

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Présenté par :
M^{elle} ALMI Dalila

SUJET :

Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits polyphénoliques issus des olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) variété chamlal sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation : l'huile d'olive et l'huile de tournesol.

Devant le jury :

M^r MESBAHI MAHMOUD	Maître de conférences, A	UMMTO	Président
M^{me} MATI-MOULTI FARIDA	Maître de conférences, A	UMMTO	Rapporteur
M^r KECHA MOULOUD	Maître de conférences, A	U.BEJAIA	Examineur
M^r DJENANE DJAMEL	Maître de conférences, A	UMMTO	Examineur
M^r MESBAHI MAHMOUD	Maître de conférences, A	UMMTO	Examineur
M^r MOUSSAOUI RAMDANE	Maître de conférences, A	UMMTO	Examineur

REMERCIEMENTS

Grâce à ALLAH, le Tout -Puissant

Ma profonde gratitude s'adresse à M^{me} MATI-MOULTI F., maître de conférences en Biochimie à l'UMMTO, pour m'avoir proposé ce sujet. Son encadrement, la disponibilité qu'elle m'a accordée et sa bonne humeur ont été d'un concours inestimable dans la réalisation de ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Mr MATI A., professeur en Biochimie Appliquée à l'UMMTO, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail, ainsi que pour avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à présenter mes vifs remerciements aux membres de jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail :

- *Mr KECHA M., maître de conférences à l'université de Béjaïa.*
- *Mr MESBAHI M., maître de conférences à l'UMMTO.*
- *Mr MOUSSAOUI R., maître de conférences à l'UMMTO.*
- *Mr DJENANE D., maître de conférences à l'UMMTO.*

Un grand merci à l'ensemble du personnel du laboratoire et à ceux qui m'ont épaulé en dehors du laboratoire.

En fin, je remercie toutes personnes ayant de loin ou de près contribué à la réalisation de ce travail.

MERCI

Table des matières

Pages

Introduction	1
Première partie : Synthèse bibliographique	
1. Généralités sur les corps gras	
1.1 Définition.....	3
1.2. Classification.....	3
1.3. Composition.....	3
1.3.1. Triacylglycérols.....	3
1.3.2. Autres constituants.....	4
1.4. Propriétés physicochimiques.....	5
1.5. Rôles des corps gras.....	5
1.6. Caractéristiques des deux huiles analysées (tournesol, huile d'olive).....	6
1.6.1. Huile de tournesol.....	6
1.6.2. Huile d'olive.....	6
2. Altérations des corps gras alimentaires	
2.1. Altérations biologiques.....	8
2.2. Altérations chimiques.....	8
2.2.1. Acidification.....	8
2.2.2. Oxydation.....	8
2.2.2.1. L'auto oxydation.....	8
2.2.2.2. La photo oxydation.....	10
2.2.2.3. L'oxydation enzymatique.....	10
2.3. Les altérations thermiques.....	10
2.4. Facteurs accélérant l'oxydation.....	10
2.5. Facteurs retardant l'oxydation.....	11
2.6. Les conséquences des réactions d'altération des corps gras.....	11
2.7. Mesure de l'état d'oxydation	12
2.7.1. Détermination des produits résultant de l'oxydation.....	12
2.7.2. Evaluation de l'aptitude des composés à piéger les radicaux libres.....	12
2.7.3. Les tests accélérés.....	13
3. Les antioxydants et les mécanismes d'action	
3.1. Définition.....	14
3.2. Types d'antioxydants.....	14
3.2.1. Les antioxydants primaires ou radicalaires.....	14
3.2.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs.....	15
3.3. Les antioxydants des lipides alimentaires.....	15
3.3.1. Les antioxydants de synthèse.....	15
3.3.2. Les antioxydants naturels.....	16
3.3.2.1. Les tocophérols.....	16
3.3.2.2. Les caroténoïdes.....	17
3.3.2.3. Les composés phénoliques.....	18

3.3.2.4. Quelques extraits naturels utilisés comme antioxydants dans les huiles.....	32
3.3.3. L'efficacité des antioxydants.....	33

