

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Ecole Nationale Polytechnique**  
**Département de Génie Chimique**



**Mémoire de Master**

Présenté par M<sup>lle</sup> DJEDIAT Hadjer

**Thème**

**Evaluation du potentiel anti-radicalaire des  
antioxydants hydrosolubles du  
*Rosmarinus officinalis* L. obtenus par  
différents procédés**

Soutenu le 17 Juin 2014 devant la commission d'examen :

M. T. AHMED ZAID	Professeur à l'ENP	Président
M <sup>me</sup> S. CHARCHARI	Professeur à l'ENP	Rapporteur
M. E-H. BENYOUSSEF	Professeur à l'ENP	Examineur
M <sup>me</sup> F. KIES	Docteur à l'ENP	Examinatrice

**Promotion : Juin 2014**

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »*

*Sadra Boudjema – Ordre du grand vol.*

*Etudier, c'est comme ramer à contre-courant.*

*Si vous n'avancez pas vous reculez.*

*Proverbe chinois.*

# *Dédicaces*

*A mes parents, Papa et Maman,*

*Pour leur amour, leurs sacrifices et leur soutien, que dieu les  
préserve.*

*A mes deux chers frères, Islem et Adel.*

*A ma belle-sœur, Feriel.*

*A toi, Amine.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Je dédie cet humble travail en signe d'affection et de  
reconnaissance.*

*Hadjer*

# Remerciements

*Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon Dieu pour m'avoir donné l'esprit et les moyennes pour arriver à ce stade de connaissance. Je prie pour que je reste fidèle à lui.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame S. CHARCHARI, Professeur au département du Génie Chimique à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour la confiance qu'elle m'a témoignée et de m'avoir orientée vers ce champs de recherche. Il m'est particulièrement agréable de lui adresser mes vifs remerciements pour son aide précieuse, sa compétence scientifique, ses conseils, ses encouragements et son suivi attentif.*

*Je tiens à remercier Monsieur T. AHMED ZAÏD, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury d'évaluation de mon travail.*

*Que Monsieur E-H. BENYOUSSEF, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger et Madame F. KIES, Docteur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de jury de ma soutenance. Aussi je leur suis reconnaissante de m'avoir accordé de leurs temps.*

*Je tiens par ailleurs, à remercier, ceux qui par leur affection et leur amour, ont su d'une manière ou d'une autre, me guider dans toutes les circonstances de la vie, et m'aider à chaque nouvelle entreprise, en l'occurrence, mes chers parents, papa et maman, qui du fond de leur nid protecteur, n'ont ménagé aucun effort pour me soutenir et m'épauler dans cette ardente démarche qui est la mienne, sans oublier mes deux formidables frères, Islem et Adel, qui ont été toujours à mes côtés durant tout mon parcours.*

*Ma gratitude va également à tous mes ami(e)s qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, particulièrement Asma, Djidji, Mira, Soussou, Sidou, Moncef, Zahir et vivement une personne que j'apprécie beaucoup, Amine.*

*Je souhaite adresser mes remerciements au personnel du laboratoire des analyses chromatographiques et à Madame R. Benoughlis, technicienne au Département de Génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique.*

*Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leur adresse mes remerciements les plus sincères.*

## تقييم القدرة المضادة للأكسدة لمضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء لنبته إكليل الجبل المتحصل عليها بأساليب مختلفة

**ملخص:** يتضمن هذا العمل تحديد كمية المركبات الفينولية، بالاعتماد على طريقة معايرة فولين دوني، في المستخلصات المائية المتحصل عليها من عملية الاستخلاص صلب سائل ذو حشوة مفرقة، وفي المياه التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير ببخار الماء، من نبتة إكليل الجبل. تم، من ناحية، دراسة تأثير المعالجة المسبقة للمادة النباتية، قبل عمليتي الاستخراج والتقطير ببخار الماء. من ناحية أخرى، تم إجراء تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستخدام طريقة محاصرة الجذور الحرة، لكل من مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء والزيت الأساسية. القدرة المضادة للأكسدة لمياه التقطير تفوقت على تلك التي تملكها المستخلصات المائية، مما يؤدي إلى تعزيز هذا المنتج الثانوي لعملية استخلاص الزيوت الأساسية.

**كلمات البحث:** نبتة إكليل الجبل، استخلاص صلب - سائل، التقطير ببخار الماء، مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، البوليفينول، زيوت أساسية.

## Evaluation du potentiel anti-radicalaire des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. obtenus par différents procédés

**Résumé :** Ce travail porte sur la quantification, par la méthode de dosage de Folin-Denis, des composés phénoliques dans les extraits aqueux, obtenus par extraction solide-liquide en charge dispersée, et dans les eaux, issues de l'hydrodistillation, de *Rosmarinus officinalis* L. L'influence du prétraitement de la matière végétale, préalable à l'extraction et à l'hydrodistillation a été étudiée. D'autre part, une évaluation du potentiel anti-radicalaire des antioxydants hydrosolubles et des huiles essentielles a été réalisée, en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Le potentiel anti-radicalaire des eaux de distillation, s'est révélé supérieur à celui des extraits aqueux et ouvre la voie de la valorisation de ce sous-produit de l'extraction des huiles essentielles.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis* L., extraction solide-liquide, hydrodistillation, antioxydants hydrosolubles, composés phénoliques, huile essentielle.

## Evaluation of the antiradical potential of *Rosmarinus officinalis* L. water soluble antioxidants obtained by different methods

**Abstract:** This work focuses on the quantification, by the Folin-Denis assay, of phenolic compounds in aqueous extracts obtained by dispersed charge solid-liquid extraction, and in the water distillate from the hydrodistillation, of *Rosmarinus officinalis* L. The effect of the pretreatment of the plant material, prior to extraction and hydrodistillation was studied. On the other hand, an evaluation of antiradical potential of water-soluble antioxidants and essential oils was performed by using the method of DPPH free radical scavenging. The antiradical potential of water distillate, was superior to that of aqueous extracts and opens the way for the valorization of this by-product of the essential oils extraction.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis* L., solid-liquid extraction, hydrodistillation, water soluble antioxidants, phenolic compounds, essential oil.

## Tables de matières

Table des matières.....	V
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Introduction.....	1

### Chapitre I. Etude bibliographique

<b>I.1. La matière végétale : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</b> .....	3
I.1.1. Description.....	3
I.1.2. Composition chimique.....	4
<b>I.2. Les antioxydants</b> .....	7
I.2.1. Définition d'un radical libre .....	7
I.2.2. Définition d'un antioxydant.....	7
I.2.3. Le mécanisme d'action des antioxydants .....	7
I.2.4. Les antioxydants du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	7
<b>I.3. Procédés de récupération des antioxydants hydrosolubles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</b> .....	8
I.3.1. Extraction solide-liquide.....	8
I.3.1.1. Mécanisme de l'extraction solide-liquide .....	9
I.3.1.2. Les méthodes d'extraction solide-liquide .....	9
I.3.1.3. Technologies des extracteurs solide-liquide .....	9
I.3.2. Hydrodistillation.....	10
I.3.2.1. Principe.....	10
I.3.2.2. Paramètres du procédé de l'hydrodistillation.....	11
I.3.2.3. Mécanisme .....	12
I.3.2.4. Hydrodistillation en présence de tensioactifs.....	13

### Chapitre II. Matériels et méthodes

<b>II.1. Matière végétale utilisée</b> .....	15
<b>II.2. Extraction des antioxydants hydrosolubles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</b> .....	15
II.2.1. Dispositif expérimental.....	15
II.2.2. Protocole expérimental.....	16
<b>II.3. Hydrodistillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</b> .....	17
II.3.1. Dispositif expérimental de l'hydrodistillation.....	17

II.3.2. Protocole expérimental.....	18
<b>II.4. Mesure du pH.....</b>	<b>19</b>
<b>II.5. Dosage des composés phénoliques.....</b>	<b>20</b>
II.5.1. Principe de la méthode de Folin-Denis.....	20
II.5.2. Protocole expérimental.....	20
<b>II.6. Evaluation des propriétés anti-oxydantes des extraits.....</b>	<b>21</b>
II.6.1. Protocole expérimental.....	21
II.6.2. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	21
II.6.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC <sub>50</sub> .....	22
II.6.4. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire.....	22
II.6.5. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire.....	23
<b>II.7. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) de l'huile essentielle.....</b>	<b>24</b>
<b>II.8. Réactifs utilisés.....</b>	<b>25</b>

## Chapitre II. Matériels et méthodes

<b>III.1. Influence du prétraitement de la matière végétale sur le rendement en extrait sec des extraits aqueux et des eaux de distillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>26</b>
<b>III.2. Influence du prétraitement de la matière végétale sur la teneur en composés phénoliques des extraits aqueux et des eaux de distillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>27</b>
<b>III.3. Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits aqueux et des eaux de distillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>28</b>
III.3.1. Détermination de la concentration IC <sub>50</sub> .....	28
III.3.2. Détermination de l'indice d'activité antiradicalaire.....	30
III.3.3. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire.....	31
<b>III.4. Influence du prétraitement de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>33</b>
<b>III.5. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Webographie</b>	

## Listes des figures

<b>Figure I. 1 :</b> Vue d'ensemble du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	3
<b>Figure I. 2 :</b> Trichomes peltés et capités du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	5
<b>Figure II. 1 :</b> Dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide .....	16
<b>Figure II. 2 :</b> Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire .....	17
<b>Figure III. 1 :</b> Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé 29	
<b>Figure III. 2 :</b> Localisation des solubilisâts dans la micelle.....	33
<b>Figure III. 3 :</b> Chromatogramme type de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	36

## Liste des tableaux

<b>Tableau I. 1 :</b> Chémotypes de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	4
<b>Tableau III. 1 :</b> Rendement en extrait sec, en %, des extraits aqueux et des eaux de distillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L., sans et avec prétraitement de la plante.....	26
<b>Tableau III. 2 :</b> Teneur en composés phénoliques des extraits aqueux et des eaux de distillation du <i>Rosmarinus officinalis</i> L., sans et avec prétraitement de la plante.....	27
<b>Tableau III. 3 :</b> Valeurs des pourcentages d'inhibition pour des concentrations différentes des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	29
<b>Tableau III. 4 :</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> et des indices d'activité antiradicalaire, IAA, des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	30
<b>Tableau III. 5 :</b> Valeurs des CE <sub>50</sub> , t <sub>CE50</sub> et IEAR. 10 <sup>-3</sup> des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	31
<b>Tableau III. 6 :</b> Rendement en huile essentielle, R <sub>HE</sub> en %, obtenus lors de l'hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	34
<b>Tableau III. 7 :</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> , IAA, CE <sub>50</sub> , t <sub>CE50</sub> et IEAR des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., sans et avec prétraitement de la matière végétale .....	35
<b>Tableau III. 8 :</b> Teneurs relatives, en %, des constituants majoritaires des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenues avec et sans prétraitement de la matière végétale.....	36
<b>Tableau III. 9 :</b> Teneurs relatives, %, des classes chimiques des composés présents dans les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenues avec et sans prétraitement de la matière végétale.....	37

# **Introduction**

## Introduction

L'utilisation des molécules anti-oxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées.

En effet, les polyphénols, des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, ont une importance croissante, notamment, grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires. Ils sont, également, utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des différentes sources, telles que les cultures agricoles et horticoles ou les plantes médicinales.

