavonoïdes et tannins condensés). En effet, les flavonoïdes totaux expriment la même allure que l'ensemble des composés phénoliques. Leurs teneurs sont significativement plus importantes dans les extraits par macération par rapport à ceux par Soxhlet tandis que les tanins condensés dévoilent une dépendance moins prononcée vis-à-vis de la méthode d'extraction. Ces résultats sont bien en accord avec les travaux de Hayouni et al. (2007) qui ont étudié l'effet de la méthode et du solvant d'extraction sur les potentialités antioxydantes de *Quercus coccifera* et *Juniperus phoenicea*. Les résultats de quantification des polyphénols totaux plaident en faveur de la primauté de la macération (139 et 202 mg EAG  $g^{-1}$  MS pour les deux espèces, respectivement) par rapport à l'appareil de soxhlet (123 et 188 mg EAG  $g^{-1}$  MS). Cependant, cette différence est moins nette quant à l'estimation de la capacité antioxydante. En effet, la comparaison des  $CI_{50}$  et  $CE_{50}$  des extraits obtenus par ces deux procédés sont non concluantes et montre des résultats assez comparables.

D'après les résultats obtenus, les caractéristiques physico-chimiques des huiles utilisées dans notre étude avant et après le traitement thermo-oxydatif sont significativement variables. D'une manière globale, il est possible de stipuler que les données trouvées dans cette étude ont montré une protection significative de l'huile de maïs par le myrte et le cade après avoir subi le traitement thermo-oxydatif. Par ailleurs, de nombreux travaux sur l'évolution de l'oxydation thermique des huiles ont été entrepris. Différentes méthodes analytiques ont été appliquées à cet effet, d'où la difficulté de l'interprétation et de la signification des résultats obtenus. Cette difficulté est également liée aux conditions non spécifiques du traitement, en particulier la variabilité de la durée et de l'amplitude du traitement appliqué (Marmesat et al., 2009). Concernant l'acidité, il est impératif de souligner le fait que l'acidité des échantillons est correcte étant donné qu'elle est conforme aux normes commerciales du Conseil Oléicole International, qui limite l'acidité de l'huile en-dessous de 3,3%. Il est aussi important de spécifier que l'acidité de l'huile témoin est restée proche de celles des huiles protégées par le myrte et le cade (inférieure à 0,8% d'acide oléique). Sur un autre plan, l'indice de peroxyde est l'un des paramètres de qualité souvent déterminé au cours de l'élaboration, le stockage et la commercialisation des huiles végétales. Cet indice chimique indique le degré d'oxydation et mesure la quantité de peroxydes, produits primaires d'oxydation d'une huile (Saad et al., 2006). Cet indice révèle la présence d'hydroperoxydes et d'hypoxyperoxydes, appelés produits primaires de la dégradation dans l'huile. En effet, il est correct de dire que l'indice de peroxyde indique la fraîcheur d'une huile et plus l'indice est bas, plus l'huile est fraîche. L'indice de peroxyde varie entre 5 et 20 pour les huiles brutes pressées et entre 0 et 1 pour les huiles raffinées. La formation et l'accumulation des produits primaires d'oxydation augmentent avec l'augmentation du degré d'insaturation des huiles (Saad et al., 2006). Les résultats de notre étude ont

montré que l'indice de peroxyde est élevé dans l'huile de maïs thermo-oxydée par comparaison aux huiles traitées. Il importe de souligner qu'une huile fraîchement raffinée a un indice de peroxyde inférieur à 1 mq O<sub>2</sub> par Kg. A cette dose, l'huile ne présente pas de défaut inacceptable sur le plan sensoriel. Par ailleurs, les hydroperoxydes sont présents à des teneurs de l'ordre de ppm et qu'ils ne présentent aucun caractère toxique à ce niveau. Saad et al. (2006) attribue cette augmentation de l'indice de peroxyde aux effets combinés de la température élevée et de l'entrée d'air lors du chauffage induisant la formation de peroxydes.

Dans un autre contexte, la couleur de l'huile végétale change en général au cours du temps et est très influencée par la nature du traitement de cette huile. L'augmentation observée de l'indice de peroxyde, notamment pour l'huile oxydée, pourrait s'expliquer par la présence de polymères thermo-oxydés qui résultent du brunissement de l'huile de friture et aussi de la dégradation des substances colorantes naturelles dans l'huile d'origine (Saad et al., 2006).

Les absorbances spécifiques à l'UV déterminent les niveaux d'oxydation des huiles de friture. Les principaux produits de l'oxydation des lipides sont les hydroperoxydes, par conséquent, les quantités d'hydroperoxydes sont directement corrélées avec l'extinction spécifique à 232 nm (Saad et al., 2006). La détermination des absorbances au voisinage de 232 nm et au voisinage de 270 nm permet de détecter et d'évaluer les quantités des produits d'oxydation: plus l'extinction à  $\lambda=232$  nm est forte, plus l'huile est peroxydée. De même plus l'extinction à  $\lambda=270$  nm est forte, plus elle est riche en produits d'oxydation secondaires et traduit une faible aptitude à la conservation (Saad et al., 2006).

## 5. Conclusion

Les résultats présentés dans ce travail indiquent que *M. communis* et *J. oxycedrus* possèdent de bonnes activités biologiques représentées par d'importantes activités antioxydantes. Ceci peut donc justifier la possibilité d'utiliser l'un ou l'autre dans la conservation des huiles de friture. Dans ce contexte, ce travail a significativement contribué à l'évaluation du pouvoir protecteur de ces deux plantes tunisiennes contre la thermo-dégradation des huiles de friture.

## Références

- Bruneton J (2006)** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, third ed., Tec and Doc, Lavoisier, Paris.
- Buer CS, Imin N, Djordjevic MA (2010)** Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol* 52:98-111.
- Cuvelier ME, Maillard MN (2012)** Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. Stability of edible oils during storage. AgroParisTech, Inra UMR1145 Ingénierie Produits Aliments, 91300 Massy, France.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002)** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010-3014.
- Falleh H, Ksouri R, Oueslati S, Guyot S, Magné C and Abdelly C (2009)** Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food Chem Toxicol* 47:2308-2313.
- Ferguene L (2015)** Étude de l'évolution des indices de qualité d'une huile raffinée « Elio » CEVITAL au cours du stockage. Diplôme de Master, Université de Bejaïa Algérie pp 45-48.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988)** Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharmaceut Bull* 36:2090-2097.
- Hayouni EK, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M (2007)** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 105:1126-1134.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005)** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, Bakhrouf A, Magné C, Abdelly C (2009)** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* 47:2083-2091.

- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C (2008)** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Compt Rend Biol* 331:865-873.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C (2005)** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (Eds), Lausanne.
- Marmesat S, Morales A, Velasco J, Ruiz-Méndez MV, Dobarganes MC (2009)** Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas Y Aceites* 60:155-160.
- Minguez-Mosquera MIL, Rejano-Navarro B, Gandul-Rojas AH, Sanchez-gomez, Garrido-Fernandez J (1991)** Color-pigment correlation in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 39:332-336.
- Niknam V, Ebrahimzadeh H (2002)** Phenolics content in astragalus species. *Pak J Bot* 34:283-289.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999)** Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269:337-41.
- Saad B, Wai WT, Lim BP, Saleh MI (2006)** Flow Injection Determination of Peroxide Value in Edible Oils Using Triiodide Detector. *Anal Chim Act* 565:261-270.