Deuxième partie : Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel.....	34
1.1.1. Matières premières.....	34
1.2. Appareillage.....	34
1.3. Produits chimiques et réactifs.....	34
1.2. Méthodes d'analyse.....	34
1.2.1. Extraction des polyphénols des olives, des feuilles et des margines.....	34
1.2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	35
1.2.3. Extraction et dosage colorimétrique des polyphénols totaux dans l'huile.....	35
1.2.4. Détermination de la capacité antiradicalaire	38
1.2.5. Détermination du pouvoir déducteur	38
1.2.6. Analyse des huiles.....	39
1.2.6.1. Détermination de l'indice d'acide.....	39
1.2.6.2. Détermination de l'indice de peroxyde.....	39
1.2.6.3. Test de l'acide thiobarbiturique).....	40
1.2.6.4. Capacité antioxydante.....	41

2. Résultats et discussion

2.1. Concentration des polyphénols extraits à partir des olives, des feuilles et margines...	42
2.2. Estimation de la capacité antioxydante des extraits obtenus.....	44
2.3. Détermination de la capacité réductrice.....	47
2.4. Analyse des différents paramètres de l'huile de tournesol enrichie lors du chauffage.	49
2.4.1. Évolution de l'indice de peroxyde.....	49
2.4.2. Evolution des substances réactives à l'acide thiobarbiturique	53
2.4.3. Evolution de l'acidité.....	55
2.4.4. Evolution des polyphénols totaux.....	58
2.4.5. Evolution de la capacité antioxydante.....	59
2.5. Analyse des différents paramètres de l'huile d'olive enrichie lors chauffage.....	61
2.5.1. Evolution de l'indice de peroxyde.....	61
2.5.2. Evolution des substances réactives à l'acide thiobarbiturique.....	63
2.5.3. Evolution de l'acidité.....	65
2.5.4. Evolution des polyphénols totaux.....	68
2.5.5. Evolution de la capacité antioxydante.....	69
2.6. Evolution des différents paramètres en présence de pomme de terre.....	71
2.6.1. Evolution de l'indice de peroxyde	71
2.6.2. Evolution de l'absorbance à 530 nm	73
2.6.3. Evolution de l'acidité.....	74
2.6.4. Evolution des polyphénols totaux.....	75
2.6.5. Evolution de la capacité antioxydante.....	77

Conclusion.....	78
------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	80
---	-----------