Le fort pouvoir antioxydant et antimicrobien des plantes de la famille des Lamiacées, à laquelle appartient le *Rosmarinus officinalis* L., a fait d'elle l'une des familles botaniques les plus fréquemment utilisées au niveau mondial. Le romarin représente, donc, une source inépuisable de substances, ayant des activités anti-oxydantes et biologiques très variées et dont la connaissance constituerait une raison de plus pour la préservation et la valorisation de cette richesse naturelle, par l'extraction des produits à haute valeur ajoutée qu'elle contient, en utilisant des procédés de plus en plus performants.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés, d'une part, de quantifier les composés phénoliques contenus dans les extraits aqueux obtenus par extraction solide-liquide, et dans les eaux, issues de l'hydrodistillation, en présence et en l'absence de tensioactif, de *Rosmarinus officinalis* L., et, d'autre part, d'évaluer le potentiel antioxydant, en particulier, celui des eaux de distillation, sous-produit de l'extraction des huiles essentielles, en vue de leur valorisation.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique relative à la matière végétale, objet de cette étude, au principe, mécanisme et à la théorie des procédés d'extraction solide-liquide et de l'hydrodistillation, aux antioxydants, en général, et ceux du *Rosmarinus officinalis* L., en particulier.

## **Introduction**

La préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de ses antioxydants hydrosolubles, l'installation d'extraction, la démarche expérimentale adoptée, ainsi que les différentes méthodes d'analyse, les réactifs et les outils utilisés, font l'objet du second chapitre.

Le troisième et dernier chapitre, quant à lui, regroupe les résultats du dosage des composés phénoliques des extraits aqueux et des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L., et ceux de l'évaluation de leur pouvoir antioxydant. Les résultats relatifs aux rendements et la composition chimique des huiles essentielles, déterminée par CPG, ainsi qu'à leurs potentiels antioxydants y sont également présentés.

**Chapitre I**  
**Etude bibliographique**

## **I.1. La matière végétale : *Rosmarinus officinalis* L.**

### **I.1.1. Description**

Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., plante commune à l'état sauvage ou cultivée, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante.

Cette plante de la famille des *Lamiacées* est un arbrisseau, vivace, aromatique, toujours vert de 50 cm à 1,5 voire 2 mètres de haut aux branches couvertes d'une écorce écailleuse et fissurée portant des tiges ligneuses feuillées (Figure I.1).



**Figure I. 1 :** Vue d'ensemble du *Rosmarinus officinalis* L.

Les petites feuilles coriaces sessiles persistantes, de couleur verte sombre dessus et blanchâtres dessous, sont étroitement lancéolées (presque comme des aiguilles) et à bords enroulés (Donadieu, 2008), peuvent se récolter en toute saison (Site web [1]). La floraison du romarin a lieu, en général, deux fois par an, la première au mois de Février (parfois en Janvier) jusqu'en Avril voire Mai, et la seconde en automne (Paume, 2008 ; Site web [2]). Cependant, il peut arriver de le voir fleurir en toute période lorsqu'il se trouve en situation optimale (Escuder, 2007).

### I.1.2. Composition chimique

*Rosmarinus officinalis* L. contient des nombreux produits possédant des activités biologiques, tels, l'huile essentielle, des acides phénoliques, des diterpènes phénoliques, des flavonoïdes, des triterpènes, des stéroïdes, etc.

#### ▪ L'huile essentielle

L'huile essentielle, représentant 1 à 2,5% de la plante, est composée essentiellement de monoterpènes et leurs dérivés oxygénés. Sa composition chimique qualitative est relativement constante, mais les différences de teneurs des constituants majoritaires ont donné lieu à la définition de quatre chémotypes : à camphre, à 1,8-cinéole, à myrcène et à verbénone (Raskin, 2003).

Le Tableau I.1 suivant regroupe les principaux constituants des huiles essentielles du romarin appartenant aux différents chymotypes.

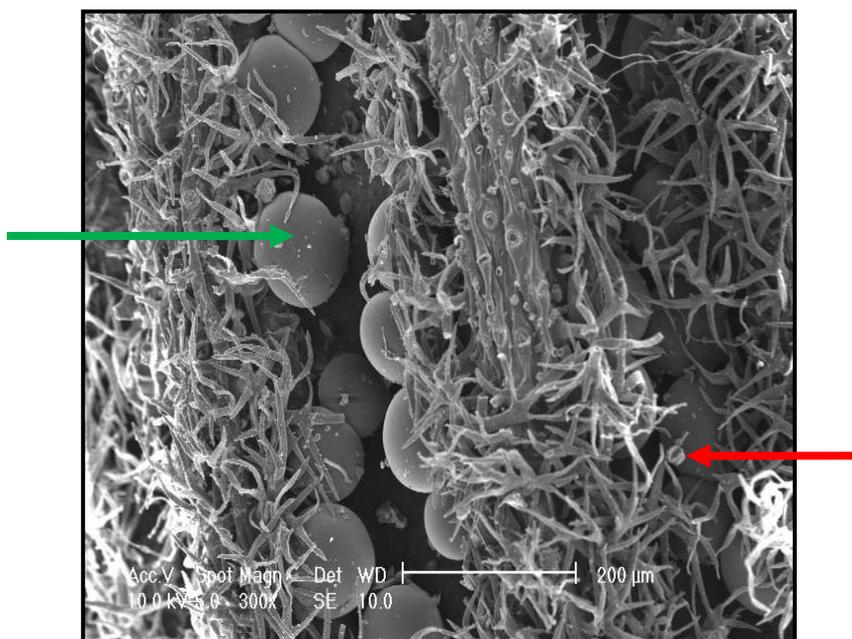
**Tableau I. 1 :** Chémotypes de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Chémotypes	Teneur en %					
	Camphre (Alaux, 2006)	1,8-cinéol (Alaux, 2005)	Verbénone (Site Web [2])	Myrcène (Mateus et <i>al.</i> , 2006)	ALGERIE	
					1,8-cinéol Boutekedjiret (1999)	Camphre Abdelli (2010)
<b>1,8-cinéol</b>	19,1	44,5	8,1	14,9	31,9	-
<b>Camphre</b>	18,7	10,1	14,5	14,4	19,7	15,2
<b>Verbénone</b>	5,6	1,1	1,7	31,5	t*	1,0
<b>Myrcène</b>	0,5	0,2	10,8	1,4	-	1,5

t\* : traces

L'huile essentielle est une sécrétion issue du métabolisme secondaire de l'organisme végétal, produite par des cellules sécrétrices et stockée dans des sites exogènes (trichomes), endogènes (canaux, poches...) ou dans l'espace intercellulaire.

La structure sécrétrice du *Rosmarinus officinalis* L. est exclusivement exogène : l'huile essentielle est produite et stockée dans deux types de trichomes glandulaires, en l'occurrence, les trichomes peltés et les trichomes capités, présentés sur la Figure I.2 (Spiro et Chen, 1994).



**Figure I. 2 :** Trichomes peltés ( → ) et capités ( → ) de *Rosmarinus officinalis* L.  
(Farhat, 2010)

Les trichomes renferment les cellules sécrétrices qui produisent l'huile essentielle, la déversent sous la cuticule du trichome et la font gonfler.

▪ **Les acides phénoliques**

La teneur en acides phénoliques du romarin est estimée à 3,5%. Les acides cinnamique rosmarinique, caféique, ferulique, chlorogénique et vanillique sont des acides phénoliques identifiés dans les extraits du romarin (Cuvelier et *al.*, 1996). Ils appartiennent aux deux principaux groupes: acides hydroxy-benzoïques et acides hydroxy-cinnamiques. D'après Cuppett et *al.* (1997), les dérivés de l'acide cinnamique sont plus actifs que les dérivés de l'acide benzoïque en tant qu'antioxydants. La présence de différents substituants dans le cycle aromatique du phénol modifie leurs propriétés anti-oxydantes, en particulier, leur capacité de donneur d'hydrogène. En général, le phénol non substitué est inactif en tant que donneur d'hydrogène et un monophénol est un antioxydant moins puissant qu'un polyphénol. La présence d'un groupement donneur d'électrons, tel que le groupement hydroxyle en position ortho ou/et para augmente l'activité anti-oxydante du phénol ou de l'acide phénolique (Chimi et *al.*, 1991; Pokorny, 1988). En outre, la présence d'un groupement carboxyle, ester ou lactone renforce l'activité anti-oxydante. Cette dernière augmente, également, lorsque le

groupe carboxyle fait partie de la chaîne latérale du noyau aromatique. La présence des groupements méthoxy au voisinage des hydroxyles phénoliques améliore l'activité anti-oxydante (Dziedzic et Hudson, 1984).

▪ **Les diterpènes phénoliques**

Plus de douze diterpènes phénoliques sont isolés et identifiés dans le romarin (Cuvelier et *al.*, 1996). Les plus répandus sont l'acide carnosique, le carnosol, le 1,2-acide méthoxy carnosique, le rosmanol, l'épirosmanol (Paris et *al.*, 1993; Schwarz et Ternes, 1992; Culvier et *al.*, 1996 ; Naktani et *al.*, 1983 ; Naktani et Inatani, 1984 ; Haraguchi et *al.*, 1995 ; Chen et *al.*, 1992 ; Richheimer et *al.*, 1996). Ils sont responsables de l'activité anti-oxydante de la plante.

L'acide carnosique est le constituant majoritaire parmi les diterpènes phénoliques et son pouvoir antioxydant est le plus puissant. Sa teneur dans les feuilles sèches de la plante dépasse 0,35 %. (Paris et *al.*, 1993; Schwarz et Ternes, 1992; Cuvelier et *al.*, 1996 ; Richheimer et *al.*, 1996).

▪ **Les flavonoïdes**

Certains flavonoïdes se trouvent, dans le romarin, sous forme d'aglycones des hétérosides de la lutéoline, de la diosmétine ou des flavones méthoxylées: genkwanine et dérivés, crisimaritine, scutellaréine, hespéridine et homoplantiginine.

▪ **Les triterpènes et les stéroïdes**

L'acide oléanolique, les dérivés de l'acide ursolique et  $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrine, appartenant à ces deux classes chimiques, ont été identifiés dans les extraits de romarin.

- **Les lipides**, en particulier, les phospholipides, contenus dans la cuticule cireuse de jeunes feuilles.
- **Autres constituants** : n-alcanes, iso-alcanes et alcènes, polysaccharides acides et traces de salicylates.

## **I.2. Les antioxydants**

L'oxygène moléculaire est indispensable à la vie des organismes aérobiques. Toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO).

### **I.2.1. Définition d'un radical libre**

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron célibataire (ou non apparié), ce qui le rend extrêmement réactif (Gutteridge et Halliwell, 1994).

Les radicaux libres apparaissent, soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radicalaire (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

### **I.2.2. Définition d'un antioxydant**

Un antioxydant est défini comme étant toute substance présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable et qui est capable de ralentir ou d'inhiber le processus d'oxydation de ce substrat (Favier, 2003). Il permet aussi de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ERO.

### **I.2.3. Le mécanisme d'action des antioxydants**

Lorsque l'on parle d'activité anti-oxydante, on distingue deux types d'action. La première consiste à capter directement les radicaux libres. En effet, les antioxydants neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. La seconde comprend l'inhibition des enzymes responsables de la génération des espèces oxygénées réactives: les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Ribeiro et *al.*, 2001).

### **I.2.4. Les antioxydants du *Rosmarinus officinalis* L.**

Divers extraits d'herbes pouvant être utilisées en tant qu'antioxydant naturel sont à l'étude à l'heure actuelle. Parmi ces extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement figurent les extraits des herbes de *Lamiaceae* qui contiennent des

niveaux élevés des antioxydants diététiques (Zheng et Wang, 2001 ; Dragland et *al.*, 2003 ; Shan et *al.*, 2005 ; Halvorsen et *al.*, 2006), et le pouvoir antioxydant in vitro de ces herbes a été indiqué dans de nombreuses études (Exarchou et *al.*, 2002 ; Pizzale et *al.*, 2002 ; Dorman et *al.*, 2004).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) appartenant à cette famille, possède une activité anti-oxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (Vareltzis et *al.*, 1997). On dit que ses extraits sont très efficaces pour retarder l'oxydation des lipides et pour protéger les cellules vivantes des dommages causés par le stress oxydatif (Chen et *al.*, 1992 ; Wang et *al.*, 1995).

