



HAL
open science

aaaaaaa

Mohamed Amine Didi

► **To cite this version:**

| Mohamed Amine Didi. aaaaaaa. Scientific Study and Research, In press. <hal-02513965>

HAL Id: hal-02513965

<https://hal.science/hal-02513965v1>

Submitted on 21 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE COFFEE PARCHMENT

Amel Didi

*Tlemcen University, Faculty of SNV, Department of Biology, Laboratory of
Separation and Purification Technologies, 13000 Tlemcen, Algeria.*

*Corresponding author: didiamel13@gmail.com

Received: Month, dd, yyyy

Accepted: Month, dd, yyyy

Abstract:

The aim of our study is to enhance the ecological and economical value of an industrial residue that is the coffee parchment.

The first step of this work represented in the extraction of phenolic compounds by a pilot scale soxhlet, using two solvents: chloroform and a hydro-methanolic mixture followed by fractionation by ethyl acetate and n-butanol, successively. The second step consisted of the quantification of phenolic compounds which was carried out by the Folin-Ciocalteu method and the quantification of flavonoids by the aluminum chloride method. We estimated the content of these compounds by UV-Visible.

The total polyphenol and flavonoid assay results showed that the methanolic extract is richer in polyphenols compared to the other extracts with 42.83 ± 0.017 mg EAG / g MS and the acetate ethyl extract is richer in flavonoids contents with 0.082 ± 0.006 mg EC / g MS. Regarding the results of the anti-oxidant activity, the reducing power of all the extracts of the coffee parchment was higher than ascorbic acid activity and likewise for the DPPH radical scavenging activity, the parchment extracts showed a better activity. For the beta-carotene bleaching method, the ethyl acetate and n-butanol extracts showed greater antioxidant activity than BHA. As a very promising result, coffee parchment can be used as an easily accessible source of natural antioxidants and less expensive to replace synthetic antioxidants.

Keywords: *Extraction, coffee parchment, phenolic compound, flavonoids, antioxidant activity.*

INTRODUCTION

L'industrie de l'alimentation et de l'agriculture se développe rapidement. La croissance démographique et l'amélioration de la croissance économique, a attiré d'importants investissements dans cette industrie, s'élevant à 75 milliards de dollars en 2019. Avec l'industrialisation croissante du secteur agricole, la production de déchets qui en résulte représente un défi environnemental important. 5 millions des tonnes métriques de biomasses sont produit chaque année à partir de l'agriculture [1].

Il existe une grande variété de matières résiduelles solides de cette industrie et qui peuvent être étudiées et valorisées, tel que la parche de café. En effet, une raison de la présence de certains composés (caféine, tanins et polyphénols), ces résidus solides organiques présentent un caractère toxique et n'ont donc pas été utilisés de manière avantageuse. Cela conduit également à un problème de la pollution de l'environnement [2].

Le café est le deuxième produit commercial au monde en valeur après le pétrole et avant le fer. En effet, les dernières décennies ont vu une augmentation significative de la production et de la consommation de café, et par conséquent une augmentation de la production de déchets de café [3]. Le grain de café et le marc de café sont les principaux résidus de l'industrie de café [4]. En considérant les dix premiers pays producteurs, chaque année plus de dix millions de tonnes des résidus liquides et solide sont produits, à éliminer. Dans les pays producteurs de café, les résidus et les sous-produits de traitement des baies de caféier telles que les graines de café défectueux et le marc de café épuisé, ainsi que les cosses de café (pulpe et mucilage) qui constituent environ 60% du poids humide du fruit frais, représentent une source importante de pollution et menace environnemental [5,6], ainsi que des problème liés à chaque type de résidu [7].

Dans cette optique, l'objectif de notre travail vise à valoriser écologiquement et économiquement l'un de ces résidus industriels qu'est la parche de café.

En effet, l'industrie du café, en Algérie et surtout dans les pays producteurs de café comme le Brésil ou la Colombie, produit des tonnes de résidus et sous-produits de traitement des baies de caféier telles que les graines de café défectueux et le marc de café épuisé, ainsi que les enveloppes ou cosses de café (parche, pulpe et mucilage) représentant une source importante de pollution et menace environnemental.

La présente étude aborde la problématique de valorisation dans une vision différente. Récemment, de nombreuses études ont été consacrées à l'étude de la composition des matières résiduelles et de leurs applications secondaires. Ces matières contiennent des polysaccharides, des oligosaccharides, des lipides, des acides aliphatiques, des acides aminés, des protéines, des alcaloïdes (caféine, trigonelline) et des composés phénoliques, des minéraux, de la lignine, des mélanoidines et des composés volatils [4,8].

En effet, nous avons dans un premier temps émis l'hypothèse de trouver un ou plusieurs composants biologiquement actifs dans la parche qui nous permettront de mettre en valeur cette matière résiduelle et qui serviront à moindre coût comme additifs alimentaires (antioxydants), en médicaments ou en cosmétique ou comme colorants, arômes, aliment de bétail ou autre.

En outre, les antioxydants synthétiques les plus utilisés dans les différents domaines agroalimentaires, cosmétiques et même pharmaceutiques sont des composés

phénoliques de synthèse tels que l'hydroxyanisolebutylé (BHA), l'hydroxytoluènebutylé (BHT) et la tert-butyl hydroquinone (TBHQ). Les tocophérols sont également utilisés comme antioxydants pour l'alimentation, Cependant, le BHA et le BHT ils ont été limités par des règles législatives en raison de doutes quant à leurs effets toxiques et cancérogènes [9]. Des rapports révèlent qu'en plus être toxiques, leurs coûts de fabrication est très élevés et leur efficacité est plus faible par rapport aux antioxydants naturels tels que les tocophérols, ainsi que la prise de conscience croissante des consommateurs à l'égard de sécurité des additifs alimentaires, a créé un besoin d'identifier des alternatives naturelles et probablement sources plus sûres d'antioxydants alimentaires [10].

Dans cette perspective que nous avons mettre en valeur et étudier l'activité antioxydant d'extraits de la parche de café.

MATERIALS AND METHODS

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire des technologies de séparation et de purification (LTSP) de l'université de Tlemcen, dans le but d'évaluer l'effet anti oxydant de différents extraits de la parche de café.

Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur la parche de café. La prévenance de cette dernière est de l'usine *Africafé* situé au niveau de la zone industrielle « Ain defla » de la wilaya de Tlemcen.

Le matériel végétal (la parche) a été séché et broyé à l'ombre et à température ambiante. Pour obtenir une meilleure extraction, il est conseillé d'utiliser le matériel végétal sec afin d'éliminer tout risque de dégradation des composés antioxydants.

Après le séchage à l'abri de la lumière, notre matériel végétal est utilisé tel qu'il est, et il est rempli dans la cartouche d'un pilote MP1035 d'extraction solide-liquide.



Figure 1. la parche de café.

Généralités sur les techniques d'extraction

L'extraction est une technique de séparation, utilisant pour séparer un composé d'un mélange selon diverses techniques (Eckart et al2008), dans le but d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme (site 06). La technique d'extraction qu'on a utilisée est l'extraction par solvant « solide-liquide ». L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. Les laboratoires de chimie

analytique et les entreprises qui fabriquent des parfums utilisent des pilotes d'extraction solide- liquide discontinue (soxhlet) pour augmenter leurs rendements d'extraction et gagner plus de temps. L'extraction solide - liquide est un procédé semi-continu, qui couple une distillation avec une cartouche de type « Soxhlet » contenant la matière végétale imprégné d'un principe actif (soluté) à extraire par dissolution dans un solvant chaud. La colonne de distillation génère des vapeurs de solvant qui sont condensées; ce solvant pur et chaud alimente la cartouche.

Lorsque la cartouche est pleine, la solution obtenue (solvant et soluté) se vide automatiquement par siphonage (lixiviation) puis retourne dans le bouilleur où le solvant est de nouveau porté à l'ébullition. La lixiviation peut également être opérée par passage continu du solvant ou par vidanges manuelles successives.

Le solvant peut être également alimenté en une seule « passe » pour l'infusion puis l'extrait obtenu est soutiré manuellement (**site 07**).

L'équipement du pilote est constitué de :

- * Réfrigérant du distillat en inox 316L.

- * Condenseur vertical en inox 316L,

Une armoire électrique pour régler et démarrer le pilote.

Bouilleur en verre borosilicaté, chauffage électrique, équipé d'une sécurité niveau mini et d'une sécurité température maxi ; volume utile 6 litres.

Réfrigérant pour prise de pression différentielle.

Colonne en verre borosilicaté, en deux éléments avec garnissage en inox 316L.

Deux plateaux de recentrage en inox 316L, équipés chacun de vanne d'échantillonnage et de prise de température.

Deux recettes du distillat en verre borosilicaté.

Cartouche d'extraction, type « Soxhlet », en verre borosilicaté avec ouverture rapide et poche montée sur un support en inox 316L.

Tuyauteries de liaison en inox 316L pour le procédé et en PVC armé pour le fluide de refroidissement.

Charpente support en tubes inox 304L et noix aluminium.



Figure 2. Pilote d'extraction solide-liquide (MP1035)

Dégraissage

La méthode suivie pour l'obtention de l'huile est celle de pilote MP1035. Une masse de 250g de parche de café subit une extraction par un solvant apolaire (chloroforme) pendant 4h (21 cycles). Par distillation sur le même pilote, on a récupéré le maximum de solvant. La quantité de chloroforme restante dans le bouilleur est récupérée puis évaporée à l'aide d'un rotavapor (ISO LAB LaborgerateGmbH). Le produit final est une résine de couleur marron foncé.

Extraction de l'extrait brut

Après l'extraction par le chloroforme, le marc de la parche du café a été laissée sécher pendant 2 jours avant d'être réutilisée pour une extraction par un solvant polaire «méthanol/eau : (70/30 : v/v) ». La procédure a été répétée deux fois. A la fin du procédé et après distillation, l'extrait alcoolique est mis dans le rotavapor pour éliminer toutes traces de solvant. On a ajouté 5mL de méthanol à notre résidu obtenu pour le récupérer après l'avoir pesé pour déterminer le rendement de la matière sèche.