Liste d'abréviation

a : acide

AG : acide gras

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

CG : chromatographie en phase gazeuse

cp : composés phénoliques

Da : Dalton

DHPG : 3, 4-dihydroxyphénylglycol

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DO : densité optique

EC : électrophorèse capillaire

HO : huile d'olive

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HT : hydroxytyrosol

Ia : indice d'acide

Ip : indice de peroxyde

g : gramme

Kcal : kilocalorie

kg : kilogramme

Kjl : kilojoule

LDL : low density lipoprotein

M : mole

mg : milligramme

méq : milliéquivalent

min : minute

ml : millilitre

mM : micromole

MS : spectroscopie de masse

nd : non déterminé

nm : nanomètre

PG : gallate de propyle

ppm : partie par million

PPT : polyphénols totaux

PM : poids moléculaire

RMN : résonance magnétique nucléaire

RP-HPLC : chromatographie liquide à haute performance, phase reverse

TBHQ : tributylhydroquinone

TS : huile de tournesol

UV : Ultra Violet

µl : microlitre

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides (ALAIS <i>et al.</i> , 2003)	9
2	Conséquences de la peroxydation des lipides (FRENOT et VIERLING, 1997)	11
3	Réactions de rupture par l'antioxydant	14
4	Rupture de l'oxydation des lipides par l'antioxydant	14
5	Cycle chromane et structure de la chaîne isoprénoïde des tocophérols et des tocotriénols des huiles végétales (KHALIL, 2002)	17
6	Structure de la β -carotène (LÉGER, 2006)	18
7	Structure de la lycopène (DERBEL et GHEDIRA, 2005).	18
8	Structure générale des acides hydroxybenzoïques (ROBARDS <i>et al.</i> , 1999)	20
9	Structure générale des acides cinnamiques (phenylpropanoïdes) (ROBARDS <i>et al.</i> , 1999)	20
10	Structure de base des flavonoides (BECHEER, 2003).	21
11	Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes des polyphénols (MACHEIK <i>et al.</i> , 2005).	22
12	Mécanisme antioxydant des composés phénoliques (SHERWIN, 1978).	30
13	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des olives vertes (BERNES <i>et al.</i> , 2007)	37
14	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olive (GARIBOLDI <i>et al.</i> , 1986)	37
15	Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines (DE MARCO <i>et al.</i> , 2007)	38
16	Diagramme d'extraction et de dosage des composés phénoliques des huiles (CAPANNES <i>et al.</i> , 2000)	38
17	Réaction de réduction de DPPH \cdot par l'antioxydant (MOON et SHIBAMOTO, 2009).	39
18	Formation de substances réactives d'acide thiobarbiturique (MOON et SHIBAMOTO, 2009).	41
19	Courbe étalon de dosage des polyphénols des extraits phénoliques	43
20	Le pourcentage de neutralisation de DPPH des extraits méthanoliques et de l'acide gallique (a gal : acide gallique ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	45
21	Indice d'efficacité des extraits méthanoliques et de l'acide gallique (EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe, a gal : acide gallique)	46
22	Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et de l'acide gallique (a gal : acide gallique ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	49
	Évolution de l'Ip de l'huile de tournesol additionné avec 100 mg/kg	

23	des anti -oxydants lors du traitement thermique à 180°C (T : témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe)	50
24	Évolution de l'Ip de l'huile de tournesol (TS) enrichie avec 200mg/kg d'anti-oxydants lors du traitement thermique à 180°C (T: témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe)	50
25	Effet de l'ajout des antioxydants sur l'Ip de l'huile de TS après 150 min de chauffage à l'étuve à 180°C (a g : acide gallique ; a c : acide cafféique, van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).	53
26	Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants en fonction du temps de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	54
27	Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 200 mg/kg d'antioxydants en fonction du temps de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	54
28	Evolution de l'absorbance à 530 nm après 150mn de chauffage à 180°C de l'huile de TS enrichie avec 100 et 200 mg/kg d'antioxydants (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF EM EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe respectivement)	56
29	Evolution de l'indice d'acide lors de chauffage à 180°C de l'huile de TS additionnée de 100 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	57
30	Evolution de l'indice d'acide lors de chauffage à 180°C de l'huile de TS additionnée de 200 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	57
31	Effet de l'addition de 100 et 200mg/kg d'antioxydants sur l'Ia après 150mn de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	58

32	Courbe étalon de dosage des polyphénols des huiles	59
33	Évolution de l'Ip de HO enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants lors du traitement thermique à 180°C (T: témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF,EM,EP : extrait de feuilles, de margines, EP : extrait de pulpe)	62
34	Évolution de l'Ip de HO enrichie avec 200 mg/kg d'antioxydants lors du traitement thermique à 180°C (T: témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe)	62
35	Effet de l'addition de 100 et 200mg d'antioxydants et d'extraits phénoliques /Kg d'huile d'olives sur l'Ip après 150mn de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	63
36	Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants lors de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	64
37	Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 200mg/Kg d'antioxydants lors de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe)	65
38	Evolution de l'absorbance à 530nm après 150mn de chauffage à 180°C de l'huile de HO enrichie avec 100 et 200mg d'acides phénoliques et d'extraits phénoliques naturels /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	66
39	Evolution de l'indice d'acide lors de chauffage à 180°C de l'huile de HO additionnée de 100 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	67
40	Evolution de l'indice d'acide lors de chauffage à 180°C de l'huile de HO additionnée de 200 mg d'antioxydants /Kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	67