Les diterpènes phénoliques et les acides phénoliques comptent parmi les antioxydants hydrosolubles identifiés dans le romarin (Bounoua et Boumahdi, 2013).

### **I.3. Procédés de récupération des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.**

Divers procédés sont actuellement utilisés pour l'extraction des produits d'origine végétale et, selon la technique utilisée, l'extraction permet d'obtenir des huiles essentielles, des pommades, des concrètes, des absolues, des résinoïdes ou des infusions.

Plusieurs procédés d'extraction sont utilisés de longue date, toutefois les normes liées à l'utilisation industrielle des extraits limitent en général le choix du procédé.

La localisation histologique des composés aromatiques dans le végétal peut aussi orienter le choix technologique.

#### **I.3.1. Extraction solide-liquide**

L'extraction solide-liquide, encore appelée extraction par solvant, est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer ou de dissoudre, par immersion dans un liquide ou par arrosage par un liquide, un ou plusieurs composants (solides ou liquides) contenus dans le solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire) et une phase liquide (le solvant d'extraction). Les constituants recherchés peuvent être soit le soluté, soit le résidu (Leybroos et Fremeaux, 1990).

### **I.3.1.1. Mécanisme de l'extraction solide-liquide**

Dans le cas typique de l'extraction des matières végétales, le soluté est localisé dans des cellules végétales à parois relativement peu perméables. L'extraction de ces matières par solvants, est un processus assez complexe, basé sur le phénomène de transfert de matière.

Ce processus peut être résumé en quatre étapes (Trambouz et Wauquier, 1975) :

- Pénétration du solvant dans le solide.
- Dissolution du soluté dans le solvant.
- Transfert de la solution obtenue vers l'interface solide-liquide.
- Diffusion du soluté contenu dans la solution au contact du solide vers la masse restante du solvant.

L'extraction par solvant peut être influencée par plusieurs facteurs (Trambouz et Wauquier, 1975) : la nature et l'état du solide et du soluté, le taux de l'humidité du solide, la température, l'agitation du fluide et la durée d'extraction.

Les solvants recommandés sont, généralement, l'eau, l'éthanol et les mélanges eau-acétone, eau-méthanol, eau-éthanol, etc. (Julien et Gavend, 1980). L'utilisation des hydrocarbures aromatiques est strictement encadrée, vu leurs propriétés cancérigènes.

### **I.3.1.2. Les méthodes d'extraction solide-liquide**

L'extraction solide-liquide regroupe plusieurs méthodes différentes. Cette diversité de méthodes, a été induite par plusieurs facteurs, dont la variété de matières premières, l'utilisation industrielle des extraits, ainsi que les conditions de mise en contact entre les deux phases (Leybroos et Fremeaux, 1990). On citera, entre autres, la lixiviation ou lessivage, la percolation, la décoction, l'infusion, la macération, la digestion et l'élution.

### **I.3.1.3. Technologies des extracteurs solide-liquide**

D'autres considérations interviennent dans la technologie de mise en œuvre d'une extraction solide-liquide, en l'occurrence, les processus continus ou discontinus, avec la phase solide en lit fixe, mobile ou dispersé, ce qui distingue les appareils d'extraction. (Leybroos et Fremeaux, 1990).

L'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. a fait l'objet d'une étude récente menée par Djediat (2014). Lors de cette étude, l'extraction a été

réalisée en discontinu à charge dispersée. Le contact intime entre le solide et le solvant est assuré par agitation mécanique.

### **I.3.2. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIII<sup>ème</sup> et le X<sup>ème</sup> siècle, mais le principe était déjà connu et utilisé par les égyptiens dès le IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C. (Willem, 2002).

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité.

L'hydrodistillation est un procédé d'extraction au cours duquel les composés volatils et immiscibles à l'eau sont entraînés avec la vapeur d'eau. C'est le procédé le plus utilisée, car rentable et convenant le mieux à l'extraction, à l'échelle laboratoire ou à l'échelle industrielle, des substances odorantes, destinées à un usage thérapeutique (Willem, 2002).

Ce procédé permet, aussi, la récupération des antioxydants hydrosolubles contenus dans les eaux de distillation (Haddou et Hammouche, 2012 ; Bounoua et Boumahdi, 2013).

#### **I.3.2.1. Principe**

L'hydrodistillation est une distillation hétérogène, consistant à immerger la matière première végétale dans l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement, à pression atmosphérique.

La chaleur et la présence de l'eau permettent la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique.

Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale à 100°C, à pression atmosphérique, alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées.

Le distillat obtenu est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, la séparation des deux phases : huile essentielle (qui constitue la phase organique) et eau florale (qui constitue la phase aqueuse), a lieu du fait de la différence entre leurs densités.

La distillation peut être réalisée avec ou sans recyclage (redistillation) de la phase aqueuse, obtenue après la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage et, à l'échelle laboratoire, l'équipement le plus souvent utilisé permettant cela est l'appareil de Clevenger (Clevenger, 1928).

### **I.3.2.2. Paramètres du procédé de l'hydrodistillation**

Plusieurs paramètres interviennent dans ce procédé :

- **La durée de l'extraction**, peut considérablement varier et peut atteindre plusieurs heures, selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter (la localisation des sites sécréteurs : endogènes ou exogènes). Il est très important d'optimiser ce paramètre du fait qu'il influe sur le rendement et la composition de l'huile essentielle (Lucchesi, 2005).
- **Le rapport volume d'eau / masse de matière végétale**, un paramètre dont il faut tenir compte lors de la mise en œuvre de l'hydrodistillation. Lorsque ce rapport est insuffisant, la matière végétale peut stagner au contact des parois de l'extracteur. Un rapport élevé, par contre, est économiquement injustifié, car nécessite une importante quantité de chaleur pour mettre en ébullition un grand volume d'eau (Gueorguiev, 1995).

Lors de l'hydrodistillation, certaines réactions d'hydrolyse peuvent avoir lieu entre l'eau et certains constituants de l'huile essentielle. La réaction d'hydrolyse des esters est la plus fréquente et elle conduit à la formation d'acides organiques qui, à leur tour, catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation (Lagunez, 2006).

Pour la quantité d'eau en contact avec la matière végétale, un optimum est donc à trouver, car plus celle-ci est importante plus les réactions sont accélérées favorisant la formation d'alcools et d'acides, causant ainsi la diminution du rendement en huile essentielle. Ainsi donc, le pH des eaux de distillation est un paramètre important à maîtriser. Ce processus d'hydrolyse est, alors, à l'origine de la formation d'artefacts (Handa et *al.*, 2008).

- **Débit de vapeur**, qui est un paramètre très important du procédé. Mise à part l'entraînement de l'huile essentielle, un débit de vapeur élevé assure, au cours de l'hydrodistillation, l'agitation du matériel végétale et un meilleur contact entre les deux phases (Gueorguiev, 1995).

### **I.3.2.3. Mécanisme**

L'hydrodistillation des huiles essentielles est un processus de transfert de matière complexe, des phénomènes d'échange de matière interviennent entre les phases solide, liquide et vapeur.

Pour expliquer les différentes phases de l'hydrodistillation des végétaux, des études relativement récentes (Gueorguiev, 1995) proposent un mécanisme comportant les trois étapes suivantes:

- ✓ **La thermodiffusion** : dans un premier temps, pour que l'huile puisse être entraînée, il faut qu'elle soit en contact direct avec la vapeur. Une telle contrainte impose la destruction de la structure cellulaire du végétal, chose que les conditions sous lesquelles est menée l'hydrodistillation ne permettent pas. On pense alors qu'au début du processus, on assiste à la « thermodiffusion » ou exsudation thermique de l'huile et ceci se poursuit jusqu'à l'établissement d'un équilibre des températures à l'extérieur et à l'intérieur du site sécréteur.
- ✓ **L'osmose** : au contact de la surface du végétal, l'eau pénètre par osmose dans les sites sécréteurs et engendre une augmentation de la pression à l'intérieur du site. Cette pression dite de « turgescence » qui s'exerce sur la cuticule, provoque l'expansion du trichome et une dilatation des pores. Il s'ensuit l'expulsion de l'huile essentielle du site sécréteur, vers l'extérieur, sans que la cuticule du trichome soit déchirée. La température élevée, quant à elle, provoque la coagulation du protoplasme du trichome et, par conséquent, la semi-perméabilité de la cuticule se trouve diminuée.
- ✓ **L'hydrodiffusion** : Une fois à l'extérieur du trichome, l'huile essentielle rencontre une couche d'eau de condensation qui enveloppe le substrat végétal. L'huile essentielle diffuse à travers cette couche (hydrodiffusion), jusqu'à atteindre l'interface huile-vapeur. Le contact direct huile-vapeur étant assuré, l'huile s'évapore et est entraînée par le flux de vapeur.

#### **I.3.2.4. Hydrodistillation en présence de tensioactifs**

L'utilisation des tensioactifs lors de l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques a fait l'objet de plusieurs travaux (Trandafilov et Minkov, 1969 ; Minkov et *al.*, 1967 ; Minkov et *al.*, 1966 ; Gantchev et *al.*, 1978 ; Baydar et Baydar, 2005 ; Dobрева et Kovatcheva, 2007 ; Abdelli, 2010 ; Rougou, 2012 ; Charchari et *al.*, 2011a, 2011b, 2013). Les résultats de ces études montrent une forte augmentation du rendement, sans que la composition qualitative de l'huile soit trop affectée par la présence du tensioactif.

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles présentant deux parties d'affinité différente : l'une lipophile (affinité pour les graisses), est apolaire, l'autre, hydrophile (affinité pour l'eau) est polaire. Cette dualité au sein de la molécule du tensioactif est à l'origine de l'activité de surface, de la miscellisation et des capacités de solubilisation, lui permettant de solubiliser deux phases non miscibles, par interaction avec l'une apolaire, par sa partie hydrophobe; et avec l'autre, polaire, par sa partie hydrophile.

L'épiderme des plantes herbacées et des jeunes plantes ligneuses est recouvert de strates lipophiles, appelées cuticule, qui forment un revêtement protecteur, souple, imperméable à l'eau, tout en permettant des échanges gazeux et d'eau, nécessaires à la respiration et à la photosynthèse, avec le milieu extérieur par des orifices minuscules, appelés stomates.

Lorsque les molécules du tensioactif sont mises en contact avec la cuticule, ils pénètrent dans celle-ci. Des micelles mixtes commencent à se former et après le détachement de certains d'entre elles, des perforations apparaissent dans la bicouche lipidique qui constitue la cuticule. Enfin, le nombre des micelles détachés augmente de plus en plus jusqu'à la dissolution complète de la bicouche lipidique par le tensioactif (Tamura et *al.*, 2002).

Dans le cas de l'extraction des huiles essentielles, le rôle du tensioactif peut être résumé comme suit :

- ✓ Il contribuerait, en premier lieu, au mouillage par l'eau de la surface hydrophobe de la matière végétale, en diminuant la tension superficielle ;

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

- ✓ Il faciliterait, ensuite, la pénétration de l'eau à travers les cuticules des trichomes peltés et capités, contenant l'huile essentielle, en solubilisant la bicouche lipidique des cuticules.
  
- ✓ Il favoriserait, enfin, la formation d'une émulsion eau-huile à l'intérieur des trichomes. La pression dans les trichomes, ou pression de turgescence, augmentée par la présence d'eau, permettrait l'acheminement de l'émulsion eau-huile vers la surface de la cuticule, d'où l'huile est entraînée par le flux de vapeur.

