

Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae)

[Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab. (Myrtaceae)]

Meriem TOUAIBIA¹ and Fatma Zohra CHAOUCH²

¹Département des sciences biologiques. Université SAAD DAHLEB, Algérie

²Département des sciences agronomiques. Université SAAD DAHLEB, Algérie

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Myrtus nivellei* Batt and Trab. is a Sahara-endemic plant belonging to the Myrtaceae family, this plant is very famous in southern Algeria for its therapeutic properties in folk medicine. However, its uses are limited exclusively to the ancestral know-how. In the present work, three extracts were prepared from the leaves of this plant: an ethanolic extract, a methanolic extract and an aqueous extract. The yields of dry crude extracts are respectively 11.12%, 12.45% and 16.5%. The quantitative estimation of flavonoids, flavonols and total phenols by the spectrophotometric method showed that the three extracts contain these compounds. The evaluation of antioxidant capacity by the method of free radical scavenging test showed that all of the extracts have a very good reductive activity, especially for ethanolic extract which presented a percentage of inhibition equal to 78.81% with an EC50 estimated to 0.59 mg/ml. On the other hand, the FRAP test revealed that the methanolic extract has the best reducing power (66.71%) than those of the other extracts, but it remains relatively low compared to the ascorbic acid used as positive control.

KEYWORDS: *Myrtus nivellei* Batt and Trab, flavonoids, flavonols, total phenols, antioxidant activity.

RESUME: *Myrtus nivellei* Batt et Trab. est une plante saharo-endémique, appartenant à la famille des Myrtaceae, Cette plante est très réputée au sud algérien pour ses vertus thérapeutiques en médecine populaire. Cependant, ses usages restent toutefois, exclusivement limités au savoir-faire ancestral. Dans le présent travail trois extraits ont été préparés, à partir des feuilles de cette plante: un extrait éthanolique, un extrait méthanolique et un extrait aqueux. Les rendements en extraits brutes secs sont de l'ordre de 11,12%, 12,45% et 16,5% respectivement. L'estimation quantitative des flavonoïdes, des flavonols et des phénols totaux par la méthode spectrophotométrique a montré que ces trois extraits contiennent ces composés. L'évaluation du pouvoir anti-oxydant par la méthode du piégeage des radicaux libres a montré que les extraits étudiés ont tous une très bonne activité réductrice, surtout pour l'extrait éthanolique ayant présenté un pourcentage d'inhibition égale à 78,81% avec une EC50 égale à 0,59 mg/ml. D'autre part, le test de FRAP a révélé que l'extrait méthanolique a le meilleur pouvoir réducteur (66,71%) par rapport ceux des autres extraits, mais qui reste, toutefois, relativement faible par rapport à celui de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

MOTS-CLEFS: *Myrtus nivellei* Batt et Trab., flavonoïdes, flavonols, phénols totaux, activité anti-oxydante.

1 INTRODUCTION

L'utilisation des anti-oxydants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'anti-oxydants naturels sont recherchées [1]. En effet, les composés phénoliques sont des molécules naturelles très répandus dans le règne végétal. Ces derniers regagnent une importance croissante grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [2]. Leur rôle d'anti-oxydants naturels suscite un très grand intérêt, notamment pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [3]; ils sont également utilisés en tant qu'additifs en industrie agro-alimentaire, en pharmacie et en cosmétologie.

Myrtus nivellei Batt et Trab. est un arbuste de 0,5 à 2 mètres de hauteur, il s'adapte très bien à la sécheresse. Cette plante est une espèce saharo-endémique, restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer, Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar algérien ainsi que les montagnes du Tibesti tchadien, où elle couvre des zones très réduites [4]. Elle apparaît au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [5]. Elle jouit notamment d'une grande faveur populaire au sud de l'Algérie comme remède contre les infections respiratoires, les troubles gastro-intestinaux et les mycoses [6]-[4].

Dans cet article, nous ferons le point sur la composition en polyphénols des extraits de l'espèce *Myrtus nivellei* Batt et Trab., ainsi que leurs éventuels effets anti-oxydants. Des travaux antérieurs sur l'analyse de l'huile essentielle de cette plante ont montré qu'elle possède un excellent pouvoir antimicrobien [7].

Il nous paraissait alors intéressant d'investiguer, pour la première fois, le pouvoir anti-oxydant des extraits alcooliques et aqueux, préparés à partir de cette plante, dans la perspective d'obtenir de nouvelles sources potentielles de nouvelles biomolécules ayant des effets anti-oxydants.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de la plante ont été récoltées sur des pieds adultes, à 146 km du chef lieu de la wilaya de Djanet, cette station est située à 94,8 km au sud de la ville d'Ihrir, faisant partie du parc national du Tassili (tableau1). Le matériel végétal récolté a été séché à température ambiante pendant 2 semaines, à l'abri du soleil, puis réduit en poudre fine qui est soigneusement conservée dans un bocal en verre jusqu'à son utilisation.