41	Effet de l'addition de 100 et 200 mg/kg d'antioxydants sur l'Ia après 150 min de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement)	68
42	Evolution de l'Ip de l'huile de tournesol en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	72
43	Evolution de l'Ip de l'huile d'olive en fonction de nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	73
44	Evolution de l'absorbance à 530nm en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol, EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	74
45	Evolution de l'absorbance à 530 nm en fonction de nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	74
46	Evolution de l'acidité de l'huile de tournesol en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	75
47	Evolution de l'indice d'acide de l'huile d'olive en fonction du nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)	76

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Composition globale et caractéristiques générales de l'huile de tournesol (LEE et <i>al.</i> , 2007)	7
II	Les principaux antioxydants synthétiques	15
III	Les différentes classes des composés phénoliques dans les plantes (FERGUSON, 2001)	19
IV	Les composés phénoliques de l'huile d'olive vierge (BENDINI et <i>al.</i> , 2007)	26
V	Quelques activités biologiques des CP de L'HO	31
VI	Quelques extraits naturels utilisés pour enrichir les huiles	33
VII	Concentrations des polyphénols des extraits des olives, feuilles et les margines (n = 3)	43
VIII	Activité antioxydante des extraits méthanoliques et de l'acide gallique exprimée en IC ₅₀	46
IX	Evolution des PPT après chauffage de TS à 180°C pendant 150 min	59
X	Evolution de la capacité antioxydante avant et après enrichissement	60
XI	Concentration en PPT avant et après chauffage de HO à 180°C	69
XII	La capacité antioxydante de HO avant et après 150mn de chauffage	70
XIII	Evolution des différents paramètres analysés après 150minutes de chauffage de deux huiles (TS, HO) enrichies avec 200mg/kg d'extrait de margines.	71
XIV	Evolution des PPT après 10 cycles de friture	76
XV	Evolution de la capacité antioxydante après 10 cycles de friture	78

Résumé :

La dégradation des lipides par l'oxygène moléculaire est la cause majeure de la détérioration des aliments pendant le stockage et le traitement thermique. Cette dégradation se manifeste au niveau organoleptique, nutritionnel et hygiénique. A fin de stabiliser les lipides, on a recours à certains antioxydants naturels ou synthétiques. Il existe une forte tendance à limiter les composés synthétiques malgré leur efficacité prouvée en industrie alimentaire, suspectés de toxicité. De ce fait, on s'intéresse de plus en plus à l'utilisation d'antioxydants naturels incorporés aux huiles. Dans ce travail, les composés phénoliques (CP) sont extraits à partir des olives vertes (pulpe), des feuilles de la variété *Chamlal* et à partir des margines issues des industries oléicoles. Ces CP sont utilisés en tant qu'antioxydant naturel, ainsi que les acides caféique et gallique, la vanilline et l'oleuropéine. Deux concentrations (100 et 200 mg/kg) sont additionnées à deux huiles végétales : huile d'olive (HO) et huile de tournesol (TS). L'oxydation de ces huiles est étudiée à une température de 180°C en présence de pomme de terre comme aliment de friture et en son absence suivant dix cycles de 15 min chacun. Cette oxydation est suivie par la mesure de l'indice de peroxyde (Ip), l'absorbance à 530 nm, l'acidité (Ia), le changement du contenu phénolique et l'évolution de la capacité anti oxydante par le test de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Les résultats obtenus montrent que les huiles contenant des antioxydants ont subi une détérioration moins accentuée que celles des témoins (sans ajout d'antioxydant). En effet, après chauffage, les valeurs des différents paramètres analysés de TS témoin sont : Ip=18méc d O₂/kg, Ia=9%, DO_(530nm)=0,750 et la capacité antioxydante est de 33 %. L'ajout d'extrait phénolique des margines à 200 mg/kg a contribué à une meilleure stabilité oxydative. Les valeurs des différents paramètres analysés sont plus faibles par rapport aux valeurs obtenus à partir des témoins ; ces valeurs sont : Ip= 10méc d' O₂/kg, Ia=0,45%, DO_(530nm)=0,210, contenu phénolique a diminué (147,7 mg/kg) et par conséquence, réduction de la capacité antioxydante (65,3%). Les valeurs de ces paramètres après chauffage de HO sont: Ip=34,8méc d' O₂/kg, Ia=3,5%, DO_(530 nm)=1,217, concentration des CP égale à 314 mg/kg et le pourcentage d'inhibition du DPPH est de 34,9%. Les valeurs de ces paramètres après l'addition de l'extrait de margines sont : Ip= 16,2méc d' O₂/kg, Ia=2,86%, DO_(530nm)=0,630. En parallèle, il s'est produit des réductions de contenu phénolique (705,6mg/kg) et de la capacité antiradicalaire (78,45%). L'acide caféique semble être plus efficace que l'acide gallique pour empêcher la dégradation oxydative des huiles. Les valeurs des différents paramètres analysés après l'ajout de l'acide caféique sont plus faibles que celles obtenus à partir des huiles témoins. Après l'ajout de l'acide caféique à 200 mg/kg, les valeurs obtenues avec l'huile de TS sont : Ip= 11méc d' O₂/kg, Ia=0,56%, DO_(530nm)=0,41 et le pourcentage de réduction du DPPH égale à 59%. Les valeurs obtenues avec l'huiles d'olive sont : Ip=24méc d' O₂/kg, Ia=2,98%, DO_(530nm)=0,8 et la capacité antiradicalaire est réduite (59,8%). La vanilline est sans effet sur l'oxydation thermique des deux huiles étudiées par contre l'oleuropéine montre une activité antioxydante qui se rapproche de celles des extraits de feuilles et de la pulpe. A l'issue de ces résultats, on constate que l'huile de tournesol a subi plus d'oxydation comparativement à l'huile d'olive. Ceci est dû à la présence des polyphénols qui existent naturellement dans cette dernière.