Ceci explique bien l'augmentation du rendement d'extraction de l'huile essentielle en présence du tensioactif.

## ***Chapitre II***

### ***Matériels et méthodes***

## **II.1. Matière végétale utilisée**

La matière végétale, objet de cette étude, constituée des feuilles et des tiges des sommités aériennes, a été cueillie à la fin du mois de Janvier 2014 et provient d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. La plante a été identifiée au Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger, comme étant *Rosmarinus officinalis* L.

Un échantillonnage, visant la préparation des échantillons représentatifs du lot mère, ayant les mêmes propriétés moyennes, a été effectué, selon la méthode d'usage (Dagnelle, 1981, Gueorguiev, 1995).

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par distillation azéotropique au xylène, dans un appareil de Dean et Starck et évalué à 17,98%. Pour éviter une variation du taux d'humidité, les échantillons de la plante ont été conservés au réfrigérateur et l'ensemble des essais a été réalisé en trois jours.

## **II.2. Extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.**

### **II.2.1. Dispositif expérimental**

L'extraction a été réalisée en utilisant le dispositif expérimental schématisé sur la Figure II.1. Il est constitué d'un extracteur en verre, de volume 2 L, équipé d'un couvercle étanche, traversé par un agitateur mécanique à vitesse d'agitation variable et surmonté d'un réfrigérant à reflux.



**Figure II. 1 :** Dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide

La température d'extraction est maintenue constante avec une précision de  $\pm 1^\circ\text{C}$  à l'aide d'un bain thermostaté, dans lequel est plongé l'extracteur.

### **II.2.2. Protocole expérimental**

Les essais d'extraction ont été réalisés dans les conditions opératoires optimales déterminées au préalable (Djediati, 2014), comme suit :

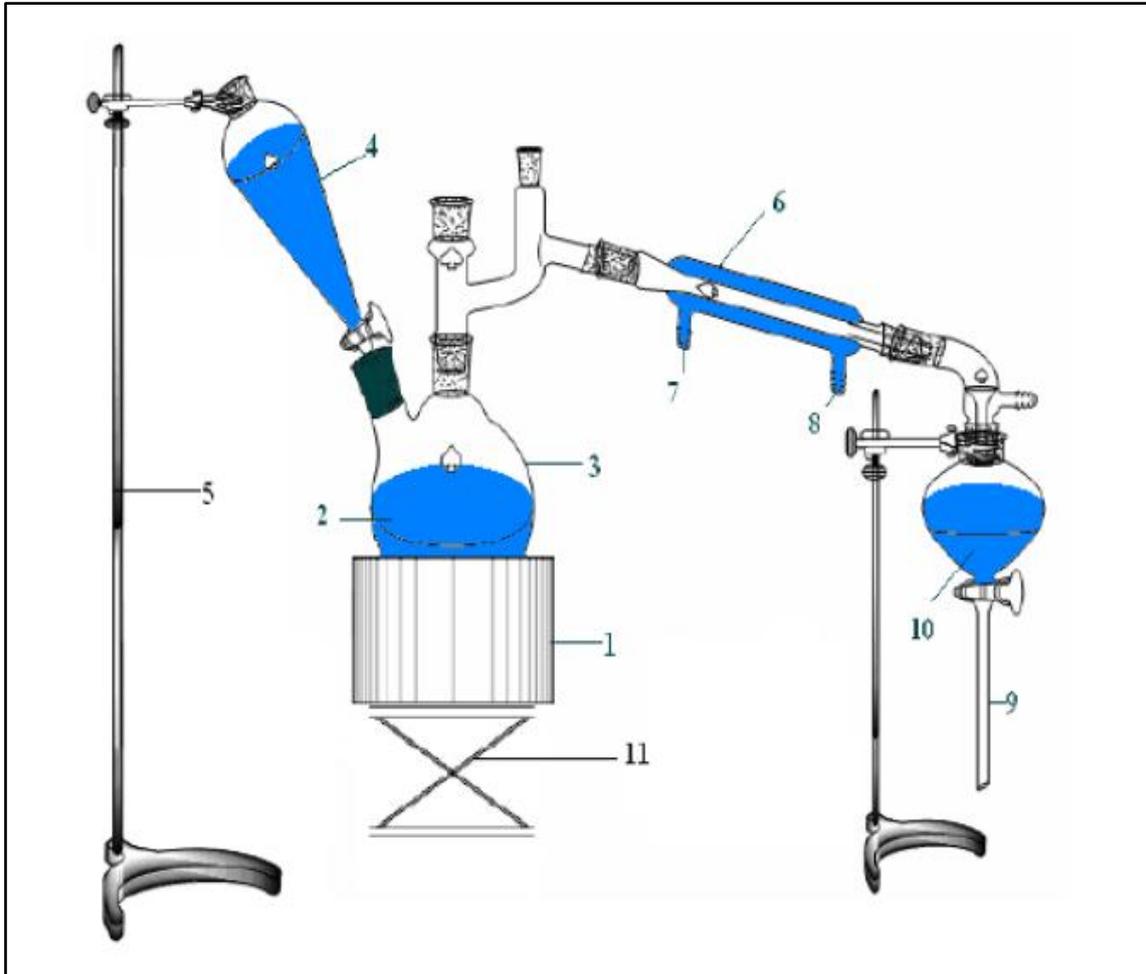
- ✓ Le rapport du volume de la phase liquide et la masse de la phase solide est égal à 16.
- ✓ La température de l'extraction est fixée à  $80^\circ\text{C}$ .
- ✓ La durée de l'extraction est fixée à 2 heures 30 minutes.
- ✓ La vitesse d'agitation : 100 tr/mn

A la fin de l'opération, les phases solide et liquide sont séparées par filtration. La phase liquide contenant les composés phénoliques est récupérée et conservée au réfrigérateur.

### II.3. Hydrodistillation du *Rosmarinus officinalis* L.

#### II.3.1. Dispositif expérimental de l'hydrodistillation

Le dispositif expérimental d'hydrodistillation est schématisé à la Figure II.2 suivante :



**Figure II. 2 :** Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire

1. Chauffe-ballon ; 2. Matière végétale + eau ; 3. Ballon ; 4. Ampoule à couler ; 5. Support ;
6. Réfrigérant ; 7. Sortie de l'eau de refroidissement ; 8. Entrée de l'eau de refroidissement ;
9. Ampoule à décanter, récipient de recette ; 10. Distillat ; 11. Support élévateur

## Chapitre II : Matériels et méthodes

Il est constitué d'un ballon de 2 litres, dans lequel la matière végétale baigne dans l'eau. La source de chaleur est un chauffe-ballon à puissance de chauffe variable. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant. Le distillat est récupéré dans une recette. Les eaux de distillation, recueillies dans l'ampoule à décanter sont réintroduites dans le ballon à l'aide de l'ampoule à couler (cohobage).

### **II.3.2. Protocole expérimental**

La matière végétale, constituée des feuilles et des tiges de *Rosmarinus officinalis* L., préalablement pesée, est introduite dans le ballon. Après l'ajout de l'eau, l'ensemble est porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant et les eaux de distillation sont ensuite réintroduites dans le ballon, afin de récupérer l'huile essentielle dissoute et de maintenir le rapport volume d'eau / masse de matière végétale constant.

Le rapport du volume de la phase liquide et la masse de la phase solide est fixé à 16. La durée de l'hydrodistillation a été de 2 heures 30 minutes, en tenant compte de la structure sécrétrice exogène de la plante et en se basant sur les résultats des études antérieures relatives à la cinétique d'extraction du romarin provenant du même lot. (Charchari et *al.*, 2011b ; Abdelli, 2010).

A la fin de l'opération le mélange eau-huile est récupéré dans le récipient de recette. L'huile est séparée des eaux de distillation par décantation. La masse d'huile récupérée est déterminée par pesée. Des échantillons des eaux de distillation sont prélevés et conservés au réfrigérateur.

Le rendement en huile est exprimé, en pourcentage, par rapport à la masse de matière sèche selon la relation (II.1) suivante :

$$R_{HE} = \frac{100 \times m_{HE}}{M_S} \quad (II.1)$$

Où  $R_{HE}$  désigne le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcent;  $m_{HE}$  et  $M_S$  sont, respectivement, les masses, en grammes, de l'huile essentielle et de la matière végétale sèche.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

$M_s$  est calculée par la formule (II.2) suivante :

$$M_s = M \times (1-H) \quad (\text{II.2})$$

Tel que :

- ✓ **M**: la masse de matière végétale utilisée.
- ✓ **H** : Le taux d'humidité.

La concentration en extrait sec, en g/mL, des extraits aqueux, obtenus lors de l'extraction solide-liquide, et des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation, a été déterminée en procédant au séchage à 40°C, dans une étuve, d'un millilitre, jusqu'au poids constant.

Le rendement en extrait sec est calculé par rapport à la masse de la matière sèche selon la relation (II.3) suivante :

$$R_{ES} = \frac{100 \times m_{ES}}{M_s} \quad (\text{II.3})$$

Où  $R_{ES}$  désigne le rendement en extrait sec, exprimé en pourcent;  $m_{ES}$  et  $M_s$  sont, respectivement, les masses, en grammes, de l'extrait sec et de la matière végétale sèche.

Les essais d'extraction solide-liquide et d'hydrodistillation ont été réalisés, en utilisant différents échantillons de matière végétale : des échantillons sans aucun prétraitement, et des échantillons ayant subi une macération dans une solution aqueuse de tensioactif non ionique de concentration 0,5%, pendant 24 heures.

### **II.4. Mesure du pH**

La mesure du pH a été effectuée, à la température ambiante, à l'aide d'un pH-mètre Hanna mètre, muni d'une électrode en verre/Ag/AgCl.

## **II.5. Dosage des composés phénoliques**

La teneur en composés phénoliques, présents dans les eaux de distillation et dans les extraits aqueux, a été évaluée par la méthode colorimétrique de Folin-Denis, décrite par Jiao *et al.* (2005), en utilisant l'acide gallique comme standard.

### **II.5.1. Principe de la méthode de Folin-Denis**

Le réactif de Folin-Denis est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ceux-ci sont réduits, en présence des composés phénoliques, formant un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur du mélange est proportionnelle à la concentration des composés phénoliques.

### **II.5.2. Protocol expérimental**

Un volume de 0,5 mL d'échantillon à doser est versé dans une fiole de 20 mL et complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. De cette solution, un volume de 0,1 mL est prélevé, versé dans une fiole de 25mL, contenant 12,5 mL d'eau distillée et 1,25 mL de réactif de Folin-Denis y sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 3 minutes, puis 1,25 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sont versés dans la fiole et complétés à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

L'échantillon ainsi préparé est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance de la solution est mesurée à une longueur de 760 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250.

La concentration en composés phénoliques, exprimée en mg équivalents d'acide gallique par millilitre de solution à doser, mg EAG/mL, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration d'acide gallique, utilisé comme standard.

## II.6. Evaluation des propriétés anti-oxydantes des extraits

### II.6.1. Protocol expérimental

La solution de DPPH à 100 µM/mL est préparée en utilisant comme solvant le méthanol. Elle peut être utilisée pendant une durée maximale de cinq jours, à condition d'être conservée à l'abri de la lumière et à une température avoisinant les -5°C. L'absorbance de la solution de DPPH est mesurée avant de procéder à l'analyse de chaque échantillon. Celle-ci reste pratiquement constante tout au long de la mesure.

Des solutions aqueuses de concentrations en extrait sec allant de 10 µg/mL à 50 µg/mL ont été préparées à partir des eaux de distillation et des extraits aqueux.