Le rendement en extrait sec

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec déjà calculé (en gramme), avec le poids de matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme. Les rendements sont calculés par rapport à 100 grammes de la matière végétale sèche.

$$R(\%) = \frac{P_1 - P_2}{m} \times 100 \quad (1)$$

Fractionnement

Après évaporation, les résidus secs des extraits bruts sont repris dans de l'eau tiède (50ml) et sont épuisés dans une ampoule à décanter (100mL) successivement par l'acétate d'éthyle et le n-butanol au même volume. L'opération a été répétée trois fois pour épuiser le maximum de solutés puis les solvants sont évaporés à sec et les résidus secs sont repris dans du méthanol (5mL) après avoir pris le poids comme cela a été fait pour les extraits bruts méthanolique.

Dosage des composés phénoliques

Dosage des polyphénols totaux

Principe

La méthode la plus utilisée pour l'évaluation quantitative des composés phénoliques dans les extraits végétaux est basé sur leurs capacités de réduire le mélange d'acide Phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu. Un complexe bleu qui peut être déterminé colorimétriquement à 750nm [11]:

Mode opératoire

Un volume de 0,1 mL de chaque extrait est mélangé avec 2 mL de la solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparé.

Le mélange est agité par un vortex et incubé pendant 5 minutes

100 µl du réactif Folin-Ciocalteu 0,1N est ajouté au mélange.

Le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

L'absorbance est mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm. (Tableau 5)

L'absorbance maximale lue à 750nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans les extraits bruts.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

Tableau 1. méthode de dosage des polyphénols totaux

	La gamme d'étalon (acide gallique)									
[acide gallique] µg/mL	Blanc	2.5	50	100	150	200	250	300	350	400
Acide gallique (mL)	-	5	10	20	30	40	50	60	70	80
Eau distillée(mL)	100	95	90	80	70	60	50	40	30	20
Na ₂ CO ₃ (2%)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agitation et incubation pendant 5 minutes										
Réactif de Folin (1N) (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 minutes										
Mesure de l'absorbance à 750nm										

	Extraits (mg/mL)			
	Extrait CHCl ₃	Extrait MeOH/eau	Extrait AcOEt	Extrait BuOt
Extraits (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Na ₂ CO ₃ (2%) mL)	2	2	2	2
Agitation et incubation pendant 5 minutes				
Folin-Ciocalteu (1N) (1mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 minutes				
Mesure de l'absorbance à 750nm				

Dosage des flavonoïdes

Principe

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm.

Protocole

La quantification des flavonoïdes est réalisée par la méthode colorimétrique décrit par (zhishen et al, 1999 in Ardestani et Yazdanparast, 2007).

500 µl de l'extrait sont ajoutés à 2 ml d'eau distillée suivi de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15%.

Après 6 minutes, 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl₃-6H₂O) à 10% sont ajoutés au mélange.

le tout est laissé pendant 6 minutes, ensuite 2 ml d'hydroxyde de sodium à 4% sont ajoutés au tubes et le volume final est complété immédiatement à 5 ml par l'eau distillée.

Après 15 minutes, la lecture est faite à 510nm contre un blanc au spectrophotomètre.

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

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche (tableau6).

Tableau 2. Méthode de dosage des flavonoïdes.

[catéchine] (µg/mL)	Blanc	2	4	5	10	20	30	40	50
Catéchine (µL)		20	40	50	100	200	300	400	500
Eau distillée (µL)	500	480	460	450	400	300	200	100	0
NaNO ₂ (15%) (µL)	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Agitation par vortex et incubation pendant 6 minutes									
AlCl ₃ (10%) (µL)	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Agitation par vortex et incubation pendant 6 minutes									
NaOH (4%) (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Compléter le volume total des tubes à 5 mL par eau distillée									
Incubation pendant 15 minutes									
Mesure de l'absorbance à 510 nm									

Extrait (µL)	Extraits (mg/mL)			
	Extrait CHCl ₃	Extrait MeOH/eau	Extrait AcOEt	Extrait BuO
Extrait (µL)	500	500	500	500
Eau distillé (mL)	2	2	2	2
NaNO ₂ 15% (µL)	150	150	150	150
Agitation par vortex et incubation pendant 6 minutes				
AlCl ₃ 10% (µL)	150	150	150	150

Agitation par vortex et incubation pendant 6 minutes				
NaOH 4% (mL)	2	2	2	2
Compléter le volume total des tubes à 5 mL par eau distillée				
Incubation pendant 15 minutes				
Mesure de l'absorbance à 510 nm				

Etude de l'activité antioxydant

Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Principe

Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, en acceptant un électron ou un radical hydrogène devient stable. L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un atome d'hydrogène. La réduction de DPPH est déterminée par le changement de couleur du violet vers le jaune (Atoui et al 2005).

L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 515 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antioxydant (Molyneux, 2004).

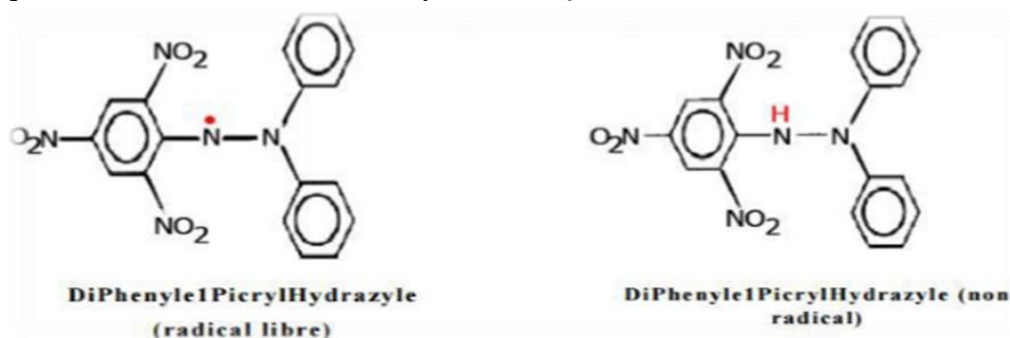


Figure 3. Forme radicalaire est réduite du DPPH (Milardovic et al 2006).

Protocole

- ◆ A 1950 µl de la solution du DPPH à $6,34 \cdot 10^{-5}$ (0,005g DPPH dans 200 ml méthanol) nous avons ajouté 50µl de chaque solution méthanolique des différentes fractions des plantes étudiées (acétate d'éthyle et n- butanol) à différentes concentrations.
- ◆ Pour chaque concentration un blanc est préparé (50 µl de chaque solution testé + 1,95 ml de DPPH), Le contrôle est préparé en parallèle, en mélangeant 50µl du méthanol avec 1,95 ml de DPPH.
- ◆ Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm au spectrophotomètre (Gulcine, 2010).

Expression des résultats

Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de l'équation suivante:

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100 \quad (2)$$

AS = absorbance du contrôle

AT = absorbance du test effectuée

Calcul des CI₅₀

La concentration des extraits nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres, est calculée graphiquement en traçant les pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées. Cette concentration est connue sous le terme CI₅₀ ou concentration inhibitrice (**Bertoncelj et al 2007**).

Calcul de l'activité antiradicalaire

Nous pouvons déduire l'activité anti radicalaire de nos extraits qui est inversement proportionnel à CI₅₀ trouvées (**Maisuthisakul, Suttajit, et Pongsawatmmit, 2007**).

$$A_{AR} = I / CI_{50} \quad (3)$$

A_{AR} : pouvoir antiradicalaire.

CI₅₀: La concentration d'inhibition de 50% DPPH

L'activité anti radicalaire est comparée à celle de l'acide ascorbique.

Réduction du fer : FRAP (ferric reducing antioxydant power)

Principe

La méthode de FRAP est basée sur la réaction chimique de réduction des ions Ferriques Fe(III) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en ion Ferreux Fe(II) selon la méthode de **Oyaizu, 1986 in pan et al., 2008**. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

Protocole

1 ml de l'échantillon à différentes concentrations (0,1 ; 0,25 ; 0,75) mg/ml est mis dans un mélange de 2,5 ml d'une solution tampon phosphaté 0,2 M (pH=6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1% . .

On laisse les tubes dans l'étuve à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidis les tubes à la température ambiante.

Pour stopper la réaction 2,5 ml de l'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés puis, puis il est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Un volume de 2,5 ml du surnagent sont ajoutés à 2,5 ml d'eau distillée et 500 µl d'une solution de FeCl₃, 6H₂O (0,1%) sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances sont analysé par spectrométrie UV-Visible, contre un blanc à 700 nm (**Karaozler et al 2008**). L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous traçons les histogrammes des absorbances obtenus pour les différentes concentrations des extraits étudiées.

Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β-carotene bleaching method)

Principe

Cette méthode est sensible, rapide est simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrie dans le visible à 470 nm, la décoloration du bêta-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du bêta-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induits un retard de la cinétique de la décoloration du bêta-carotène (Laguerre,2007).

Protocol

Pour étudier l'activité antioxydant par la méthode de décoloration du β -carotène, nous avons choisi de travailler avec le protocole expérimental décrit par (Sun *et al* 2005in Ozsoy *et al.*, 2008)avec quelques modifications apportées à la méthode.

Pour préparer l'émulsion du β -carotène, 2 mg de ce dernier sont dissous dans 10 mL de chloroforme, puis 1 mL de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié et 200 mg du Tween 40 (tous ces produits sont fournis par Fluka).

Le chloroforme est évaporé par un rotavapor et le résidu obtenu est repris par 50 ml de peroxyde d'hydrogène à 30%.

Ensuite, 5 ml de cette émulsion sont préparés, auxquels 200 μ l d'extraits bruts méthanolique de nos plantes étudiées ou d'antioxydant de référence (BHA) à la concentration 2,5 mg/ml sont ajoutés.

Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans le β -carotène.

Les tubes couverts sont placés dans un bain marie réglé à 50 °C et la lecture de l'absorbance est faite toute les 10 minutes durant 60 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 ml de l'émulsion du β -carotène et 200 μ l de méthanol.

Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [1 - (A_0 - A_t / A^0_0 - A^0_t)] \times 100 \quad (4)$$

♦AA :Activité antioxydant ;

♦A^{*} :Absorbance de l'échantillon à t_0 ;

♦At :Absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes ;

♦A^o_o:Absorbance du contrôle négatif à t_0 ;

♦A^t_t:Absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes(Ozsoy *et al* 2008).

Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavengingactivity)

Principe

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV.

Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piégeurs la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (Magalhaes *et al* 2008).

La réalisation d'une telle méthode nécessite beaucoup de rigueur au moment de la manipulation.

Protocol

Un volume de 3,4 ml de l'extrait brut de chaque partie des plantes à étudier à la concentration de 0,1 μ g / ml, préparé dans une solution tampon phosphate à 0,1M (pH =

7,4) sont mélangés avec 600 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43mM (préparée dans le même tampon phosphate).

La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 230 nm pendant 40 minutes à 10 minutes d'intervalle.

Dans les mêmes conditions opératoires, le BHA (butyleHydroxyanisole), à la même concentration choisie, est utilisé comme contrôleur positif (Magalhaes et al., 2008).

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:

$$\% \text{ du piégeage du H}_2\text{O}_2 = [(AC - AT) / AC] \times 100 \quad (5)$$

AC : Absorbance du contrôle ;

AT : Absorbance du test.

RESULTS AND DISCUSSION

Rendement en extrait sec

La parche du café séchée et broyée subit une première extraction par du chloroforme à l'aide d'un pilote type soxhlet, suivi d'une extraction par un mélange méthanol/eau (70/30 v/v) et d'un fractionnement de cette dernière extraction successivement par deux solvants : l'acétate d'éthyle et le n- butanol et ceci dans le but de pouvoir récupérer une large gamme de composés phénoliques.

Après l'extraction, les extraits secs sont récupérés (le produit final est une résine de couleur marron foncé) et les rendements sont calculés. Le rendement a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p/p).

Les rendements des différentes fractions sont déterminés et représentés dans la figure ci-dessous.

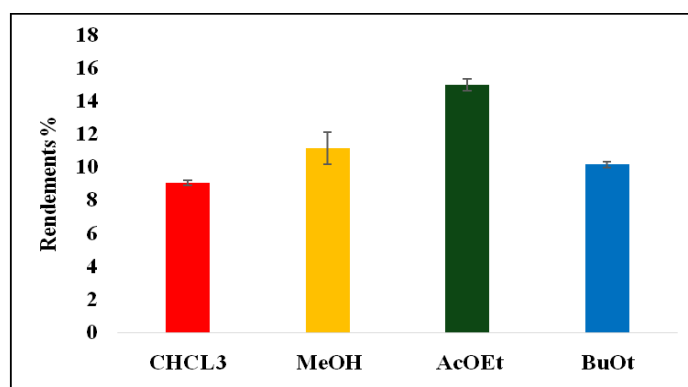


Figure 4. Rendement en extrait sec

CHCL₃ : extrait chloroformique

MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)

AcOEt : extrait acétate d'éthyle

BuOt : extrait butanolique

Selon les résultats illustrés dans la figure 06, nous avons remarqué que l'extrait acétate d'éthyle présente le rendement le plus élevé de l'ordre de **14.96 ± 0.148%** par rapport aux extraits méthanolique, butanolique et chloroformique qui ont présentés des

rendements respectives de l'ordre de $11.14 \pm 0.975\%$; $10.15 \pm 0.353\%$ et $9.055 \pm 0.183\%$.

Le protocole d'extraction utilisé dans cette étude respecte les paramètres qui régissent les extractions de type solide-liquide pour l'extraction des polyphénols à savoir ; l'augmentation de la température et le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction, ainsi que la diminution de la taille des particules afin d'augmenter le coefficient de diffusion du solvant (**El haci et al. 2012**).

Bruneton (2005) rapporte que l'extraction des hétérosides peut être effectuée le plus souvent à chaud par l'acétone ou par de mélanges d'alcools (tels que le méthanol ou l'éthanol) et d'eau, et qu'il est possible ensuite de procéder à une évaporation sous vide et mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau ce qui appui notre protocole expérimental.

Cette variabilité du rendement des quatre extraits peut être due à la différence du solvant utilisé. En effet, l'extraction par solvant est plus fréquemment utilisée pour l'isolation des antioxydants, de plus, le rendement d'extraction et l'activité antioxydante des extraits dépendent fortement du solvant, en raison du potentiel antioxydant différent des composés de polarité différente (**Marinova et Yanishlieva, 1997**).

Les solvants apolaires sont parmi les solvants les plus utilisés pour extraire les polyphénols que l'eau. L'acétate d'éthyle et l'éther diéthylique ont été utilisés pour l'extraction de polyphénols de faible poids moléculaire à partir de bois de chêne (**Fernaâddez de Simon, Cadahña, Conde et García-Vallejo, 1996**) et les polyphénols extraits à l'acétate d'éthyle à partir de matériaux naturels auraient une forte activité antioxydante (**Moure et al., 2001**).

Dosage des composés phénoliques

Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols prennent l'importance grâce à leurs bienfaits sur lasanté. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite l'intérêt pour la prévention et letraitement de plusieurs maladies.

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode basée sur leurs réactions au réactif de Folin-Ciocalteu. La couleur bleu après incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols.

La teneur en polyphénols a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de contrôlepositif effectuée (acide gallique) avec un $R^2 = 0,988$; elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

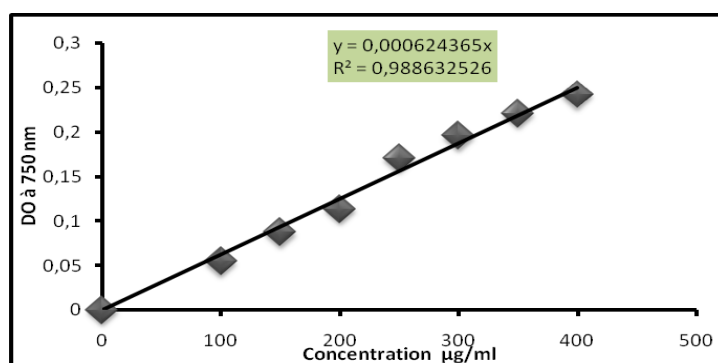


Figure 5. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-dessous :

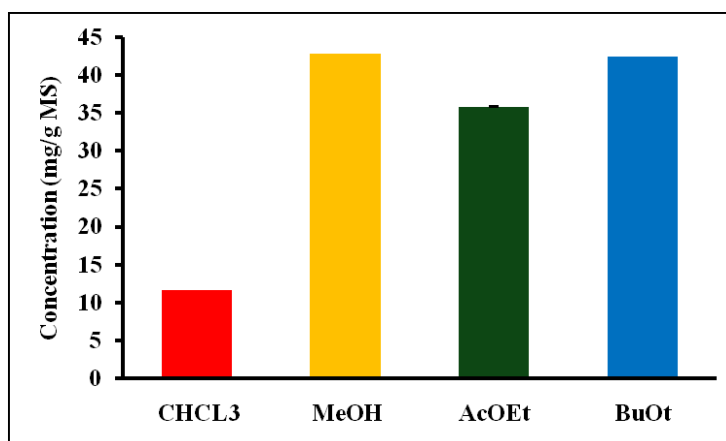


Figure 6. Teneurs en polyphénols totaux dans les quatre extraits de la parche de café.

CHCL₃ : extrait chloroformique
MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)
AcOEt : extrait acétate d'éthyle
BuOt : extrait butanolique

Les résultats montrent clairement que la meilleur teneur **42,83 ± 0,017**mg EAG/g MSa étéobtenu avec l'extrait méthanolique suivi par l'extrait butanolique**42,47 ± 0,004** mgEAG/g MS et l'extrait acétate d'éthyle **35,82 ± 0,027**mgEAG/g MS, tandis que l'extrait apolaire chloroformique présente la plus faible teneur qui est de l'ordre de **11,59 ± 0,009** mgEAG/g MS.

(Singh et al, 2002) ont extrait les antioxydants à partir de la peau de grenade comme étant une matière résiduelle en utilisant du méthanol, de l'acétone ou de l'eau et ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement.

Selon (Iqbal et al., 2008) le rendement le plus élevé est obtenu avec le méthanol suivi de l'éthanol, de l'acétone, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et de l'eau, respectivement. Ces résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment par (Iqbal et al., 2005) qui ont rapporté que le méthanol est habituellement recommandé pour l'extraction des composés antioxydant.

Le méthanol est un extracteur efficace pour les polyphénols, donc c'est un solvant fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industriel. Il est facilement accessible et bon marché (Wang et al, 2004).

Dosage des flavonoïdes

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits de la parche de café après l'addition de la solution de chlorure d'Aluminium ($AlCl_3$), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés.

La teneur en flavonoïdes pour les différents extraits a été exprimée en mg équivalent de catéchine (EC) par gramme de matière végétale sèche à partir de la courbe d'étalonnage effectuée (figure 7).

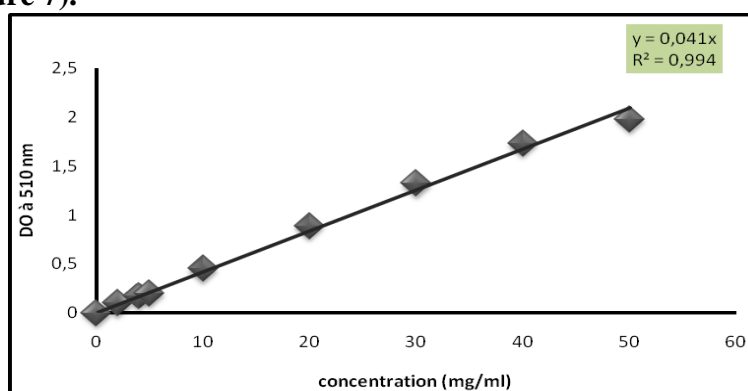


Figure 7. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 8.