Le pouvoir antioxydant des extraits phénoliques et des phénols individuels diminue dans l'ordre suivant : extrait de margines > extrait de feuilles ≈ extrait de pulpe ≈ acide caféique > oleuropéine > acide gallique > vanilline.

Mots clés : Huiles végétales, altération thermique, oxydation, antioxydants, polyphénols, olive, feuilles d'olives, margin

Abstract :

The degradation of lipids by molecular oxygen is the major cause of food spoilage during storage and heat treatment. This degradation manifests itself in taste, nutrition and hygiene. At the end of stabilizing lipids, are used to certain natural or synthetic antioxidants. There is a strong tendency to limit the synthetic compounds despite their proven effectiveness in the food industry, suspected toxicity. In this work, the phenolic compounds (PC) are extracted from green olives (pulp), leaves of the Chamlal variety and olive mill waste waters (OMWW). These PC are used as natural antioxidant, as well as caffeic and gallic acids, vanillin and oleuropein. Two concentrations (100 and 200mg/kg) are added in two vegetable oils: olive oil (HO) and sunflower oil (TS). The oxidation of these oils is studied at a temperature of 180 °C in the presence of potato as food and cooking in his absence after ten cycles of 15min each. This oxidation is followed by measuring the peroxide value (Ip), absorbance at 530nm, acid value (Ia), the change in phenolic content and the evolution of the anti oxidant capacity by the test of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The results show that oils containing antioxidants has deteriorated less pronounced than those of controls (without addition of antioxidant). Indeed, after heating, the values of various parameters are analyzed for TS control: Ip = 18méq of O₂/kg, Ia=0.9%, OD(530nm)=0.750 and antioxidant capacity is 33%. The addition of phenolic of OMWW at 200mg/kg has contributed to a better oxidative stability. The values of various parameters analyzed were lower than the values obtained from witnesses, and these values are: Ip=10méqO₂/kg, Ia=0.45%, OD(530nm)=0.210, phenolic content decreases (147.7mg/kg) and consequently, reduced antioxidant capacity (65.3%). The values of these parameters after heating HO are: Ip=34.8meqO₂/kg, Ia=3.5%, OD(530 nm)=1.217, concentration of PC equal to 314mg/kg and the percentage of inhibition of DPPH was 34.9%. The values of these parameters after the addition of the extract of OMWW are: Ip= 16.2meqO₂/kg, Ia=2.86%, OD(530nm)=0.630. In parallel, there have been reductions in phenolic content (705.6mg/kg) and scavenging capacity (78.45%). Following these results, we find that sunflower oil has undergone more oxidation compared with olive oil. This is due to the presence of polyphenols that occur naturally in the latter.