Les mesures de l'absorbance ont été réalisées à une longueur d'onde de 517 nm, avec un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250. Avant de procéder à l'analyse, l'appareil est étalonné au méthanol.

Un volume de 2 mL de la solution à tester est ajouté à 2 mL de solution de DPPH. Le mélange réactionnel obtenu est agité vigoureusement pendant 10 secondes avant d'être introduit dans la cellule du spectrophotomètre. Celle-ci est ensuite incubée dans l'appareil pendant le temps nécessaire, à la stabilisation de la valeur de l'absorbance.

### II.6.2. Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition (I %) est calculé par la relation (II.4) suivante :

$$I (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{éch.}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (II.4)$$

Avec:

- ✓  $A_{DPPH}$  : Absorbance de la solution de DPPH pur.
- ✓  $A_{éch.}$  : Absorbance du DPPH en présence de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition I(%) renseigne uniquement sur la capacité de l'échantillon à une concentration donnée, de réduire ou non les radicaux du DPPH.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité anti-oxydante d'un composé, les résultats sont souvent comparés à ceux d'un antioxydant de référence, tels que l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux 2004).

### **II.6.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub>**

La concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> est la concentration d'un antioxydant, nécessaire pour provoquer une réduction de 50% de l'absorbance du DPPH dans le milieu réactionnel.

Ce paramètre, exprimé en microgrammes d'antioxydant par millilitre de solution, a été calculé à partir des équations des courbes, donnant l'évolution du pourcentage d'inhibition I en fonction de la concentration C de l'échantillon,  $I = f(C)$ , en posant  $I = 50\%$ .

La capacité anti-oxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa valeur d'IC<sub>50</sub> est petite.

### **II.6.4. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire**

L'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, est défini par le rapport (II.5) :

$$IAA = \frac{C_{DPPH}}{IC_{50}} \quad (II.5)$$

Avec :

- ✓ **C<sub>DPPH</sub>** : Concentration de la solution du DPPH dans la cellule au moment de l'analyse.
- ✓ **IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%, toutes deux exprimées en µg/mL (Scherer et Godoy, 2009).

L'indice d'activité anti-radicalaire est une constante, indépendante des concentrations du DPPH et de l'échantillon.

Selon Scherer et Godoy (2009), l'échantillon présente une faible activité anti-oxydante, si  $IAA < 0,5$ , une activité anti-oxydante modérée, pour des valeurs d'IAA entre 0,5 et 1, une forte activité anti-oxydante, si  $1 < IAA < 2$  et une très forte activité anti-oxydante, lorsque la valeur d'IAA est supérieure à 2.

### II.6.5. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire

L'indice de l'efficacité anti-radicalaire, IEAR, relie la concentration du DPPH, le temps  $t_{CE50}$  et la concentration effective  $CE_{50}$  de l'échantillon selon l'expression (II.6) suivante :

$$IEAR (g/mg.mn) = \frac{1}{CE_{50} \times t_{CE50}} \quad (II.6)$$

Où  $CE_{50}$  et  $t_{CE50}$  sont, respectivement, la concentration effective et le temps de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaires pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH utilisé.

La détermination expérimentale de ces deux grandeurs nécessite de suivre l'évolution du pourcentage d'inhibition des radicaux du DPPH, en fonction du temps, jusqu'à atteindre un palier. Ceci permet l'estimation du temps d'équilibre,  $t_e$ , les valeurs de la concentration initiale du DPPH,  $C_{DPPH0}$  et la concentration du DPPH à l'équilibre,  $C_{DPPHe}$  sont estimées en se référant à une courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance de la solution du DPPH en fonction de sa concentration. Celle-ci a été établie en mesurant l'absorbance à 517 nm de cinq solutions de concentrations 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{g/mL}$  du DPPH dans le méthanol. C'est une droite, passant par l'origine, dont l'équation s'écrit :  $A=0,032.C_{DPPH}$

Le pourcentage (%) de DPPH résiduel,  $DPPH_{rés}$ , est calculé, alors, par la relation (II.7) suivante :

$$DPPH_{rés} (\%) = \frac{C_{DPPH e}}{C_{DPPH 0}} \times 100 \quad (II.7)$$

Par ailleurs, les données expérimentales permettent de calculer le rapport  $R_m$  de la masse, correspondant à différentes concentrations de l'échantillon et de la masse du DPPH.

$$R_m (mg/g) = \frac{M_{éch}}{M_{DPPH}} \quad (II.8)$$

La concentration efficace  $CE_{50}$ , exprimée en mg d'extrait par g de DPPH utilisé, est ensuite déterminée à partir de la courbe, donnant l'évolution du  $DPPH_{rés}$  en fonction de  $R_m$ , en posant  $DPPH_{rés} = 50\%$ .

Le temps,  $t_{CE50}$ , de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaire pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH utilisé, est estimé à partir de la courbe, donnant la diminution du pourcentage de  $DPPH_{rés}$  en fonction du temps.

## **II.7. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) de l'huile essentielle**

Les échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus par hydrodistillation des échantillons représentatifs de la matière végétale, avec et sans prétraitement de celle-ci, ont été analysées, à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer, dans les conditions opératoires suivantes :

- Colonne capillaire: en silice fondu, de longueur 30m et diamètre intérieur 0,32mm ;
- Phase stationnaire : HP5, épaisseur du film 0,25 $\mu$ m ;
- Gaz vecteur : hélium ;
- Détecteur : FID ;
- Débit de gaz vecteur : 1 mL/mn ;
- Température de colonne : 60 à 220°C à raison de 3°C/mn ;
- Température de l'injecteur : 250°C ;
- Température du détecteur : 250°C ;
- Volume injecté : 1 $\mu$ l ;
- Mode d'injection : split 1/80.

L'identification des constituants des huiles essentielles a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention à ceux publiés dans la littérature (Site web [3]) et à ceux, obtenus dans les mêmes conditions opératoires, rapportés par un travail antérieur (Charchari et *al.* 2010), relatif à l'analyse par CG-SM de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

A cet effet, un mélange, constitué de n-alcane, contenant 9 à 22 atomes de carbone, a été analysé dans les mêmes conditions opératoires. Les indices de rétention ont été calculés par la formule suivante (Van den Dool H., Kratz P. D., 1963) :

$$I = 100 n + 100 \frac{t_i - t_n}{t_{n+1} - t_n} \quad (\text{II.9})$$

Où:  $t_i$ ,  $t_n$ ,  $t_{n+1}$  sont les temps de rétention des constituants  $i$ ,  $n$  et  $n+1$ , respectivement, avec  $i$  : constituant à identifier;  $n$ : alcane élué avant le constituant  $i$ ;  $n + 1$ : alcane élué après le constituant  $i$ .

### **II.8. Réactifs utilisés**

- Tensioactif non ionique Tween 20 (Sigma Aldrich)
- Méthanol (99,7%, Sigma Aldrich)
- Réactif de Folin-Denis (Merck)
- Acide gallique (99,5%, Sigma)
- Acide ascorbique (PA, Panreac)
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Aldrich)
- Carbonate de sodium (99%, Rectapur)
- Xylène (Fluka)

***Chapitre III***  
***Résultats et discussion***

### III.1. Influence du prétraitement de la matière végétale sur le rendement en extrait sec des extraits aqueux et des eaux de distillation du *Rosmarinus officinalis* L.

Les rendements en extrait sec,  $R_{ES}$ , des extraits aqueux et des eaux de distillation, sont regroupés dans le Tableau III.1 suivant.

**Tableau III. 1 :** Rendement en extrait sec, en %, des extraits aqueux et des eaux de distillation du *Rosmarinus officinalis* L., sans et avec prétraitement de la plante

Prétraitement	Rendement en extrait sec $R_{ES}$ , %	
	Extraction	Hydrodistillation
Sans	14,00	24,97
Macération dans le tensioactif	20,83	30,14

L'examen des valeurs du Tableau III.1, nous permet de formuler les remarques suivantes :

- ✓ Pour les deux procédés, on constate une nette augmentation des rendements en extrait sec, obtenus en présence de tensioactif. Cette augmentation pourrait être attribuée aux propriétés solubilisantes et de miscellisation du tensioactif.
- ✓ Les rendements en extrait sec des eaux de distillation sont supérieurs à ceux des extraits aqueux, obtenus par extraction solide-liquide. Etant donné que l'hydrodistillation s'effectue à 100°C, alors que l'extraction solide-liquide a été réalisée à 80°C, il serait permis de penser que les produits hydrosolubles récupérés ne seraient pas thermodégradables et que leur solubilité augmente en augmentant la température.

### III.2. Influence du prétraitement de la matière végétale sur la teneur en composés phénoliques des extraits aqueux et des eaux de distillation du *Rosmarinus officinalis* L.

Lors de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du romarin, nous avons mesuré le pH des différents extraits aqueux et des eaux de distillation obtenus. Les valeurs de pH enregistrées varient entre 6,24 et 6,42, pour les extraits, obtenus par extraction solide-liquide, et entre 5,59 et 5,76, pour les eaux de distillation. Ces valeurs de pH signifiant la présence des composés à caractère acide, en l'occurrence, des acides carboxyliques, et/ou des composés phénoliques hydrosolubles, nous ont suggéré à effectuer un test avec le réactif de Folin-Denis. Ce dernier s'est avéré positif, nous avons appliqué la méthode de Folin-Denis pour le dosage des composés phénoliques, en utilisant l'acide gallique comme standard. La courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance,  $A$ , en fonction des concentrations,  $C_{AG}$ , des solutions aqueuses d'acide gallique, allant de 0,01 à 0,08 mg/mL, est une droite, passant par l'origine, de pente égale à 0,7106 et de coefficient de corrélation  $R^2=0,9996$  :

$$A = 0,7106.C_{AG} \quad \text{(III.1)}$$

Les résultats des dosages de l'ensemble d'échantillons, exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (mg EAG/g  $M_s$ ) sont réunis dans le Tableau III.2 suivant.

**Tableau III. 2 :** Teneur en composés phénoliques des extraits aqueux et des eaux de distillation du *Rosmarinus officinalis* L., sans et avec prétraitement de la plante

Prétraitement	Teneur en composés phénoliques, mg EAG /g $M_s$	
	Extraction	Hydrodistillation
Sans	35,96	70,67
Macération dans le tensioactif	26,55	56,87

L'examen des valeurs du Tableau III.2, suscite les remarques suivantes :

- ✓ La teneur en composés phénoliques dans les eaux de distillation représente près du double de celle des extraits aqueux obtenus par extraction solide-liquide. Ceci pourrait être attribué, à notre avis, au fait qu'à la température de

l'hydrodistillation de 100°C, la solubilité des composés phénoliques dans l'eau sont favorisées. En outre, ces résultats témoignent de la stabilité à la température de 100°C de ces composés.