Table 1. Coordonnées géographiques du site de récolte.

| Région | Altitude | Latitude | Longitude | Période de récolte | Etage bioclimatique |
|-----------------|----------|-------------|-------------|--------------------|--------------------------------------|
| Tassili n'Ajjer | 2018 m | 24°59' Nord | 8°07' Ouest | 05/2012 | Aride à hiver frais (Sahara central) |

2.2 PRÉPARATION DES EXTRAITS ALCOOLIQUES

La préparation des extraits alcooliques est réalisée par épaulements de la poudre végétale à l'aide d'un solvant, à froid par macération dans l'éthanol [8] et à chaud par Soxhlet avec du méthanol [9]. L'extrait est ensuite stocké à 4°C durant 24h. Après filtration, le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2.3 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT AQUEUX

Elle est basée sur la préparation d'une décoction, en introduisant 10g de la poudre végétale dans 150ml d'eau distillée, le tout est chauffé à reflux pendant 2h. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif [10].

2.4 DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu [11]. Une quantité de 200ml de chaque extrait (1mg/ml) est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5%.

L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent par mg d'extrait sec.

2.5 DOSAGE DES FLAVONOÏDES

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique décrite par Kim et al [12]. Une quantité de 100ml de chaque extrait (1mg/ml) est mélangée avec 0,4ml d'eau distillée et puis avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium NaNO_2 à 5%. Après 5min, 0,02ml d'une solution d' AlCl_3 à 10% est ajouté. On additionne à ce mélange 0,2ml de solution de Na_2CO_3 1M et 0,25ml d'eau distillée après 5 min de repos. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance est mesurée à 510 nm. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent par mg d'extrait sec.

2.6 DOSAGE DES FLAVONOLS

La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de Yermakov et al [13]. On mélange 2 ml de chaque extrait (1mg/ml) avec 2 ml d'une solution d' AlCl_3 (20 g/l) et 6 ml d'une solution d'acétate de sodium (50 g/l). Après 2 heures et demi d'incubation à 20°C, la lecture de l'absorbance est réalisée à 440 nm. Le taux des flavonols est déterminé en microgramme équivalent par milligramme d'extrait sec.

2.7 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-OXYDANTE PAR LE TEST DPPH

Le test anti-oxydant est réalisé avec la méthode au DPPH [14]. 50 μ l de chaque extrait à différentes concentrations (de 0,25 à 1mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μ l de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la lecture de l'absorbance est faite à 515nm contre un blanc. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un anti-oxydant de référence: l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (%) et les valeurs de l'EC50 sont déterminées graphiquement par régression linéaire.

2.8 EVALUATION DU POUVOIR CHELATEUR DU FER FRAP

Le pouvoir réducteur du fer dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu [15]. Un millilitre de chaque extrait (1mg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min, ensuite 2.5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance est réalisée à 700nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, mais en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée, afin de calibrer le spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1601). L'acide ascorbique et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions opératoires.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 TENEURS EN PHÉNOLS TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES

La détermination des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits: méthanolique (MeOH), éthanolique (EtOH) et aqueux de *Myrtus nivellei* a été faite par des dosages spectrophotométriques.

La teneur en phénols totaux pour chaque extrait a été rapportée en μg équivalent/mg d'extrait sec. Les résultats montrent que l'extrait éthanolique a une forte teneur en phénols totaux (734,3 \pm 0,145 μg eq/mg) par rapport à l'extrait aqueux (466,5 \pm 0,569 μg eq/mg) et à l'extrait méthanolique (348,1 \pm 0,809 μg eq/mg).

Les résultats du dosage des flavonoïdes révèlent que ces extraits présentent des teneurs modérées. En se basant sur ces données, on peut déduire que ces derniers représentent 43,74% des phénols totaux de l'extrait méthanolique, et environs 29,05% des phénols totaux de l'extrait aqueux. Ce taux ne dépasse pas 24,66% des phénols totaux de l'extrait éthanolique.

Pour ce qui est des flavonols, l'extrait éthanolique a présenté la plus forte teneur (71,75 \pm 0,456) part rapport aux autres extraits, en représentant 9,77% des phénols totaux de l'extrait éthanolique (Tableau 2).