Caffeic acid seems to be more effective than gallic acid to prevent oxidative degradation of oils. The values of the parameters analyzed after the addition of caffeic acid are lower than those obtained from oils witnesses. After the addition of caffeic acid at 200mg/kg, the values obtained with the oil of TS are: Ip=11méqO₂/kg, Ia=0.56%, OD(530 nm)=0.41 and the percentage of DPPH reduction equal to 59%. The values obtained with the olive oils are: Ip= 24meqO₂/kg, Ia=2.98%, OD(530 nm)=0.8 and scavenging capacity was reduced (59.8%). Vanillin had no effect on the thermal oxidation of the two oils studied by cons oleuropein showed an antioxidant activity which is close to those of leaf extracts and pulp.

The antioxidant properties of phenolic extracts and individual phenols decreases in the following order: extract of OMWW> leaf extract pulp extract ≈ caffeic acid> oleuropein> gallic acid>vanillin.

Keywords: Vegetable oils, thermal alteration, oxidation, antioxidants, polyphenols, olive, olive leaves, olive mill waste waters (OMWW).

Introduction

Introduction

Les huiles végétales telles l'huile d'olive et l'huile de tournesol tiennent une place importante dans la nutrition humaine en effet les lipides sont indispensables à notre alimentation, ils doivent apporter 1/3 de notre énergie quotidienne. Ils ont un rôle nutritionnel sur les plans énergétique et métabolique et sont intéressants par leurs apports en acides gras essentiels et vitamines liposolubles. Ces huiles sont utilisées dans l'alimentation pour les fritures, les plats cuisinés et dans l'assaisonnement. Comme tout aliment, des qualités organoleptiques, nutritionnelles, hygiéniques sont requises car tout manquement pourrait avoir une répercussion directe sur la santé humaine.

Les huiles issues des graines oléagineuses comme l'huile de tournesol sont riches en tocophérols et presque dépourvues de composés phénoliques (FRITSCH *et al.*, 1997 ; SALTA *et al.*, 2009). Quant à l'huile d'olives celle-ci contient les polyphénols, les caroténoïdes et les tocophérols (OWEN *et al.*, 2000 ; CERRETANI *et al.*, 2007 ; MINIOTI et GEORGIU, 2010). Malgré leur contenu en substances anti oxydantes comme les polyphénols ou les tocophérols, ces huiles peuvent être soumises à des altérations qui peuvent être de différents ordres. Durant le stockage, le traitement thermique et la friture, la détérioration graduelle de l'huile prend place dû aux réactions de décomposition à savoir l'hydrolyse, l'oxydation, l'isomérisation et la polymérisation (GERTZ *et al.*, 2000 ; GÓMEZ-ALONSO *et al.*, 2003, LEE *et al.*, 2007). L'oxydation est la cause principale de détérioration des huiles. En effet, cette dégradation oxydative dépend de plusieurs facteurs : composition en acides gras de l'huile, présence d'antioxydants ou pro oxydants, température, présence d'oxygène, de métaux lourds, (KALOGIANNI *et al.*, 2009). En effet, la conséquence de cette dégradation est la perte des qualités organoleptiques, nutritionnelles et hygiéniques (WARNER, 2002 ; MATEOS *et al.*, 2006).