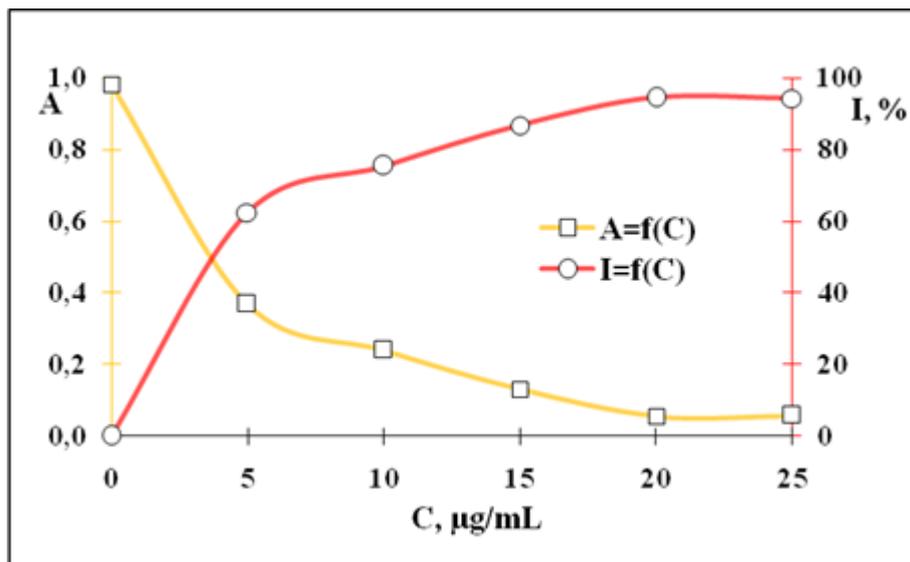
- ✓ La teneur en composés phénoliques dans les échantillons, obtenus après une macération en présence de tensioactif, est inférieure à celle dans les échantillons, obtenus en absence de tensioactif. Ceci est probablement dû au fait, qu'en présence de tensioactif, la teneur en extrait sec dans les extraits aqueux et dans les eaux de distillation augmente, suite à la solubilisation et la micellisation des constituants de la plante, autres que les composés phénoliques et, par conséquent, la teneur de ces derniers devient inférieure à celle obtenue en absence de tensioactif.

### **III.3. Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits aqueux et des eaux de distillation du *Rosmarinus officinalis* L.**

Nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation récupérés.

#### **III.3.1. Détermination de la concentration IC<sub>50</sub>**

Afin de déterminer la concentration, en µg/mL, des extraits aqueux et des eaux de distillation, nécessaires à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, nous avons préparé des solutions aqueuses des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, de concentrations 10, 20, 30, 40 et 50 µg/mL. Les mesures de l'absorbance de la solution méthanolique du DPPH pur et en présence de l'échantillon à tester ont été effectuées pendant le temps nécessaire à la stabilisation de la valeur de l'absorbance. Nous avons calculé les pourcentages d'inhibition I, %, correspondant aux différentes concentrations. Ces données expérimentales nous ont permis de tracer les courbes, donnant l'évolution de l'absorbance, A, du DPPH et du pourcentage d'inhibition, I, en fonction de la concentration de l'échantillon. A titre d'exemple, la Figure III.1 présente l'allure générale des courbes  $A = f(C)$  et  $I = f(C)$ , obtenues pour chacun des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, où C est la concentration de l'échantillon à tester au moment de la mesure.



**Figure III. 1 :** Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé

Les valeurs des concentrations  $IC_{50}$  des échantillons testés ont été déterminées, à partir des courbes  $I = f(C)$ , en posant  $I = 50 \%$ .

Nous avons déterminé les valeurs du pourcentage d'inhibition,  $I$ , des échantillons testés, pour deux concentrations: 10 et 40  $\mu\text{g/mL}$ . Elles sont réunies dans le Tableau III.3 suivant :

**Tableau III. 3 :** Valeurs des pourcentages d'inhibition pour des concentrations différentes des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de *Rosmarinus officinalis* L.

Prétraitement \ Procédé	Extraction		Hydrodistillation	
	10 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$
Sans	69,92	85,90	70,10	89,51
Macération dans tensioactif	61,98	94,50	65,80	94,65

Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition dépend de la concentration des échantillons et certainement de leur composition.

### **III.3.2. Détermination de l'indice d'activité antiradicalaire**

La détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire (IAA) nécessite l'estimation de la concentration finale de la solution du DPPH dans la cellule, au moment de la mesure de l'absorbance. A cet effet, nous avons eu recours à la courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance,  $A$ , des solutions méthanoliques du DPPH, en fonction de sa concentration,  $C_{DPPH}$ . Dans le domaine des concentrations allant de 5 à 40  $\mu\text{g/mL}$ , la courbe d'étalonnage est une droite, passant par l'origine, de pente, égale à 0,032 et de coefficient de corrélation  $R^2=1$ .

$$A = 0,032.C_{DPPH} \quad (\text{III.2})$$

$C_{DPPH}$  est la concentration massique du DPPH exprimée en  $\mu\text{g/mL}$ .

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, calculés par le rapport de cette concentration et la concentration  $IC_{50}$ , déterminée précédemment, sont rapportés dans le Tableau III.4 ci-après.

**Tableau III. 4 :** Valeurs des  $IC_{50}$  et des indices d'activité antiradicalaire, IAA, des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de *Rosmarinus officinalis* L.

Procédé	Extraction		Hydrodistillation	
	$IC_{50}$	IAA	$IC_{50}$	IAA
Sans	3,59	4,37	3,57	4,38
Macération dans le tensioactif	4,03	3,80	3,80	4,11

Nous constatons que :

- ✓ L'ensemble des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation présentent une très forte activité anti-oxydante, car leurs indices IAA sont nettement supérieurs à 2 (Scherer et Godoy, 2009).

### Chapitre III : Résultats et discussions

- ✓ Quel que soit le prétraitement de la matière végétale, les indices d'activité anti-radicalaire des échantillons des eaux de distillation sont supérieurs à ceux des extraits aqueux, obtenus par extraction solide-liquide.
- ✓ Si les indices d'activité anti-radicalaire des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, obtenus à partir de la plante non prétraitée, sont pratiquement identiques, ceux des échantillons, obtenus par hydrodistillation de la matière végétale, ayant subi un prétraitement, sont plus élevés.
- ✓ Les concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, issus de la matière végétale macérée dans une solution aqueuse de tensioactif, sont les plus élevées et, par conséquent, leurs indices d'activité anti-radicalaire, les plus faibles.

A ce stade de l'étude, nous pouvons avancer l'hypothèse que la composition chimique de ces échantillons est très différente des autres, du point de vue qualitatif. En effet, l'analyse par HPLC des eaux de distillation récupérées lors de l'hydrodistillation du romarin, sans et avec un prétraitement en présence de tensioactif, a montré des profils chromatographiques très différents (Bounoua et Boumahdi, 2013), suggérant une composition différente et, par conséquent, une activité anti-radicalaire différente.

#### **III.3.3. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire**

Les concentrations effectives CE<sub>50</sub>, les temps t<sub>CE50</sub> de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaires pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH utilisé, et les indices d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation, calculés par la procédure décrite dans le paragraphe II.6.5. du chapitre II, sont regroupés dans le Tableau III.5 suivant. .

**Tableau III. 5 :** Valeurs des CE<sub>50</sub>, t<sub>CE50</sub> et IEAR. 10<sup>-3</sup> des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation de *Rosmarinus officinalis* L.

Prétraitement \ Procédé	Extraction			Hydrodistillation		
	CE <sub>50</sub> mg /g DPPH	t <sub>CE50</sub> mn	IEAR. 10 <sup>-3</sup> g/mg.mn	CE <sub>50</sub> mg /g DPPH	t <sub>CE50</sub> mn	IEAR. 10 <sup>-3</sup> g/mg.mn
Sans	228,9	11,5	0,380	228,2	11,4	0,384
Macération dans tensioactif	263,2	8,1	0,471	243,2	8,4	0,492

### Chapitre III : Résultats et discussions

Nous observons que :

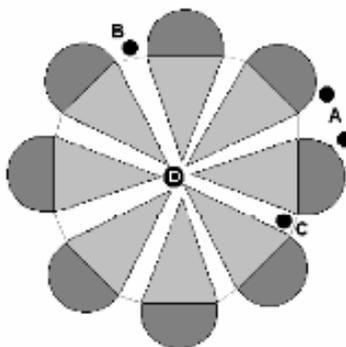
- ✓ L'ensemble des échantillons des eaux de distillation, avec et sans prétraitement de la matière végétale, possèdent des indices d'efficacité anti-radicalaire supérieurs à ceux des extraits aqueux. Ceci pourrait être attribué, à notre avis, au fait qu'à la température de l'hydrodistillation de 100°C, la solubilité des composés phénoliques dans l'eau sont favorisées.
- ✓ Les valeurs de  $CE_{50}$ ,  $t_{CE50}$  et, par conséquent, des indices d'efficacité anti-radicalaire IEAR des échantillons obtenus par les deux procédés à partir de la plante non prétraitée, sont très proches, ce qui laisse supposer que leur composition chimique est similaire.
- ✓ Les extraits aqueux et les eaux de distillation, obtenus à partir des échantillons de matière végétale, macérée dans une solution aqueuse de tensioactif, possèdent les indices d'efficacité anti-radicalaire les plus élevés.

Rappelons que l'indice d'efficacité anti-radicalaire tient compte, aussi bien de la concentration en antioxydants, que du temps de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH. Or, nous remarquons que les concentrations  $CE_{50}$  des échantillons, récupérés de la plante macérée dans une solution aqueuse de tensioactif, sont les plus élevées, 263,2 et 243,2 mg /g DPPH, respectivement. Ce résultat est en accord avec les valeurs élevées des concentrations inhibitrices  $IC_{50}$  de ces échantillons, déterminées précédemment (Tableau III.3).

En même temps, ces échantillons réagissaient plus rapidement avec les radicaux du DPPH, leurs valeurs de  $t_{CE50}$  étant de l'ordre de 8 minutes, contre 11 minutes, pour les échantillons récupérés de la plante non traitée au préalable.

Ces constatations suggèrent des différences de la composition chimique des échantillons. En effet, la micellisation peut être à l'origine de ce fait. Cette dernière est l'une des plus importantes propriétés des agrégats micellaires est leur capacité à solubiliser des substances de natures différentes (Mackay, 1987). A l'échelle moléculaire, la solubilisation consiste en une dissolution spontanée d'une substance (solubilisé) grâce à des interactions réversibles (électrostatiques, hydrophobes et/ou liaisons hydrogène) avec les micelles d'un tensioactif, présent dans un solvant, afin de

former une solution isotrope, thermodynamiquement stable. Les solutions micellaires permettent, donc, d'agir sur la distribution des solubilisâts dans un système liquide, car elles permettent, de plus, la concentration, la compartimentation et la localisation de ces substances, comme le montre la Figure III.2 suivante.



**Figure III. 2 :** Localisation des solubilisâts dans la micelle  
(Mackay, 1987; Bognolo 1997; Rosen, Dahanayake, 2000; Maniasso, 2001)

Sur cette figure les lettres désignent, respectivement :

(A) l'adsorption à la surface des micelles peut se produire avec des solubilisâts (métalliques ou organiques) dans les micelles ioniques ou mixtes ; (B) les solubilisâts, comme le phénol, sont incorporés, généralement, par des liaisons hydrogène, entre les chaînes d'oxyde d'éthylène des tensioactifs polyéthoxylés ; (C) certains solubilisâts, comme le benzène, sont incorporés dans la "palissade", entre les parties hydrophile et hydrophobe; (D) enfin, les solubilisâts non polaires, tels, les hydrocarbures aliphatiques sont incorporés dans le cœur des micelles.

La compartimentation et la localisation dans les micelles des substances de différentes structures et polarité se traduit par une sélectivité vis-à-vis certains composés et pourrait être à l'origine d'une composition chimique différente.

#### **III.4. Influence du prétraitement de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.**

Les rendements en huile essentielle ont été déterminés lors de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L., avec et sans prétraitement de la matière végétale. Le Tableau III.6 suivant réunit les résultats obtenus.

**Tableau III. 6 :** Rendement en huile essentielle,  $R_{HE}$  en %, obtenus lors de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L.