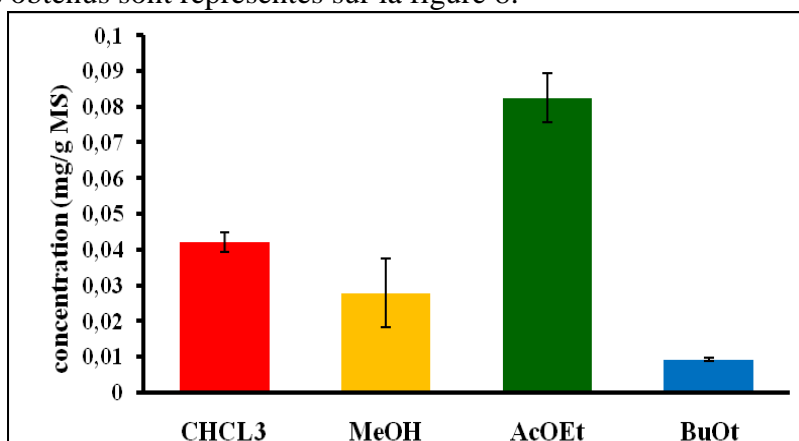


Figure 8. Teneurs en flavonoïdes totaux dans les quatre extraits de la parche de café.

CHCl₃ : extrait chloroformique

MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)

AcOEt : extrait acétate d'éthyle

BuOt : extrait butanolique

Selon l'histogramme présenté dans la figure 8, nous avons remarqué que l'extrait acétate d'éthyle présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes, de $0,082 \pm 0,006$ mg EC/g MS suivi par l'extrait chloroformique avec un taux de $0,042 \pm 0,002$ mg EC/g MS, tandis que l'extrait méthanolique et l'extrait butanolique ont présenté une faible teneur de l'ordre de $0,013 \pm 0,009$ mg EC/g MS, $0,0092 \pm 0,0004$ mg EC/g MS, respectivement.

Nous constatons que les extraits de la parche de café sont quantitativement riches en polyphénols comme composés phénoliques que de flavonoïdes. Effectivement et selon plusieurs études, la parche seraient plus riche en tannins que de polyphénols.

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules (Bounatirou et al., 2007).

Ces composés sont considérés comme des puissants antioxydants, et piègeurs des radicaux libres réactifs et chélateurs d'ions métalliques. (Rita et Farit., 2009).

Evaluation de l'activité Antioxydante

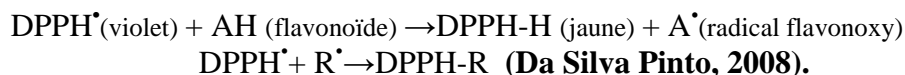
Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le DPPH

Puisque le principal mécanisme d'action antioxydant des polyphénols et des flavonoïdes est le piégeage des radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques du commerce. Les radicaux les plus fréquemment utilisés sont le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'acide 2,2-O-azino-bis (3-éthylbenzoline-6-sulphonique) (ABTS).

Dans notre étude, le choix s'est porté sur la méthode utilisant le DPPH pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits. Elle reste l'une des méthodes les plus simples, les plus rapides et les plus efficaces à cause de la grande stabilité du radical DPPH (Bozinet al., 2008).

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'activité antioxydante des quatre fractions à savoir ; chloroformique, méthanolique, acétate d'éthyle et butanol de la parche, afin de localiser et trancher laquelle des fractions présente le plus d'activité.

Après 30 min d'incubation de la solution DPPH-extrait (et standard), à différentes concentrations on note que la coloration violette vire vers le jaune dans les quatre extraits, ce changement de couleur est dû à la réduction du radical DPPH.



La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 510 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition. Ces derniers nous ont permis de tracer les courbes qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition des différents extraits ainsi que l'acide ascorbique choisie comme contrôle positif en fonction des différentes concentrations de l'extrait (figures 13 à 17).

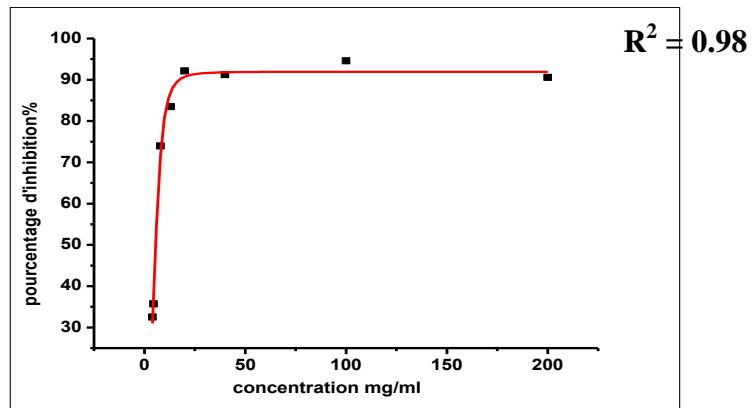


Figure 9. Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique.

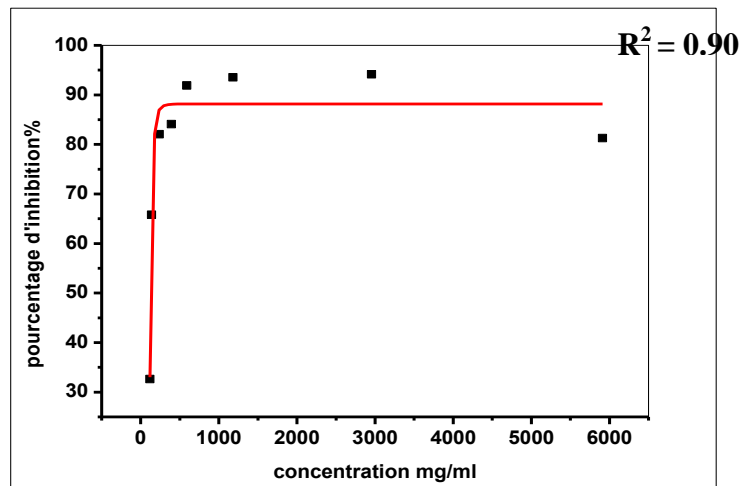


Figure 10. Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique.

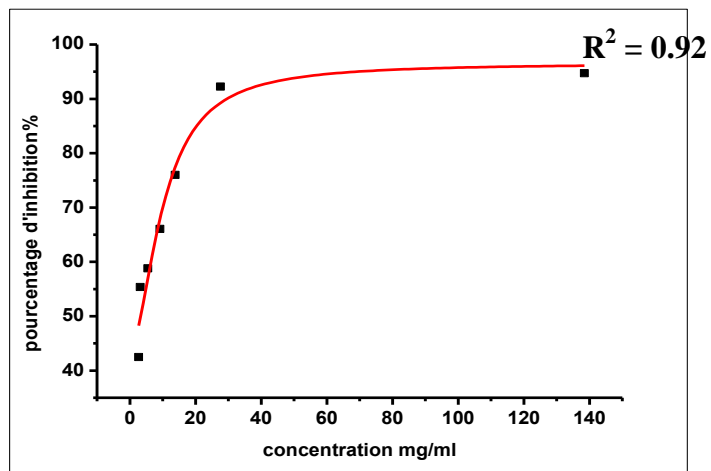


Figure 11. Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'acétate d'éthyle.

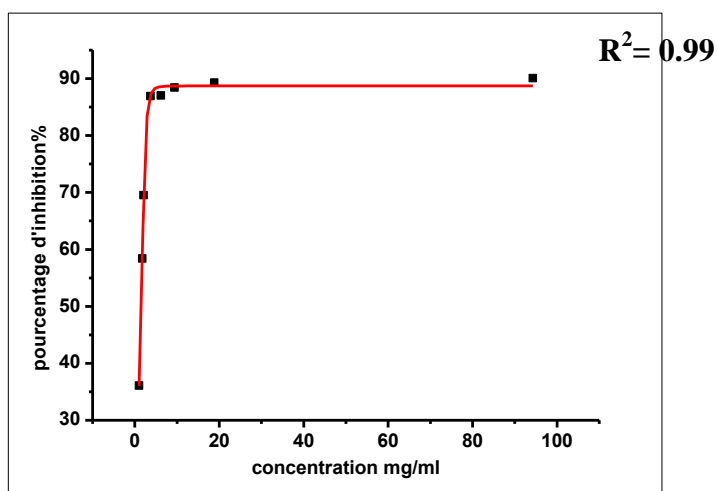


Figure 12. Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait butanolique.

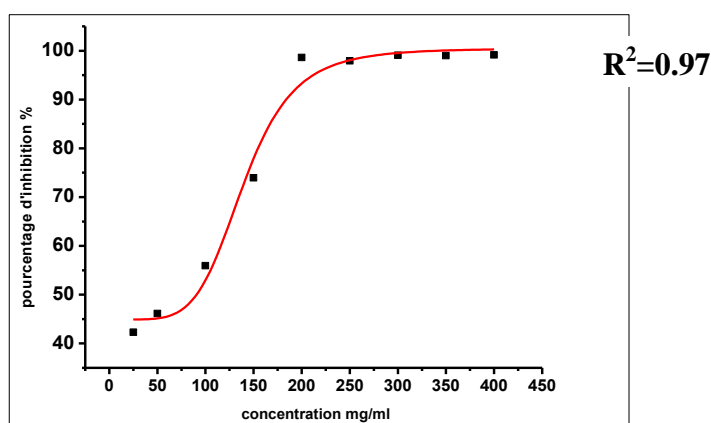


Figure 13. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

D'après les courbes (figures 13 à 17) nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est proportionnel à la concentration (des extraits et de l'acide ascorbique).

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée par CI_{50} qui est la concentration d'extrait qui réduit 50% de radical libre DPPH; une faible valeur de CI_{50} implique une activité antioxydant plus élevée.

Grâce à la formule donnée par (Maisuthisakul et al. 2007), nous avons pu exprimer nos résultats en calculant l'activité antiradicalaire, qui n'est autre que l'inverse des CI_{50} préalablement calculées.