Les antioxydants naturels ont prouvé leurs effets protecteurs contre l'oxydation des huiles (LOLOS *et al.*, 1999 ; GERTZ *et al.*, 2000 ; ABIDI et RENNICK, 2003 ; WARNER et MOSER, 2009). Cependant, la quantité des antioxydants naturels n'est pas toujours suffisante pour stabiliser les huiles, d'où la nécessité d'addition des antioxydants synthétiques. Les plus utilisés par l'industrie agroalimentaire sont : le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le tributylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyl (PG), du fait de leurs avantages (AUGUSTIN et BERRY, 1983 ; GORDON et KOURKIMSKA, 2006). Malheureusement, plusieurs rapports indiquent que ces antioxydants peuvent avoir des effets carcinogéniques (REDDY *et al.*, 2005 ; SHAHIDI *et al.*, 2008) et sont actuellement mal acceptés par la plupart des consommateurs (CARPIŃSKA *et al.*, 2001 ; ALLAM et EL-SAYED, 2004 ;). Il existe une forte tendance à limiter leur utilisation malgré leur efficacité et favoriser l'utilisation des antioxydants naturels comme alternative des premiers (GIESE, 1996 ; CHIOU *et al.*, 2007 ; SALTA *et al.*, 2009). De ce fait, les industries agroalimentaires développent l'utilisation des antioxydants naturels et surtout leur incorporation dans les huiles destinées à la friture (MOURE *et al.*, 2001 ; PESCHEL *et al.*, 2006 ; CHIOU *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, les polyphénols captent l'intérêt des chercheurs et occupent une place impressionnante parmi plusieurs recherches menées depuis plus d'une dizaine d'années, concernant le concept d'alimentation santé (FALLEH *et al.*, 2008 ; BONDIA-PONS *et al.*, 2009 ; CHEW *et al.*, 2009).

Les olives et les feuilles d'olives de la famille *Olea Europaea* regorgent de composés phénoliques (simples et complexes). Lors de l'extraction de l'huile, 2% de la fraction phénolique passe dans la phase huileuse et 98% se retrouve dans la phase aqueuse (eaux de végétation) (RODIS *et al.*, 2002 ; OBEID *et al.*, 2007).

La fraction phénolique de l'huile d'olive est responsable de la bonne stabilité oxydative des huiles d'olives vierges (CARRASCO-PANCORBO *et al.*, 2005 ; BENDINI *et al.*, 2007). En plus de leurs propriétés antioxydantes puissantes, les composés phénoliques possèdent des propriétés nutritionnelles (protection contre le stress oxydatif) et organoleptiques (amertume et astringence de certains aliments) (AMIOT *et al.*, 1986 ; VISIOLI *et al.*, 2000 ; BONDIA-PONS *et al.*, 2009).

Les feuilles, site principal du métabolisme de la plante, représentent une source principale de polyphénols (ERBAY et ICIER, 2009). Selon MARTIN-GARCIA *et al.*, (2003) et FERREIRA *et al.*, (2007), elles constituent l'un des sous produits de l'industrie oléicole (10% de poids total des olives).

L'industrie oléicole génère de larges quantités des eaux de végétation qui se caractérisent par la présence des substances bioactives particulièrement les biophénols ayant des propriétés antioxydantes intéressantes (OBEID *et al.*, 2005 ; GONÇALVES *et al.*, 2009).

Il est clair qu'une tentative de valoriser les polyphénols des olives, des feuilles de la variété *Chamlal* et des margines présente un intérêt pour des applications en agroalimentaire. Le choix de la variété *chamlal* est du à sa prédominance variétale, en effet le patrimoine oléicole de la wilaya de Tizi-Ouzou se caractérise par une culture monovariétale : 90% de l'olivieraie de la wilaya est composée de la variété *Chamlal* et 10% de la variété *Azeradj*.

La présente étude est menée pour :

- appliquer des méthodes simples d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles et des olives de la variété *Chamlal*, ainsi qu'à partir des margines ;
- tester le pouvoir antioxydant de ces extraits phénoliques sur deux huiles végétales, largement consommées. Les huiles de tournesol et d'olives représentent respectivement 40% et 20% des achats ;
- afin de cibler les activités individuelles des polyphénols, deux acides phénoliques (acide caféique et acide gallique), un sécoiridoïde (oleuropéine) et un aldéhyde (la vanilline) ont été choisis. Le choix de ces polyphénols est dicté également par leur prépondérance soit au niveau de la feuille comme l'oleuropéine soit au niveau des produits et sous produits comme le cas des autres phénols.