<b>Prétraitement de la matière végétale</b>	<b>Sans</b>	<b>Macération dans le tensioactif</b>
<b><math>R_{HE}</math>, %</b>	1,19	1,82

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que le rendement en huile, obtenu en présence de tensioactif, est nettement supérieur à celui, obtenu sans tensioactif. Ceci pourrait s'expliquer, d'une part, par la solubilisation sélective des cires épicuticulaires et des membranes cellulaires par le tensioactif, créant ainsi des ouvertures, ce qui a pour conséquence l'amélioration des échanges de matière, en l'occurrence, la pénétration de l'eau dans les trichomes et la diffusion de l'huile essentielle vers la surface du végétal. D'autre part, la micellisation de l'huile essentielle par le tensioactif, due à l'orientation de ses molécules amphiphiles, avec leur partie hydrophobe vers l'huile essentielle et leur partie hydrophile vers l'eau, facilite son hydrodiffusion vers les interfaces solide-liquide, puis liquide-vapeur, d'où l'huile est entraînée par le flux de vapeur.

### **III.5. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.**

Nous avons procédé à l'évaluation de la concentration inhibitrice  $IC_{50}$ , des indices d'activité anti-oxydante, IAA, et d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, des huiles essentielles, par la méthode du DPPH. A cet effet, des solutions méthanoliques des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., obtenues par hydrodistillation, sans et avec prétraitement de la matière végétale, ont été testées.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau III.7 suivant :

**Tableau III. 7 :** Valeurs des IC<sub>50</sub>, IAA, CE<sub>50</sub>, t<sub>CE50</sub> et IEAR des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis L.*, sans et avec prétraitement de la matière végétale

<b>Grandeur</b> <b>Prétraitement</b>	<b>IC<sub>50</sub></b> μg/mL	<b>IAA</b>	<b>CE<sub>50</sub></b> mg HE/g DPPH	<b>t<sub>CE50</sub></b> mn	<b>IEAR.10<sup>-3</sup></b> gDPPH/mgHE.mn
<b>Sans</b>	13,25	1,18	848,0	2,65	0,445
<b>Macération dans le tensioactif</b>	14,73	1,06	943,0	3,94	0,154

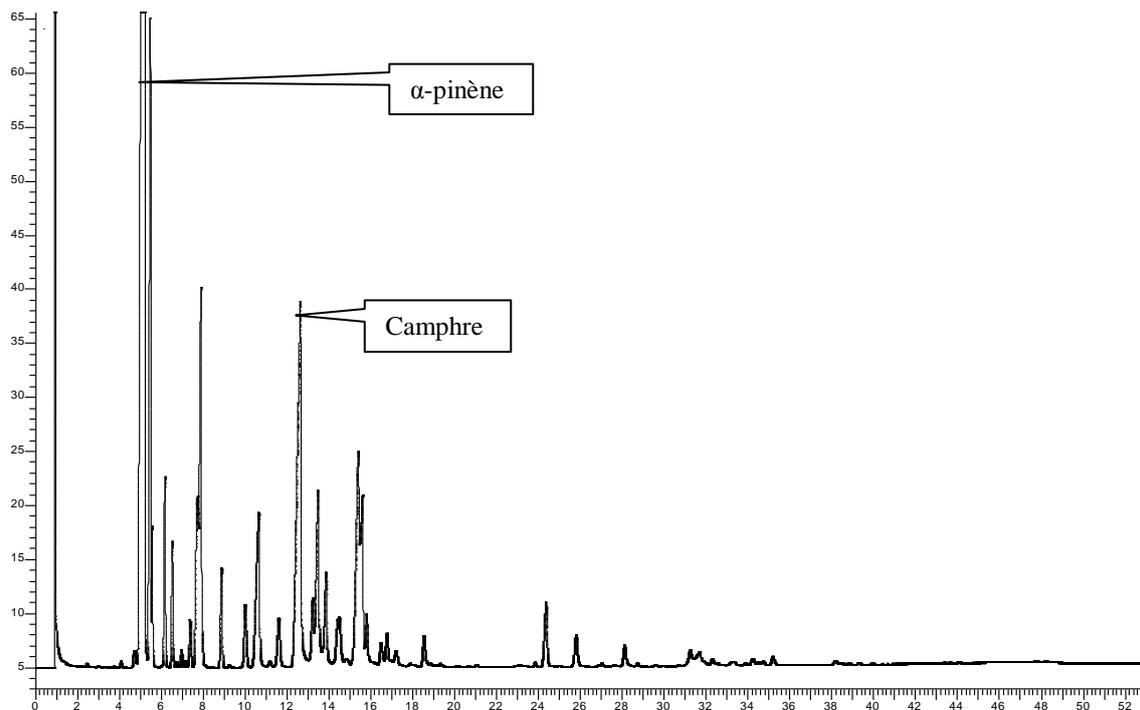
En examinant les valeurs de l'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, on constate qu'elles sont supérieures à 1 et selon Scherer et Godoy (2009) ces huiles présentent une forte activité antiradicalaire.

L'huile essentielle extraite de la plante macérée dans une solution aqueuse de tensioactif possède l'indice d'activité anti-radicalaire et l'indice IEAR plus faibles. On observe, pour l'huile extraite de la plante non traitée, que la valeur élevée de l'indice IEAR est due à la concentration CE<sub>50</sub> et au temps t<sub>CE50</sub> plus faibles.

Comme pour les extraits aqueux et les eaux de distillation, nous soupçonnons des différences dans la composition chimique des huiles essentielles, en particulier, concernant la classe des composés phénoliques présents.

### **III.6 Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation des échantillons de la matière végétale avec et sans prétraitement, ont été analysés par CPG. Les profils chromatographiques se sont révélés similaires. Un chromatogramme type est présenté à la Figure III.3 suivante.



**Figure III. 3 :** Chromatogramme type de l'huile essentielle du *R. officinalis* L.

Les 48 composés identifiés dans ces échantillons représentent 98,5 % de l'huile essentielle. Dans le Tableau III.8 sont réunies les teneurs relatives des constituants majoritaires des huiles essentielles, obtenues sans et avec prétraitement de la matière végétale.

**Tableau III. 8 :** Teneurs relatives, en %, des constituants majoritaires des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. obtenues avec et sans prétraitement de la matière végétale

Composés	Prétraitement	Sans	Avec tensioactif
α-pinène		49,88	38,43
camphre		11,88	9,97
camphène		7,68	6,58
p-cymène		4,16	5,12
bornéol		3,04	3,31
verbénone		2,84	4,83
sabinène		2,61	1,83

### Chapitre III : Résultats et discussions

On note que l' $\alpha$ -pinène et le camphre sont les constituants majoritaires dans les échantillons analysés.

Nous avons regroupé et présenté, dans le Tableau III.9, les composés identifiés dans les échantillons d'huile essentielle, selon leur appartenance à une classe chimique.

**Tableau III. 9 :** Teneurs relatives, %, des classes chimiques des composés présents dans les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. obtenues avec et sans prétraitement de la matière végétale

Classes chimiques	Prétraitement	
	sans	tensioactif
<b>Hydrocarbures</b>	66,95	55,17
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	26,15	27,41
<b>Total alcools</b>	6,23	13,93
octen-3-ol	0,95	1,03
linalol	0,33	3,80
bornéol	3,10	3,40
terpinen-4-ol	1,40	1,70
isobornéol	0,13	3,20
E-carvéol	0,02	0,60
Z-carvéol	0,30	0,20
<b>Composés phénoliques</b>	0,08	0,04
thymol	0,01	-
carvacrol	-	0,01
méthyl-eugénol	0,07	-
4-hydroxy-2-methyl-acetophenone	-	0,03

L'examen du tableau suscite plusieurs remarques:

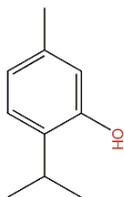
- ✓ Nous constatons le caractère monoterpénique l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L., les monoterpènes étant présents entre 55,17%, pour l'huile obtenue de l'échantillon de la plante, ayant subi un prétraitement avec une solution aqueuse de tensioactif et 66,95% pour l'huile obtenue de l'échantillon

### Chapitre III : Résultats et discussions

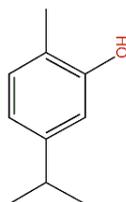
de la plante non traitée au préalable. Cette différence de la teneur en hydrocarbures monoterpéniques des huiles extraites avec et sans tensioactif a été déjà rapportée par des travaux antérieurs (Abdelli, 2010 ; Rougou, 2012) et attribuée au pouvoir mouillant, solubilisant et émulsifiant du tensioactif.

- ✓ On observe que les teneurs en monoterpènes oxygénés, en particulier celles des alcools, sont plus élevées dans l'huile obtenue de la plante, ayant subi un prétraitement.
- ✓ On note que les composés phénoliques se trouvent en très faible proportion dans les huiles analysées et que des différences de composition apparaissent, aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif.

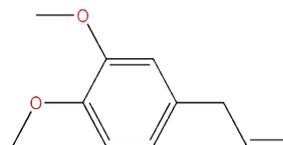
Les composés phénoliques identifiés dans les huiles essentielles sont des dérivés de l'acide benzoïque, tels, le thymol, le carvacrol et de l'acide cinnamique, le méthyl-eugénol.



Thymol



Carvacrol



Méthyl- eugénol

Le thymol et le carvacrol sont signalés comme étant les composés les plus actifs, car leur structure phénolique, en particulier, leur capacité de libérer les hydrogènes du groupement hydroxyle, leur procure des propriétés oxydo-réductrices et, de ce fait, ils peuvent inhiber les radicaux libres (Braga et *al.*, 2006). Par contre, le méthyl-eugénol est inactif, car il n'a pas des atomes d'hydrogène mobiles.

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

La teneur, même très faible, et le potentiel antioxydant des composés phénoliques présents dans les huiles essentielles expliqueraient les valeurs de leurs indices d'efficacité anti-radicalaire, déterminés précédemment.

Aussi, la présence du thymol dans l'huile obtenue de la plante non prétraite et du carvacrol, dans l'huile récupérée de la plante macérée dans la solution aqueuse de tensioactif, serait à l'origine des faibles valeurs du temps de réaction  $t_{CE50}$ .

# **Conclusion**

## Conclusion

Cette étude traite de la récupération des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. par extraction solide-liquide en charge dispersée et à partir des eaux de distillation, obtenues lors de l'extraction de l'huile essentielle de la plante par hydrodistillation.

Les essais d'extraction solide-liquide et d'hydrodistillation ont été réalisés, en utilisant différents échantillons de matière végétale : des échantillons sans aucun prétraitement, et des échantillons, ayant subi une macération dans une solution aqueuse de tensioactif non ionique de concentration 0,5%, pendant 24 heures.

L'étude de l'influence du prétraitement de la matière végétale sur le rendement en extrait sec a montré que ce dernier est le plus élevé dans les eaux, issues de l'hydrodistillation de la matière végétale, ayant subi un prétraitement par le tensioactif. Ce fait a été attribué aux propriétés solubilisantes et de miscellisation du tensioactif.

Le dosage, par la méthode de Folin-Denis, a permis de constater que la teneur en composés phénoliques est plus élevée dans les eaux de distillation. En effet, la solubilité des composés phénoliques dans l'eau sont favorisées à la température de 100°C de l'hydrodistillation. En outre, ces résultats témoignent de la stabilité à cette température des composés phénoliques hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

Le potentiel antioxydant des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation évalué à travers la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> et l'indice d'activité antiradicalaire. Ce dernier s'est avéré très élevé, supérieur à 2 et permet de conclure que les antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. présentent une très forte activité antiradicalaire.

Les valeurs différentes des concentrations efficaces CE<sub>50</sub>, des temps t<sub>CE50</sub> de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaires pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH, et, par conséquent, des indices d'efficacité antiradicalaire, IEAR, ont permis d'envisager des différences de la composition chimique des échantillons des extraits aqueux et des eaux de distillation étudiés.