L'ensemble des résultats de l'activité antioxydant exprimée en CI_{50} et en activité antiradicalaire sont représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3. les valeurs de CI_{50} et l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique et les quatre extraits préparés de la parche de café

	CI ₅₀ (mg/ml)	AAR
ExtCHCl₃	5,5926	0,1788
Ext MeOH	126,7374	0,0078
Ext AcOEt	3,3038	0,3026
Ext But	1,576	0,6345
Ac ascorbique	90,6876	0,0110

L'histogramme ci-dessous rapporte une comparaison entre l'activité antiradicalaire de nos extraits à celui de l'acide ascorbique (**Figure 18**)

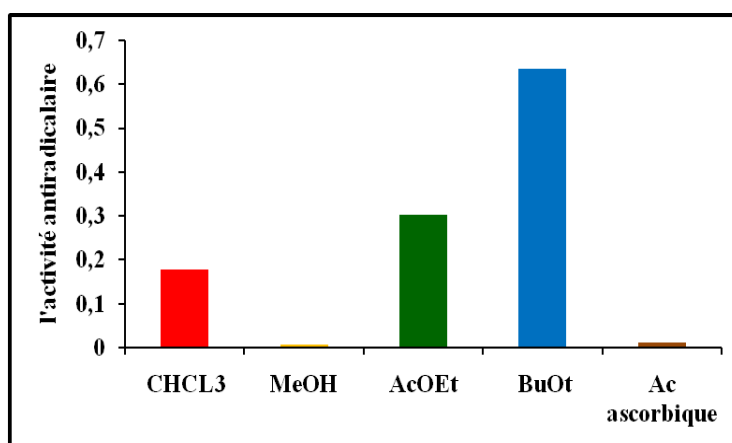


Figure 14. L'activité antiradicalaire des différents extraits et l'acide ascorbique.

Les résultats présentés dans la **figure 18** montrent que l'activité antiradicalaire de l'extrait butanolique est plus élevée par rapport aux extraits acétate d'éthyle et chloroformique. Ainsi une activité plus faible voire négligeable de l'extrait méthanolique et du standard ont été notés.

Nos résultats ont montré que la parche de café a une activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée à ceux qui obtenu par (**Bendjabeur Salah, 2012**) sur la peau de *grenade Punicagranatum* L. qui montre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH est inférieur à celle de l'acide ascorbique.

Une autre étude réalisée par (**Muanza et al., 1998**) a rapporté que l'extraction sélective des composés plus apolaires augmentait l'activité antioxydante des extraits de cosse de lentille. Les extraits au butanol ont donnés des valeurs de CI50 les plus faibles pour le radical DPPH suivies de celles dans l'acétate d'éthyle. Celles obtenues avec du méthanol-eau étaient moins efficaces.

Réduction du fer : FRAP (ferricreducing antioxydant power)

C'est une méthode simple et rapide pour l'évaluation de l'activité antioxydant, la détermination de cette dernière est basé sur la capacité des polyphénols à réduire le complexe fer ferrique Fe³⁺/ferricyanide de couleur jaune à la forme fer ferreux Fe²⁺/ferricyanide de couleur bleu-vert, qui pourrait être surveillé à 700 nm (**HowYee Lai and YauYan Lim, 2011**).

La figure ci-dessous représente l'histogramme de l'absorbance en fonction des trois différentes concentrations choisies des quatre extraits et l'acide ascorbique;

l'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur testés (Hubert, 2006).

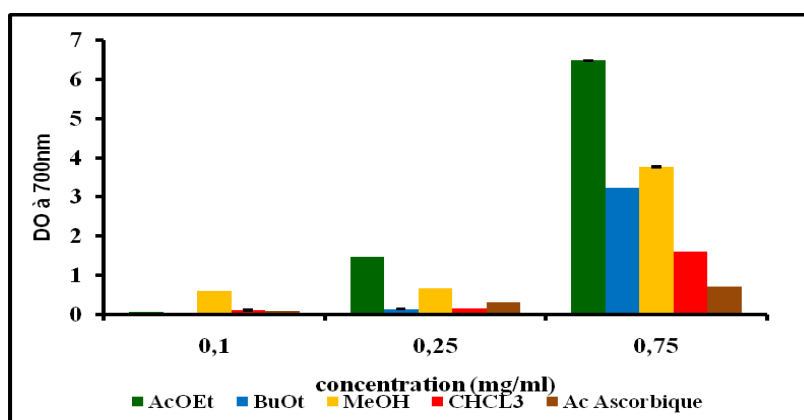


Figure 15. Pouvoir réducteur des quatre extraits et l'acide ascorbique.

CHCl₃ : extrait chloroformique

MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)

AcOEt : extrait acétate d'éthyle

BuOt : extrait butanolique

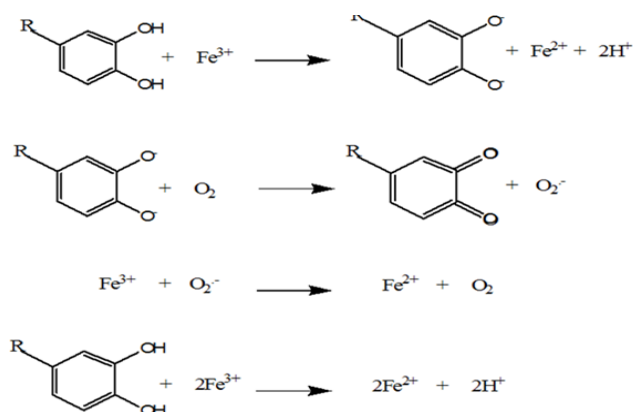
En traçant l'histogramme des absorbances obtenues de nos différents échantillons, on a pu remarquer que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

Aussi, d'après nos résultats, on observe que pour la même concentration de **0,75** mg/ml l'extrait acétate d'éthyle donne de meilleurs résultats que celles de l'extrait méthanolique, butanolique et chloroformique et il présente une absorbance 10 fois plus élevée que celle de l'acide ascorbique (le contrôle positif).

Le pouvoir réducteur de nos extraits du à leur richesse en substances polyphénoliques ont la tendance de libérer leur électron, ou proton du groupement hydroxyde (Benammar et Benguerfi, 2018).

En effet, et d'après *DeGraft-Johnson* et ces collaborateurs, sur la capacité de réduction le fer par les polyphénols des extraits de plantes, ils ont indiqué que le noyau catéchol est la seule structure qui est associée positivement dans ce pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmenterait le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité est due à la participation des groupements -OH liés au noyau catéchol.

La réduction de Fe³⁺ en Fe²⁺ par les groupements -OH du catéchol peut être décrite par les réactions suivantes :



Ces réactions montrent que l'oxydation initiale du catéchol par le Fe^{3+} conduit à la génération de Fe^{2+} et une structure en semi-quinone. La semi-quinone peut réagir avec l' O_2 dissous dans le mélange réactionnel avec une libération ultérieure d'ions superoxyde.

L'ion superoxyde peut également réduire l'ion Fe^{3+} . Ainsi, l'oxydation de deux groupements $-\text{OH}$ peut résulter de la réduction de 2 ions Fe^{3+} .

De plus, si le noyau phénolique était substitué par un groupement donneur d'électron ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, ou d'autre substituant aliphatiques), ça inciterai l'ajout d'autres réactions dans lesquelles les noyaux phénoliques acquièrent une tendance de donner des électrons *via* un groupement $-\text{OH}$, et finalement augmentent leur capacité comme des réducteurs (DeGraft-Johnson et al., 2007).

Activité antioxydant par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β -carotenebleaching method)

La méthode de décoloration du β -carotène mesure la capacité d'un antioxydant à inhiber la peroxydation lipidique et ainsi la neutraliser. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes (radicaux libres), ces derniers oxydent le β -carotène. En effet, dans cette méthode, le système réactionnel est constitué d'acide linoléique et de β -carotène qui subit une décoloration rapide en l'absence d'un antioxydant. Le radical libre de l'acide linoléique (hydroperoxyde), formé lors de l'enlèvement d'un atome d'hydrogène à l'un de ses groupements méthylène, attaque les molécules de β -carotène, qui vont perdre leurs doubles liaisons et, par conséquent, leur couleur orange caractéristique. La vitesse de blanchiment de la solution de β -carotène a été mesurée par la différence entre la lecture initiale de l'absorbance spectrale à 470 nm à 0 min et après 60 min. L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle (HowYee Lai and YauYan Lim, 2011).

Les résultats de l'effet antioxydant de nos différents extraits de laparche de café en fonction du temps sont représentés dans le graphe ci-dessous (Figure 16).

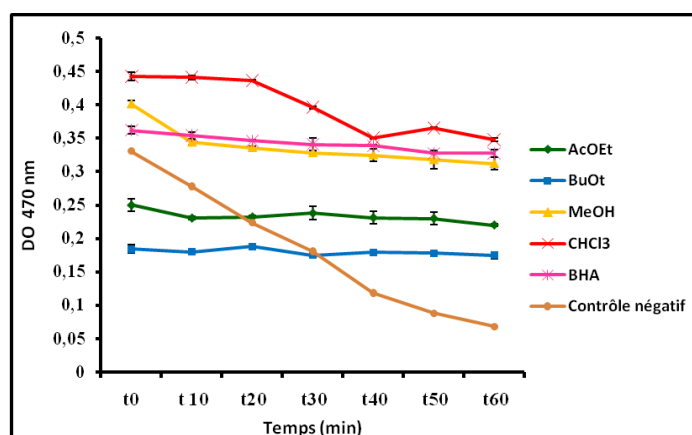


Figure 16. Pouvoir antioxydant des extraits de la parche de café par la méthode de décoloration de la β -carotène.

CHCl₃ : extrait chloroformique
MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)
AcOEt : extrait acétate d'éthyle
BuOt : extrait butanolique
BHA : butylHydroxyanisole

D'après la figure ci-dessus, nous remarquons que le BHA, qu'est le contrôle positif, présente des absorbances particulièrement stables au cours du temps, ces dernières reflètent le grand pouvoir du BHA à protéger le β -carotène et de ce fait, il inhibe et retarde sa décoloration.

De même, nous avons enregistré une cinétique légèrement décroissante qui tend vers la stabilité parfaite du pouvoir antioxydant des extraits butanolique et acétate d'éthyle au cours du temps. Ce qui n'était pas tout à fait le cas pour les extraits méthanolique et chloroformique où on a enregistré une décroissance puis un retour à la stabilité à 10 min et 40 min, respectivement.

De plus, on note que la cinétique produite par le contrôle négatif est décroissante, avec des absorbances qui convergent vers le zéro ce qui constitue la limite inférieure de l'activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène.