Table 2. Résultats du rendement et des dosages réalisés sur les extraits de *M nivellei* Batt et Trab.

| Paramètre | Etalon sélectionné | Longueur d'onde (nm) | Taux (µg eq/mg)* | | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | | Extrait aqueux | Extrait MeOH | Extrait EtOH |
| Phenols totaux | Acide gallique | 765 | 466,5±0,569 | 348,1±0,809 | 734,3±0,145 |
| Flavonoïdes | Quercetine | 510 | 135,5±0,256 | 152,25±0,485 | 181,1±0,073 |
| Flavonols | Rutine | 440 | 40,485±0,654 | 38,5±0,457 | 71,75±0,456 |
| Rendement des extraits | | | 16,5% | 12,45% | 11,12% |

*Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± écart type

3.2 RÉSULTATS DU TEST DPPH

L'activité anti-oxydante des extraits étudiés et de l'acide ascorbique (contrôle positif) vis-à-vis du radical DPPH, à été évaluée en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH[•]) à la couleur jaune (DPPH-H), mesurable au spectrophotomètre à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires [10]. Les valeurs EC50 déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait anti-oxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH en dissolution dans du méthanol. Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire à été calculé nommé "ARP" qui est égale à 1/EC50 (Tableau 3).

Table 3. Effet anti-oxydant des trois extraits de *M nivellei* Batt et Trab.

| Extraits étudiés | % d'inhibition | EC ₅₀ (mg/ml) | PAR |
|-----------------------|----------------|--------------------------|------|
| Extrait aqueux | 74,08 | 0,71±0,115 | 1.41 |
| Extrait MeOH | 52,00 | 0,98±0,256 | 1,02 |
| Extrait EtOH | 78,81 | 0,59±0,052 | 1,69 |
| Acide ascorbique (Cp) | 86.62 | 0.39±0,754 | 2.56 |

Selon les résultats enregistrés, l'extrait éthanolique est doté d'un bon pouvoir anti-oxydant (EC50=0,59mg/ml), meilleur que celui exprimé par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique, mais reste d'une efficacité moindre par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif (fig 1, fig 2, fig 3 et fig 4).