Quant au rendement en huile essentielle, il s'est révélé le plus important, lors de l'hydrodistillation de l'échantillon de la matière végétale macéré dans une solution de

## Conclusion

tensioactif. En effet, la solubilisation sélective, par le tensioactif, des membranes cellulaires, favorisant les échanges de matière, et d'autre part, la micellisation de l'huile essentielle, facilitant son hydrodiffusion, pourraient être à l'origine de ceci.

Les valeurs de l'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, des huiles essentielles, obtenues des échantillons de la plante, avec et sans traitement, préalable à l'hydrodistillation, ont permis de constater qu'elles sont supérieures à 1 et de conclure que ces huiles présentent une forte activité antiradicalaire.

Comme pour les extraits aqueux et les eaux de distillation, les différentes valeurs de  $CE_{50}$ ,  $t_{CE50}$  et de l'IEAR, ont suggéré des différences dans la composition chimique des huiles essentielles, qui ont été confirmées par les résultats de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence les avantages du procédé de l'hydrodistillation, par rapport à l'extraction solide-liquide, pour la récupération des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. Ils nous permettent, par ailleurs, de préconiser la macération de la matière végétale dans une solution aqueuse de tensioactif, en vue d'obtenir un rendement élevé en l'huile essentielle, la récupération des antioxydants hydrosolubles des eaux de distillation, doués d'une forte activité antiradicalaire, permettrait la valorisation de ce sous produit de l'extraction, par hydrodistillation, de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- **Abdelli M. (2010)** Extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L., de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Coriandrum Sativum* L. par hydrodistillation en présence de tensioactifs, Mémoire de magister, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Alaux S. (2005)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à cinéole, *Rosmarinus officinalis* L., Ed. Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S. (2005)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à verbénone, *Rosmarinus officinalis* L., Ed. Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S. (2006)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à camphré, *Rosmarinus officinalis* L., Ed. Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Baydar H., Baydar N. (2005)** Industrial Crops and Products, Vol. 21, p.p. 251-255.
- **Bognolo G. (1997)** Nonionic surfactants in lipid technologies and applications, Ed. Gunstone, F.D. et Padley F.B., Marcel Dekker, New York, p.p. 633-694.
- **Bounoua D., Boumahdi L. (2013)** Hydrodistillation de *Salvia Officinalis* L. et de *Rosmarinus Officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation, Projet de Fin d'Etudes, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Boutekdjiret C. (1999)** Etude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences du romarin: transfert de matière et modélisation, Thèse de Doctorat d'état, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Braga P.C, Dal Sasso M., Culici M., GaSastri L., Marceca MX., Guffanti E.E. (2006)** Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems, *Pharmacology*, 76: 61-68.
- **Charchari S., Abdelli M. (2011a)** The Mediterranean Conference on Natural Products, Blida, Algeria, October 8-10<sup>th</sup>.
- **Charchari S., Beddar B., Arab S. (2013)** Entraînement à la vapeur à d'eau à l'échelle semi- pilote de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.: optimisation et extraction assistée par tensioactif, Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 104, Ed. SFGP, Paris, France.

## Références bibliographiques

- **Charchari S., Boudina N., Benhalla A. (2011b)** 4ème Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales, Mohammedia, Maroc, 12-13 Mai.
- **Charchari S., Chafaa I., Kassoussi K., Zekri M. M., Benhalla A., Boudina N., (2010)** Glandular Trichomes, Secretory Cavities and Essential Oil of Sage (*Salvia officinalis* L.), JEOBP, 13(3) : 267-274.
- **Chen Q., Shi H., Ho C-T. (1992)** Effects of rosmariny extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity, J. Am. Oil Chim. Soc., 69: 999-1002.
- **Chimi, H., J. Cillard, P. Cillard, and M. Rahmani (1991)** Peroxyl and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Some Natural Phenolic Antioxidants, J. Am. Oil Chem. Soc., 68: 307.
- **Clevenger J. F. (1928)** Apparatus for the determination of volatile oil, J. Amer. Pharm. Assoc., 17 : 345.
- **Culevier M-E., Richard H., Berset C. (1996)** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary, J. Amer. Oil Chem. Soc., 73: 645-652
- **Cuppett S., Schnepf M., Hall III C. (1997)** Natural Antioxidant – Are They a Reality? In Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications, AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A.
- **Dagnelle J.P. (1981)** Principe d'expérimentation, Ed. Presses agronomiques de Gembloux, Belgique.
- **Djediati H. (2014)** Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L., Projet de Fin d'Etudes, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Dobrova A., Kovatcheva N. (2007)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, Vol. LV, N°1, p.p. 303 -307, Polvdiv, Bulgarie.
- **Donadieu Y. (2008)** Les thérapeutiques naturelles, plantes médicinales, romarin. Site Web : <http://www.01sante.com/contenu/page/romarin-655> (consulté en Mai 2014).

## Références bibliographiques

- **Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M. & Hiltunen, R. (2004)** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey, *J. Agric. Food. Chem.*, 52: 762-770.
- **Dragland S., Sanoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R. (2003)** culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants, *J. Nutr.*, 133: 1286-1290.
- **Dziedzic S. Z., B. J. F. Hudson (1984)** Phenolic Acids and Related Compounds as Antioxidants for Edible Oils, *Food Chem.*, 14: 45.
- **Escuder O. (2007)** Plantes médicinales mode d'emploi, les reconnaître dans la nature, les utiliser, les cultiver au jardin, Ed. Eugen Ulmer, Romarin, p. 210.
- **Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D. (2002)** Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory, *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 5294-5299.
- **Farhat A. (2010)** Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application, Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) et l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
- **Favier A. (2003)** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'Actualité chimique*, pp. 108-117.
- **Gantchev G., Petkov L., Koupenov L. (1978)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, Vol. 25, N3, pp. 193- 196, Polvdiv, Bulgarie.
- **Gueorguiev E. (1995)** Technologie des produits aromatiques naturels et synthétiques, Ed. Zemizdat, Sofia.
- **Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1994)** Antioxidants in nutrition, health, and disease, Ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- **Haddou F., Hammouche I. (2012)** Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation », Projet de Fin d'Etudes, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.

## Références bibliographiques

- **Halvorsen B.L., Carlsen M.H., Phillips K.M. (2006)** Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in United States, *Am. J. Clin. Nutr.*, 84: 95-135.
- **Handa S. S., Suman P., Singh K., Gennaro L., Dutt R.(2008)** Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, Ed. ICS, Trieste, p. 37.
- **Haraguchi et al. (1995)** Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis* L., *Planta Med.*, p. 333.
- **Jiao Z., Liu J., Wang S. (2005)** Antioxidant Activities of Blackberry Pigment Extract, *Food Technology and Biotechnology*, Zhengzhou, 1(43): 97-102.
- **Julien, Gavend G. (1980)** Le cuir origine et fabrication, Ed. Centre technique de cuir.
- **Kocchilin-Ramonatxo C. (2006)** Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Metabol.*, Vol. 20, p.p. 165-177.
- **Lagunez Rivera L.(2006)** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, p 29.
- **Leybroos J. et Fremeaux P. (1990)** Extraction solide-liquide, *Techniques de l'ingénieur*, Paris.
- **Lucchesi E.M. (2005)** Extraction sans solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielle, Thèse de doctorat, Université de la Réunion, p. 143.
- **Mackay R. A. (1987)** Solubilization, in nonionic surfactants: physical chemistry, shick m.j., Ed. par *Surfactant Science Series23*; Marcel Dekker: New York, chap. 6.
- **Maniasso N. (2001)** Ambientes Micelares em Química Analítica, *Quím. Nova*, 24(1) : 87-93
- **Mateus E.M, Lopes C., Nogueira T. (2006)** Pilot steam distillation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, *Silva Lusitana*, Portugal, 14(2): 203 – 217.
- **Minkov E., Mihailova D., Trandafilov T. (1966)** *Die Pharmazie*, Vol. 22, p.p. 483-485.
- **Minkov E., Mihailova D., Trandafilov T. (1967)** *Die Pharmazie*, Vol. 22, p.p. 213-215, 611-613.

## Références bibliographiques

- **Molyneux P. (2004)** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin, J. Sci. Technol., 26 (2): 211-219.
- **Naktani N., Inatani R. (1984)** Antioxidative diterpenes from rosmary, Agric Biol Chem., p 2081.
- **Naktani N., Inatani R., Fuwa H. H., Seta H. (1983)** Structure of a new antioxidants phenolic diterpens isolated from rosmary (*Rosmarinus officinalis* L.), Agric Biol Chem., p 1661.
- **Paris et al. (1993)** Effect of carnosolic acid products, Vol. 56, N°8, p 1426.
- **Paume M-C. (2008)** Sauvages et médicinales plante remèdes pour nos petits maux, Ed. Édisud, Romarin, p. 212.
- **Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte L.S. (2002)** Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content, J. Sci. Food. Agric., 82: 1645-1651.
- **Pokorny J. (1988)** Autoxidation of Unsaturated Lipids, Ed. Chan H., Ed. Academic Press, London, U.K., p. 141.
- **Raskin (2003)** Chémotype ou race chimique, Ed. du Laboratoire Orau Honnelles, Belgique, 10 : 618 – 627.
- **Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M. (2001)** *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, J. Supercrit. Fluids, 21: 51 – 60.
- **Richheimer S., Bernart M., King G., Kent M., Bailey D. (1996)** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary, J. Amer. Oil Chem. Soc., 73: 507-514.
- **Rosen M. J., Dahanayake M. (2000)** Industrial Utilization of Surfactants: Principles and Practice, AOCS Press, Champaign.
- **Rougou N. (2012)** Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. : Influence de quelques paramètres sur le rendement et la composition de l'huile essentielle. Mémoire de Magister, ENP, Département de Génie Chimique, Alger.

## Références bibliographiques

- **Scheler A. (1862)** Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne, Ed. Auguste Schnée, Bruxelles
- **Scherer R., Godoy H.T. (2009)** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method, Food Chemistry, 112: 654-658.
- **Schwarz K., Ternes W. (1992)** Antioxidative Constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpens, Z. Lebensm., Unters Forsch Vol. 195, p 99.
- **Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005)** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, J. Agric Food Chem., 53: 7749 -7759.
- **Spiro M., Chen S.S. (1994)** Kinetics of solvent extraction of essential oil from rosemary leaves, Flavour JMPEE, Vol. 29, N°4.
- **Tamura H., Yamasaki K., Isomoto K., Yoshikawa H. (2002)** Effect of the polyoxyethylene chain length of Triton X surfactants on the adsolubilisation of reconstituted wax model compound, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66(2) : 293-297.
- **Trambouz P., Wauquier J.P. (1975)** Le développement des procédés de raffinage et pétrochimie, Ed. TECHNIP, Paris, p. 242.
- **Trandafilov T., Minkov E. (1969)** Die Pharmazie, Vol.24, p.p. 327-328.
- **Van den Dool H., Kratz P. D. (1963)** J. of Chromatography, vol.11, p. 453.
- **Vareltzis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S. (1997)** Effectiveness of a natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage, Z Lebensm Unters Forsch A, Vol. 205, p.p. 93 – 96.
- **Wang, J.W., Hashimoto K., Shibamoto T. (1995)** Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in model meat system, J. agric food chim., 43: 2707-2712.
- **Willem J.P. (2002)** Les huiles essentielles: médecine d'avenir, Ed. Dauphin, Paris, p. 311.
- **Zheng, W. & Wang, S.Y. (2001)** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J. Agric Food Chem., 49: 5165-5170.

# **Webographie**

## *Webographie*

- **Site web [1]:** <http://www.mesantenaturelle.com/chroniques/herbier/romarin.php> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [2] :** <http://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [3]:** <http://www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [4]:** <http://www.pherobase.com> (consulté le 28.05.2014)