L'histogramme (**Figure 17**) représente le pourcentage d'inhibition pour chaque extrait par rapport à celui du BHA.

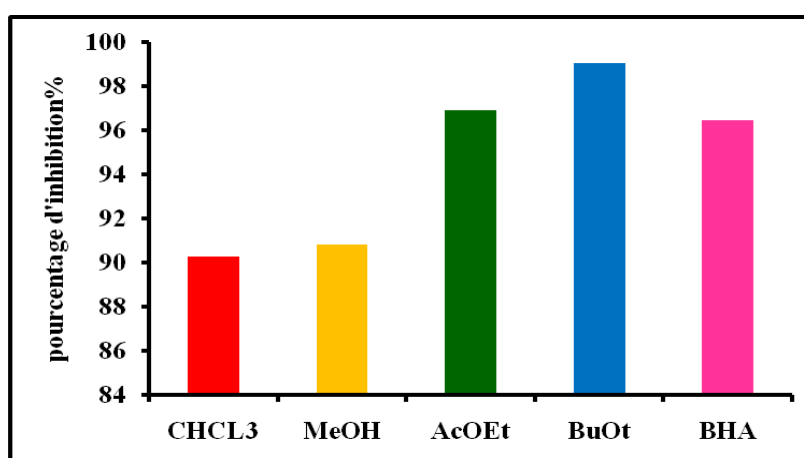


Figure 17. Pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène

CHCl₃ : extrait chloroformique

MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)

AcOEt : extrait acétate d'éthyle

BuOt : extrait butanolique

BHA : butylhydroxyanisole

La figure ci-dessus rapporte que les deux extraits acétate d'éthyle et n-butanol présentent un pourcentage d'inhibition plus élevé de l'ordre de **99,04%** et **96,91%** respectivement vis-à-vis du BHA qui présente un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **96,45%**, ce qui signifie une meilleure activité antioxydante.

Quant aux extraits organiques : méthanolique et chloroformique nous avons remarqué une activité antioxydante plus réduite, ce qui se traduit par des valeurs de pourcentages d'inhibition plus faibles. En effet, nous avons enregistré : **90,81%** pour l'extrait méthanolique, et **90,27%** pour l'extrait chloroformique.

D'après ces résultats, il est important de souligner que l'activité antioxydante des extraits obtenus, se compare très bien à celle d'autres antioxydants synthétiques du commerce, tels que l'hydroxyanisolebutylé (BHA) utilisé dans cette étude; on peut en conclure que les extraits de la parche de café exercent presque la même activité que le BHA.

Cette méthode nous permet donc de voir la capacité des antioxydants présents dans le mélange réactionnel à stabiliser les hydroperoxydes lipidiques et par conséquent voir s'ils sont aptes à prévenir l'oxydation lipidique (**Sharififar et al., 2009**).

Le mécanisme de la peroxydation lipidique se reconnaît par la réaction en chaîne des radicaux libres, donc la capacité des antioxydants à inhiber ce mécanisme est due à leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres. Ceci caractérise aussi les produits alimentaires contenant des antioxydants qui par piégeage et neutralisation des radicaux libres maintiennent la bonne qualité du produit.

Les résultats de cette étude impliquent que la capacité antioxydante potentielle de cette matière résiduelle qui est la parche de café sont attribuées aux composés phénoliques et les flavonoïdes qu'elle contient (**Pandey et al., 2000 ; Ramirez-Martinez., 1988**)

Les flavonoïdes sont connus qu'ils jouent un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation lipidique. Par contre, la différence de solubilité des flavonoïdes dans le système micellaire eau-lipide de ce modèle influence les résultats obtenus, et la répartition des composés entre les deux phases peut influencer les résultats de l'oxydation. Ainsi, les antioxydants hydrophobes sont rapportés qu'ils sont plus efficaces que les antioxydants hydrophiles dans ce test de décoloration du β -carotène et cela en s'orientant vers la phase lipidique et l'interfacielipide-eau, combattant ainsi la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation de la β -carotène, et comme l'activité antioxydante obtenue est plus ou moins faible dans l'extrait méthanolique par rapport aux autres extraits et à celle du BHA, on peut conclure que celle-ci est due à cette différence de solubilité des flavonoïdes qu'il contient (**Sharififar et al., 2009**).

Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Le peroxyde d'hydrogène c'est une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer.

Désirant étudier l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des composés de nos extraits afin d'évaluer leur activité antioxydante, nous avons opté pour l'utilisation de la méthode de référence décrite en 1989 par Ruchet ses collaborateurs dans la revue *Carcinogenesis* (**Ruchet et al., 1989**).

Les résultats obtenus par cette méthode sont rapportés dans la figure suivante.

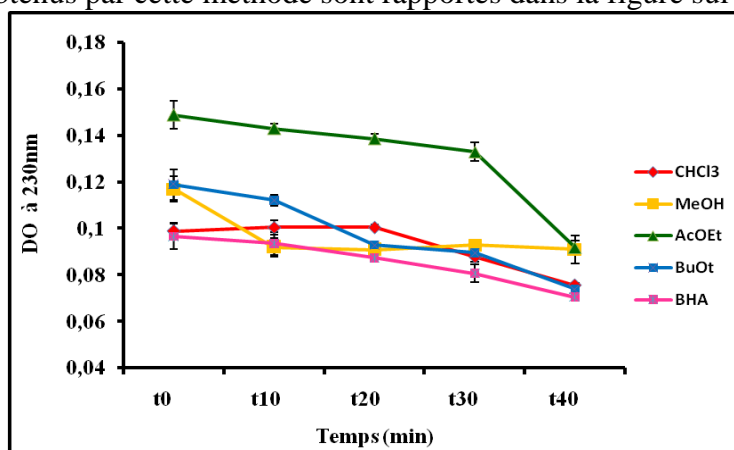


Figure 18. *Activité antioxydant des extraits de la parche avec BHA pour la méthode du piégeage du peroxyde d'hydrogène.*

Dans la figure ci-dessus, qui est une évolution des absorbances du H₂O₂ en fonction du temps, nous avons remarqué que nos quatre extraits ont vraisemblablement piégé cet oxydant, ce qui est traduit par l'allure décroissante des courbes obtenus en fonction du temps. Tout de même, on note que l'extrait méthanolique a eu un comportement particulier vers les 20 minutes de cinétique, où l'allure de la courbe se stabilise.

Afin de comparer l'intensité de l'activité du piégeage par nos extraits à celle du contrôle positif qu'est le BHA, on a opté, comme beaucoup d'auteurs, pour le calcul des pourcentages du piégeage du peroxyde d'hydrogène. Ceci est illustré dans l'histogramme ci-après.

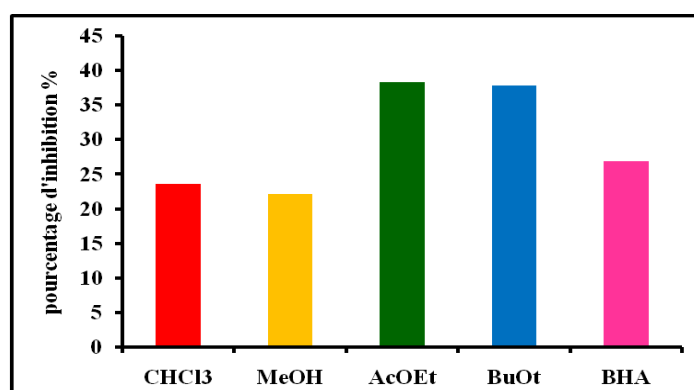


Figure 19. Pourcentage d'inhibition du piégeage du H₂O₂

CHCl₃ : extrait chloroformique

MeOH : extrait méthanol/eau (70/30 v/v)

AcOEt : extrait acétate d'éthyle

BuOt : extrait butanolique

BHA :butylHydroxyanisole

Les résultats enregistrés dans la figure ci-dessus montrent que l'extrait acétate d'éthyle présente la meilleure activité en terme d'inhibition du peroxyde d'hydrogène qui est de l'ordre de **38,34 %** suivi par l'extrait butanolique qui a présenté une activité de l'ordre de **37,87 %**. En comparant l'activité du piégeage de ces extraits avec celle du BHA, nous avons remarqués qu'ils présentent l'activité la plus élevée.

L'extrait chloroformique et méthanolique ont présenté une activité inhibitrice comparable à celle du BHA, de l'ordre de **23,64%** et **22,17%**, respectivement.

Pour un extrait possédant une grande activité, les résultats obtenus suggèrent que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs (ou espèces réactives), les convertissant en espèces non-réactives plus stable et terminant, ainsi, la réaction en chaîne des radicaux libres (**El haci et al. 2012**).

Le peroxyde d'hydrogène en lui-même n'est pas très réactif, mais il est parfois toxique pour la cellule parce qu'il est à l'origine des radicaux hydroxyles présents dans les cellules. Par conséquent, le retrait de H₂O₂ est très important pour la défense antioxydante dans la cellule. Il a été démontré que les polyphénols ont une action protectrice chez les mammifères et les bactéries contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène, et plus particulièrement avec les flavonoïdes, tels que la quercétine, la catéchine et d'autres polyphénols comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique (**El Haci et al., 2012**).

Puisque l'activité dépend des composés polyphénoliques et de la méthode d'étude de l'activité des antioxydants, des études comparatives pour sélectionner le solvant optimal offrant une activité antioxydante maximale sont nécessaires pour chaque substrat. Des solvants moins polaires tels que l'acétate d'éthyle ont fourni des extraits légèrement plus actifs que des mélanges avec de l'éthanol ou du méthanol, ou du méthanol seul pour les téguments de tamarin selon l'étude menée par **Tsuda, Watanabe** et ces collaborateurs, (**1994**), bien que les extraits à l'éthanol et au méthanol aient également présenté une activité inhibitrice élevée de la peroxydation lipidique, comparable à l' α -tocophérol. Une autre étude vient signalé que l'extraction sélective des composés plus apolaires augmentait l'activité antioxydante des extraits de cosse de lentilles (**Muanza et al., 1998**).