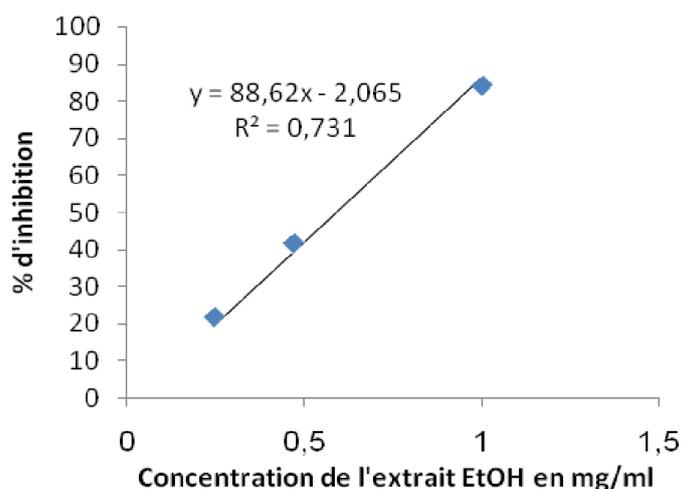


Fig. 1. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique

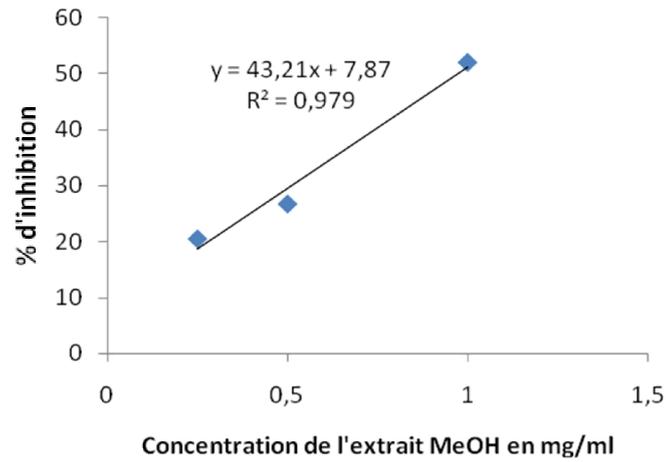


Fig. 2. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique

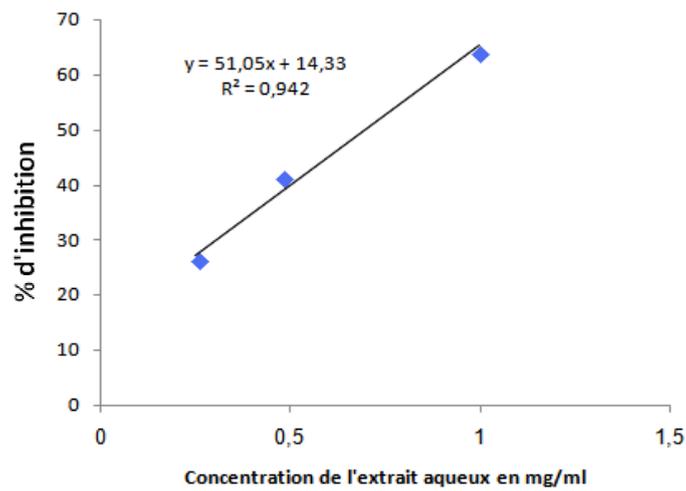


Fig. 3. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux

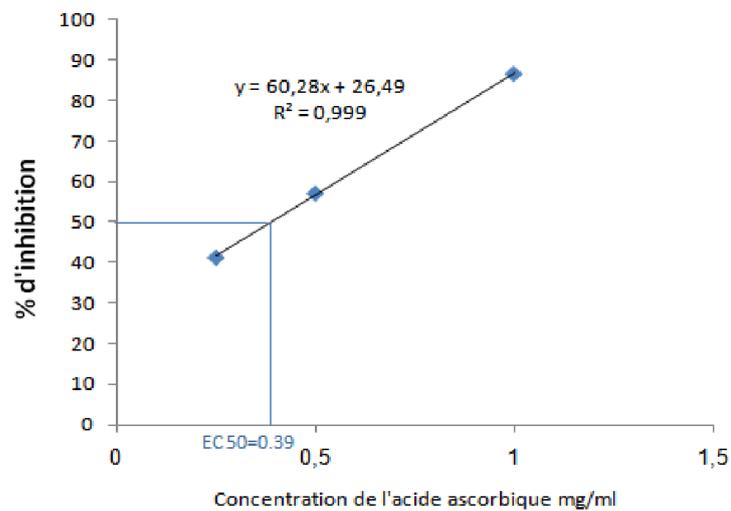


Fig. 4. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique

Il a été démontré que les molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le radical DPPH à cause de leur capacité à céder l'hydrogène [16]. La richesse de l'extrait éthanolique en composés phénoliques témoigne de son remarquable effet anti-oxydant enregistré.

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [17]. L'EC50 de l'espèce *Myrtus communis* L., rapportée par les travaux de Gardeli et al. [18], est comprise entre 0,0095 et 0,017mg/ml, ces mêmes auteurs ont également démontré que les extraits de *M communis* L. récoltés en période estivale sont les plus anti-oxydants.

3.3 RÉSULTATS DU TEST FRAP

L'étude du pouvoir réducteur des ions Fe^{3+} est évalué par le test FRAP, qui est largement applicable aussi bien sur les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [19].

Le pourcentage de chélation des ions Fe^{2+} exercé par l'acide ascorbique est égal à 43,22%. Ce dernier est dix fois plus important, que celui de la quercétine n'ayant exprimé que 4,98% (tableau 4).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *M nivellei* présente le meilleur pouvoir chélateur estimé à 64,8577%, largement supérieur à celui exprimé par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique ainsi qu'à celui des contrôles positifs (Cp).

D'après les travaux de Gardeli et al. [18], l'extrait méthanolique de *M communis* L. exerce un important effet chélateur en pourcentage de réduction des ions Fe^{2+} estimé entre 63,4 \pm 0,4 et 70,2 \pm 2,3 mmol Fe^{2+} /l, il a aussi confirmé qu'il varie significativement selon les saisons.

Les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont, en général, directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante récoltée [20].

Table 4. Effet réducteur des extraits de *M nivellei* Batt et Trab.

| | Contrôles positifs (Cp) | | Extrait EtOH | Extrait MeOH | Extrait aqueux |
|--------|-------------------------|------------|--------------|--------------|----------------|
| | Acide ascorbique | Quercétine | | | |
| % FRAP | 43,22 | 4,98 | 64,8577 | 3.309 | 35.1422 |

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm [21].

En d'autre terme, le complexe réactionnel $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ facilite la détermination "semi-quantitative" de la concentration des composés phénoliques qui participent à la réaction rédox [22]

On suggère que Le pouvoir réducteur des extraits de l'espèce *Myrtus nivellei* Batt et Trab. est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui jouent le rôle de donneurs d'électrons. Par conséquent, on peut les qualifier comme des réducteurs et inactivateurs des radicaux libres. Plusieurs travaux ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut être considéré comme un indicateur de son potentiel effet anti-oxydant [23, 24]

4 CONCLUSION

L'étude de l'activité anti-oxydante des extraits issus de l'espèce *Myrtus nivellei* Batt et Trab. selon la méthode de la réduction du fer et celle du piégeage du radical libre DPPH a montré que les extraits éthanolique, méthanolique et aqueux possèdent une activité anti-oxydante intéressante. Ces extraits pourraient ainsi constituer une alternative à certains additifs de synthèse, bien que cette activité reste, néanmoins, nettement inférieure à celle exprimée par l'acide ascorbique.

Cependant, ces extraits sont constitués d'un mélange de plusieurs composés de nature chimique différente. Il est ainsi très probable qu'ils contiennent des molécules susceptibles d'avoir des propriétés anti-oxydantes similaires à celle de la l'acide ascorbique, ce qui ouvre de larges perspectives pour établir des études plus approfondies afin de les isoler et les identifier.

REFERENCES

- [1] M.B. Tadhani, V.H. Patel et R. Subhash. "In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus". Journal of Food Composition and Analysis, vol 20, pp. 323-329, 2007.
- [2] C. Koechlin-Ramonatxo. "Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases". Nutrition Clinique et Métabolique, vol 20, pp. 165-177, 2006.
- [3] D.I. Vârban, M. Duda, R. Vârban, et S. Muntean. "Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture". Bulletin UASVM Agriculture, vol 66, no. 2, pp. 225-229, 2009.
- [4] P. Ozenda. "Flore du Sahara". Edition CNRS. Paris, 1977.
- [5] M. Maka. "Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili". Phytotherapia, vol 2, pp:191-197, 2004.
- [6] V. Hammiche et K. Maiza. "Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer". Journal of Ethnopharmacology, vol 105, pp. 358-367, 2006.
- [7] M. Touaibia. Contribution à l'étude de deux plantes médicinales : *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenues *in situ* et *in vitro*. Mémoire de magister. Université SAAD DAHLEB. Algérie, 2011.
- [8] M.N. Diarra. "Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*". Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali, 2003.
- [9] B. J. William. "The original of the soxhlet extractor". Journal of chemical education, vol 84, pp.1913-1915, 2007.
- [10] L. Majhenic, M.S. Kerget et Z. Knez. "Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts". Food Chemistry, vol 104, pp.1258-1268, 2007.
- [11] V.L. Singleton et J.A. Rossi. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents". American Journal of Technology and Viticulture, vol 16, pp.144-153, 1965.
- [12] D.O. Kim, O.K. Chun, Y. J. Kim, H.Y. Moon et C.Y. Lee. "Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums". Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol 51, no. 22, pp.6509-6515, 2003
- [13] A.I.Yermakov, V.V. Arasimov et N.P. Yarosh. "Methods of biochemical analysis of plants". Agropromizdat. Leningrad, 1987. In: G. Miliuskasa, P.R. Venskutonis et T.A. Van Beek. "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts". Food chemistry, vol 85. pp.231-237, 2004.
- [14] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, et F. Saura-calixto. "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols" Journal Science Technology International, vol 8, pp.121-137, 1998.
- [15] M. Oyaizu, "Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine". Japanese Journal of Nutrition, vol44, pp.307-315, 1986.
- [16] H.L. De Pooter et N. Schamp. "Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species". In : Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin, 1986
- [17] S. Burda et W. Oleszek. "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids". Food chemistry, vol 49, pp. 2774-2779. 2001.
- [18] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris et M. Komaltis. "Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts". Food chemistry. Vol 107, pp. 1120-1130, 2008
- [19] H.B. Li, C.C. Wong, K.W. Cheng et C. Feng. "Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants". Lebensmittel- Wissenschaft and Technology. Vol 41, no. 3, pp. 385-390, 2008.
- [20] V. Yeşilyurt, B. Halfon, M. Öwtürk et G. Topçu. "Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*" Food chemistry. Vol 108. pp31-39, 2008.
- [21] Y.C. Chung, C.T. Chang, W.W. Chao, C.F. Lin, et S.T. Chou. "Antioxidative activity and safety of the ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1". Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 50, pp.2454-2458, 2002.
- [22] R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, et J.A. Weil. "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies". Food Chemistry, vol 84, pp.551-562, 2004.
- [23] S.M. Jeong, S.Y. Kim, D.R. Kim, S.C. Jo, K.C. Nam, D.U. Ahn, et S.C. Lee. "Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels". Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol 52, pp.3389-3393, 2004
- [24] A. Kumaran et R.J. Karunakaran. "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India". Lebensmittel-Wissenschaft and Technology, vol 40, pp.344-352, 2007.