En effet, l'activité antioxydante dépend également du type et de la polarité du solvant d'extraction, des procédures d'isolement, de la pureté des composés actifs, ainsi que du système du test antioxydant. Il a été suggéré que le facteur déterminant de l'activité antioxydante est la nature lipophile des molécules et l'affinité de l'antioxydant pour les lipides.

Le potentiel antioxydant d'un composé est différent selon un test d'évaluation de l'activité antioxydante différent ou, pour le même test lorsque la polarité du milieu diffère, car l'interaction de l'antioxydant avec d'autres composés joue un rôle important dans l'activité. En effet, des différences dramatiques dans le potentiel antioxydant relatif des composés de références ont été observées lorsqu'un composé est fortement antioxydant avec une méthode et prooxydant avec une autre. Un phénomène connu sous le nom de «paradoxe polaire» (*'Polar paradox'*) a été signalé à plusieurs reprises. Les antioxydants hydrophiles sont plus efficaces que les antioxydants lipophiles dans une huile en vrac, alors que les antioxydants lipophiles présentent une plus grande activité dans les émulsions (**Moure et al., 2001**).

La caféine (1, 3,7-triméthyl xanthine), un ingrédient du café, a été étudiée pour son activité antioxydante potentielle contre les dommages oxydatifs des microsomes du foie de rat. Ces dommages ont été provoqués par trois espèces d'oxygène réactif d'importance capitale dans la formation de la membrane.

Dommages in vivo, à savoir radical hydroxyle (OH), radical peroxyde (ROO) et oxygène singulet (O²). Les résultats obtenus ont montré que la caféine était un

inhibiteur efficace de la peroxydation lipidique, à des concentrations millimolaires, contre les trois espèces réactives. Le degré d'inhibition était élevé contre la peroxydation induite par OH, le milieu contre IO 2 et faible contre les ROO. En général, le pouvoir antioxydant de la caféine était similaire à celui du glutathion, un antioxydant biologique établi, et significativement supérieur à celui de l'acide ascorbique. Des études sur les mécanismes possibles impliqués dans l'effet antioxydant observé révèlent que l'extinction de ces espèces réactives par la caféine pourrait être l'un des facteurs possibles responsables.

La parche de café est aussi riche en tanins, qu'en polyphénols (**Pandey et al. 2000**). Les tanins sont définis comme des anti-nutriments d'origine végétale, car ils peuvent précipiter les protéines, inhiber les enzymes digestives et réduire l'utilisation de vitamines et de minéraux. D'autre part, les tanins ont également été considérés comme des composants «bénéfiques pour la santé» dans les aliments et les boissons dérivés de plantes. Par exemple, il a été rapporté que les tanins possèdent des potentiels anticancérogènes et antimutagènes, ainsi que des propriétés antimicrobiennes. Plusieurs études ont rapporté sur les activités antioxydantes et antiradicalaire des tanins(**Amarowicz, 2007**). Les tanins, du à leur masse moléculaire élevée et le haut degré d'hydroxylation de leurs noyaux aromatiques, montrent un potentiel antioxydant très élevé. Leurs actions antioxydantes se manifestent par leurs capacités à piéger les radicaux libres, la chélation des métaux de transition, l'inhibition des enzymes prooxydants ainsi que l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Koleckar et al., 2008**). En plus des polyphénols, tanins et flavonoïdes qu'elle contient, la parche de café contient aussi de la caféine (**Pandey et al., 2000**). Dans certaines publications, la caféine est considérée aussi comme un antioxydant (**Azam et al., 2003; Yashin et al., 2013**).

En effet, la caféine (1, 3,7-triméthyl xanthine), a été étudiée pour son activité antioxydante potentielle contre les dommages oxydatifs des microsomes du foie de rat. Les résultats obtenus ont montré que la caféine était un inhibiteur efficace de la peroxydation lipidique, à des concentrations millimolaires, contre les trois espèces réactives à savoir ; le radical hydroxyle (OH), le radical peroxy (ROO) et l'oxygène singulet. En général, le pouvoir antioxydant de la caféine étant similaire à celui du glutathion, un antioxydant biologique, et significativement supérieur à celui de l'acide ascorbique. Des études sur les mécanismes possibles impliqués dans l'effet antioxydant observé révèlent que la désactivation de ces espèces réactives par la caféine pourrait être l'un des facteurs possibles responsables(**Devasagayam et al., 1996**). Une autre étude vient confirmée l'effet de la caféine qui réduit de manière significative le niveau de TBARS et de diènes conjugués produits à partir de la peroxydation des LDL. L'effet antioxydant de la caféine est équivalent à celui de l'acide ascorbique et celui de l'acide urique(**ChulLee, 2000**).

Rappelons que l'utilisation de divers systèmes expérimentaux a prouvé que les capacités antioxydantes des polyphénols ainsi que les flavonoïdes sont dues à leurs propriétés redox qui se traduisent dans les capacités de donner des électrons et des hydrogènes aux radicaux libres, en plus de leurs potentiels à chélater les ions métalliques pro-oxydants et leurs capacités de protection des systèmes de défenses antioxydants (**Atmani et al., 2009**).

Sachons que les flavonoïdes sont connus par leurs activités antiradicalaire et antioxydante et que les extraits de cette matière résiduelle, qu'est la parche de café,

contient un mélange de ces composés et qui ont donné des résultats satisfaisantes, on peut conclure que les résultats ont prouvé que l'activité antioxydante de ces extraits dépend non seulement du contenu phénolique total mais que les composés phénoliques peuvent agir en synergie, antagonisme ou peuvent indépendamment affecter toute l'activité du mélange (**Iacopini et al., 2008**).

Ceci est en accord avec les conclusions de certains chercheurs qui ont testé l'activité antioxydante de composés phénoliques individuels et ont constaté que les flavan-3-ols possédaient l'activité de piégeage radicalaire la plus élevée, tandis que le mécanisme de l'activité antioxydante dépendait de structures spécifiques, par ex. le nombre de groupes hydroxyle et la présence du groupe $-CH = CH-COOH$. Donc pour mieux comprendre les effets de nos extraits sur les méthodes de détermination de l'activité antioxydante, il serait nécessaire de caractériser les différents composés phénoliques (**HowYee Lai and YauYan Lim, 2011**).

CONCLUSION

La production et la transformation du café génèrent des quantités énormes de déchets liquides et solides résiduels telle que la parche. Cette vaste quantité de résidus englobe la génération annuelle de problèmes agricoles et environnementaux.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'activité antioxydante de quelques extraits de la parche de café afin de valoriser ce résidu comme étant un antioxydant naturel et qui pourra après un traitement adéquat remplacer les antioxydants de synthèse qui envahissent les industries agro-alimentaires et pharmacologiques et qui restent dangereux pour la santé humaine. Cette étude nous a permis d'obtenir des résultats très probants et encourageants qui nous font changer notre manière de penser à l'exploitation positive de ces résidus.

Nous avons dans un premier temps préparé quatre extraits de la parche de café par extraction par pilote, les résultats de cette étude ont démontré que l'extrait acétate d'éthyle a le rendement le plus élevé (**14,96%**). Les extraits méthanolique, butanolique et chloroformique ont présentés des rendements respectives de l'ordre de **11,14%** ; **10,15%** et **9,055%**.

Ainsi le dosage des composés phénolique montre que la meilleur teneur en polyphénols a été obtenu avec l'extrait méthanolique **42,83** mgEAG/g MS suivi par l'extrait butanolique **42,47** mgEAG/g MS et l'extrait acétate d'éthyle **35, 82** mgEAG/g MS, tandis que l'extrait apolaire chloroformique présente la plus faible teneur qui est de l'ordre de **11,59** mgEAG/g MS. De plus, la teneur la plus élevée en flavonoïdes a été obtenu avec l'extrait acétate d'éthyle **0,082** mg EC/g MS suivi par l'extrait chloroformique avec un taux de **0,042** mg EC/g MS, tandis que l'extrait méthanolique et l'extrait butanolique ont présenté une faible teneur de l'ordre de **0,013** mg EC/g MS, **0,0092** mg EC/g MS, respectivement.

L'activité antioxydante des fractions dans le n-butanol été plus élevé que pour les fractions l'acétate d'éthyle.

Le pouvoir réducteur des extraits de la parche de café été plus élevé que celle de l'acide ascorbique et de même pour le piégeage du radical DPPH, les extraits de parche ont montré une bonne activité.

Pour la méthode de décoloration du β -carotène, l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol ont montré une activité supérieure par rapport au BHA ce qui se traduit par une meilleure activité antioxydante.

Concernant la capacité de piéger le peroxyde d'hydrogène, l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol ont montré une activité considérable par rapport au BHA.

De ce fait, et d'après ces résultats très prometteurs, la parche de café peut être utilisée comme une source facilement accessible d'antioxydants naturels et moins coûteuse pour remplacer les antioxydants synthétiques.

Les différents mécanismes antioxydants avec lesquels les extraits de la parche de café on réagit peuvent être attribués à la propriété redox de leurs flavonoïdes, tannins et la caféine qu'ils contiennent et qui jouent un rôle important dans le piégeage, la capture et la destruction des radicaux libres, les hydroperoxydes ainsi que le peroxyde d'hydrogène.

Même si ces composés apparaissent comme étant responsables de cette activité antioxydante, sauf qu'il n'est pas aussi clair de quel composé est dû cette activité. Par conséquent, notre étude reste juste une étape préliminaire qui nécessite d'être améliorée et approfondie. De ce fait, comme perspectives futures, on suggère qu'un travail postérieur doit permettre l'isolation et l'identification du contenu en antioxydants pour ce résidu. En outre, des tests de l'activité antioxydante *in vivo* avec ces différents mécanismes doivent nécessairement être investis pour compléter ce travail.

List of notations and symbols

Onyx : numéro deux mondiale de la gestion des déchets et filiale de Veolia environnement.

O₂⁻ : superoxyde.

OH : le radical hydroxyle.

NO : le monoxyde d'azote.

H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène.

O₂ : oxygène.

RLO : radicaux libres oxygénés.

RL : radicaux libres.

UV : ultra violet.

ADN : acide désoxyribonucléotide.

ERO : espèces réactives oxygénées.

ROS : Reactive oxygen species.

SOD : superoxyde dismutase.

GPx : La glutathion peroxydase.

ROOH : peroxyde d'hydrogène.

GSSG : glutathion-disulfure.

ROO• : Radicaux libres peroxylés.

BHA : butyleHydroxyanisole.

BHT : butylehydroxytoluène.

PG : gallate propylée.

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

FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power.

Fer²⁺ : fer ferreux.

Fer³⁺ : Fer ferrique.

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

FeCl₃: Chlorure de fer.
CHCl₃ : extrait chloroformique.
MeOH : extrait méthanol/eau.
AcOEt : extrait acétate d'éthyle.
BuOt : extrait butanolique.
AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.
IC₅₀ : La concentration d'inhibition de 50% DPPH.
AAR : activité antiradicalaire.
DO : densité optique.
V/V : Volume à Volume.
MS : matière sèche.

REFERENCES

1. Atkins, P.W.: *Physical Chemistry*, 4th edition, Oxford University Press, Oxford, **1990**, 249-252;
2. Karlsson, R., Rydén, L: Ion Exchange Chromatography in: *Protein Purification – Principles, High Resolution Methods, and Applications* (Editors: Janson, J.-C., Rydén, L.), VCH Publishers, New York, **1989**, 26-127;
3. Morais Barros, A.J., Prasad, S., Duarte Leite, V., Gouveia Souza, A.: The Process of Biosorption of Heavy Metals in Bioreactors Loaded with Sanitary Sewage Sludge, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2006**, **23** (2), 153-162;
1. Bharathiraja S., Suriya J., Krishnan M., Manivasagan, P., Kim, S.-K. (2017). Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. *Adv. Food Nutr. Res.*, **80**, 125–148.
2. Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. and Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, **74** 69-80.
3. Kondamudi N., Mohapatra S.K., Misra M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (24), 11757-11760.
4. Mussatto, I. Mussatto, E.M. Machado, S. Martins, and J.A., (2011) Teixeira, "Production, composition, and application of coffee and its industrial residues", *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, pp. 661-672.
5. R. Rathinavelu, and G. Graziosi. (2005). "Potential alternative use of coffee wastes and by-products", ICS-UNIDO Project.
6. Hughes S.R., J.C. López-Núñez, M.A. Jones, B.R. Moser, E.J. Cox, M. Lindquist, L.Á. Galindo-Leva, N.M. Riaño-Herrera, N. Rodriguez- Valencia, F. Gast, D.L. Cedeño, K. Tasaki, R.C. Brown, A. Darzins, and L. Brunner. (2014). "Sustainable conversion of coffee and other crop wastesto biofuels and bioproducts using coupled biochemical and thermo chemical processes in a multi-stage biorefinery concept", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 98, no. 20, pp. 8413-8431.
7. Franca S., and Oliveira L.S. (2009) "Alternative uses for coffee husks - a solid waste from green coffee production", In: *Chemical, Biological and Environmental Engineering*, Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, pp. 21-24.
8. Kovalcik, Adriana, Obruca, Stanislav, Marova, Ivana, Valorization of Spent Coffee Grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing*, P : 104-119.2008
9. Gulçin. (2011). Antioxydant of food constituent: an over view. *Arch toxicol* **86** : 345-391.
10. Moure A, Jose M. Cruz, Daniel Franco, J. Manuel DomoÂnguez , Jorge Sineiro , Herminia DomoÂnguez, MaroÂa JoseÂ NuÂnÂ ez, J. Carlos ParajoÂ (2001). Natural antioxidants from residual sources, **72**: 145-171.
11. Ladoh Yemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo, E., Yinyang, J., Wansi, J.D. (2014). Activité antioxydant des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*. **84**: 7636– 7643.

Amarowicz R. (2007). Tannins: the new natural antioxidants, European Journal of lipid Lipid Science and Technol. 109: 549–551.

Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbach N., Atmani D. (2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food Chemistry*, 112: 303-309.

Atoui A., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxydant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89: 27-36.

Azam S., Hadi N., Khan NU., Hadi SM. (2003). Antioxidant and prooxydant properties of caffeine, theobromine and xanthine. BR325-30

Benammar Amen Allah, Benguerfi Mohammed Wassim. (2018). Extraction solide- liquide sur pilote de graine aromatique, p22.

Bendjabeur Salah. (2012). Evaluations du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *punica granatum L.*) en vue de leur utilisation alimentaire.

Bertoncelj J., Dobersek U., Jamnik M., Golob T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, *Food Chemistry*, 105: 822-828.

Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. et link. *Food Chemistry*, 105, 146-155.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igc R. Phenolic as antioxidants in garlic (*Allium sativum L.*, Alliaceae), *Food Chemistry*, 2008, Vol. 111; pp 925-929.

Bruneton J. (2005). Composés phénoliques, pharmacognosie, phyto-chimie. In: Plantes médicinales. 3e ed, *Tec et doc*, Paris, pp. 233-447

C.F.C (2013). Comité Français du café, <https://collectifcafe.fr>.

Chul Lee. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. vol 295; P: 141-154

quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa Duch.*), *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.

DeGraft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., Nowak, D (2007). Ferric-Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and their Metabolites: Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption, *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*, 100: 345-352.

Devasagayam T.P.A., Kamat J.P., Hari Mohan., Kesavan. (1996). Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. T.P.A. 1282, p: 14-16.

El-Hacil I.A., Atik-BeF., Didi1 A., M. Ghe, M.A. Didi2. (2012). Phytothérapie © SpringeVeFrance DOI 10.1007/s10298-012-0726-x *Article original Pharmacognosie* Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien.

Fernandez de SimoÂ n, B., CadahõÂ a, E., Conde, E., & GarcõÂ a-Vallejo, M. C. (1996). Low molecular weight phenolic compounds in Span- are h oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1507±1511.

HowYee Lai and YauYan Lim. (2011). Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*, Vol. 2

Hubert, J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité: Qualité et sécurité des aliments, p 174.

Iacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589-598.

Iqbal S., Bhangar M.I., Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93(2), 265-272.

Karaozler A., Erdag B., Çalmaz Emek Y. (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407

- Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca Z., Jun D., Jahodar L., Opletal L. (2008). Condense and hydrosoluble tannins as antioxidant influencing the health.
- Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. O. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydant, *Fondamental, OCL*, Vol.14 (5) ; pp 278-292.
- Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J., (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica. Chemical. Acta*, (613): 1-19.
- Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatnmit R.(2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 100: 1409- 1418.
- Marinova E. M., Yanishlieva N.VI. (1997). Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sun-ower oil. *Food Chemistry*, 58, 245±248.
- Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Song Klama Karin J.Sci, Technol*, 26 (2): 211-219.
- Muanza, D., Robert, R. & Sparks, W. (1998). Antioxidant derived, from lentil and its preparation and uses. US Patent. US5762936.
- [
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. Nutr.*44: 307-315.
- Ozsoy N., Can A., Yanardag R., Akev N. (2008) Antioxidant activity of *Smilax excels* L. leaf extracts, *Food Chemistry*, 110, 571-583.
- Ramirez-Martinez J.R. (1988). *Sci. Food Agric.* 43 ; 135–144.
- Rita N., Farit A. (2009). Natural polyphenols as anti-oxydant, anti-inflammatory, antiangiogenic agents in the metabolic syndrome. In *Oxydative Stress, Inflammation and Angogenesis*, Ed Springer Science, Busines Media B.V. Université de Porto: Portugal.147-180.
- Sharififar F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Cheinistry*, 112: 885-888.
- Singh R. P., Chidambara-Murthy K. N., Jayaprakasha G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*punica granatum*) peel and seed extract using *in vitro* models. *J Agric food Chem*, 50(1):81-6.
- Sun J., Blaskovich M.A., Jove, R., Livingston S.K., Coppola D., Sebti S.M. (2005). Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity, *Oncogene*, Vol. 24; pp 3236–3245.
- Tsuda T., Watanabe M., Ohshima, K., Yamamoto A., Kawakishi, S., Osawa T. (1994). Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2671±2674.
- Yashin A., Yashin Y., Wang J.Y., Nemzer B. (2013). Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee p: 230-245

TYPES OF CONTRIBUTIONS ACCEPTED INTO THE JOURNAL

Original scientific works (6 to 16 pages).

Introduction should not exceed 20% of the whole paper. Avoid in this section giving obvious facts, and do not divagate from the subject.

FIGURES

All illustrations (graphs, schemes, diagrams, pictures, etc.) should be named as Figures. Figures should be consecutively numbered in Arab numerals, in the order of appearance. All figures should have a title placed below the figure. Each figure should be mentioned at least once in the text, as shown in Figure 1. Figures should be inscribed in TNR 10 – 12 pts, in such manner that visibility of text can be assured. Place figures as closed as possible to the first citation of it. Grouping figures two in a row (inserted in a table with hidden lines) is recommended (Figures 2 and 3). **Figures drawn directly into the Word document are forbidden.** They should be imported as

images (jpg, bmp, tiff) or as objects (ppt). Only black & white images of high contrast should be used (Fig. 3). In graphs and charts, curves should be identified by using different symbols for points (•, ◊, ○, □, ■, ▲, etc.) and not by line width or color (Figure 2).

Do not place figures into bordered frames. Do not border the graphs, diagrams, illustrations. It is recommended to keep at minimum the number of figures. Before and after each figure enter one 12 pts clear line. The text into the figures should be written in the same language as the body text. It is not allowed that the paper to be written in French, and the text of the figures to be in English.

EQUATIONS

Equations should be written centered on the page, and consecutively numbered in Arab numerals between round brackets at the right margin of the paper. Above and below the equation enter a 3 pts clear line, as observed at eqn. (1):

$$\sum_{i=1}^n \frac{(1+a_i)}{3k \cdot i} + C_1^2 + C_2^3 + \dots + C_j^{j+1} = 0$$

(1)

Equations should be written by using the equation editor included in MS Word program, with the following size of characters: Full = 12 pt; Subscript/Superscript = 7 pt; Sub-subscript/Superscript = 5 pt; Symbol = 18 pt; Sub-symbol = 12 pt. Variables in equations should be in italics.