L'évolution de l'oxydation est étudiée à travers plusieurs paramètres (l'acidité, l'indice de peroxyde, l'absorbance à 530 nm, capacité anti oxydante) et ceci sous deux conditions :

- Chauffage à une température simulant la friture $180 \pm 5^\circ\text{C}$ suivant dix cycles de 15min chacun après refroidissement;
- Les tests sont faits en présence et en absence d'aliment (la pomme de terre est utilisée, étant l'aliment le plus usuellement utilisé en friture).

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les corps gras alimentaires

1.1. Définition :

Les corps gras correspondent à la partie « neutre » de la fraction lipidique des huiles et des graisses. Ils se présentent sous forme de microgouttelettes dans certains tissus animaux et végétaux. Les huiles sont des corps gras liquides à la température de 15°C, tandis que les graisses sont plus ou moins solides à cette température (TREMOLIERE et *al.*, 1984).

1.2. Classification :

POISSON et NACRE (2003) ont subdivisé les lipides en :

- Huiles végétales fluides : huiles d'arachide, de colza, de tournesol, de soja, d'olive, de noix ;
- huiles végétales concrètes (ou graisses) : huile de palme ;
- huiles et graisses d'origine animale terrestre: saindoux (graisse de porc), suif (graisse de bœuf ou de mouton) ;
- huiles et graisses marines : baleine, poisson ;
- corps gras élaborés : beurres, margarines.

1.3. Composition :

Les lipides alimentaires sont composés essentiellement de triacylglycérols (triglycérides) (90 à 99%) et de constituants mineurs (1 à 5%) (KHAN et SHAHIDI, 2001).

1.3.1. Triacylglycérols :

Les triacylglycérols (les triglycérides) sont les constituants majeurs des lipides. Les di- et les monoacylglycérols représentent moins de 2% du total lipidique. Un triacylglycérol est constitué d'une molécule de glycérol sur laquelle sont estérifiés trois acides gras.

➤ **Glycérol (propane triol 1,2 et 3)**: il a deux fonctions alcool primaires identiques et une fonction alcool secondaire.

➤ **Acides gras (AG)**: Les AG se trouvent en petites quantités à l'état libre, mais en grandes quantités engagés dans les liaisons ester ou amide. En général, les AG sont monocarboxyliques à chaîne linéaire non ramifiée, comprenant un nombre pair d'atomes de carbone (entre 4 et 40) (WELL, 2005). Ils représentent 90 à 96% de la masse molaire des triacylglycérols. La structure de la chaîne carbonée, qui peut comporter soit des liaisons simples, soit des liaisons éthyléniques (doubles liaisons), permet de les classer en :

▪ **Acides gras saturés** : leur formule générale est $C_nH_{2n}O_2$ ou $CH_3(CH_2)_nCOOH$. Le point de fusion s'élève quand le nombre d'atome de carbone s'accroît. Les corps gras ne renferment que peu d'acides gras à plus de 24 atomes de carbone.

▪ **Acides gras insaturés** : dans la formule la plus simple, deux carbones voisins ont perdu chacun un atome d'hydrogène. Certains acides comportent une seule double liaison (monoéthylénique), d'autres en comportant 2, 3, 4, 5 ou même 6 (polyéniques ou polyinsaturés). Possédant une ou plusieurs doubles liaisons, relativement instables, ils peuvent être l'objet de réactions d'addition. Les acides gras insaturés les plus répandus sont :

-**Acide oléique C₁₈:1** : le plus abondant et le plus répandu des monoéthyléniques de l'huile d'olive.

-**Acide linoléique C₁₈:2 (n-6)**: abondant dans certaines huiles végétales (soja, tournesol, arachide.

-**Acide α linolénique C₁₈:3 (n-3)**: c'est l'acide gras principale des feuilles, des tiges et des racines.

1.3.2. Autres constituants :

Parmi les constituants mineurs, on distingue les phosphatides, les cériques, l'insaponifiable, les chlorophylles et les produits d'altération (POISSON et NACRE, 2003).

- **Phosphatides** : ce sont essentiellement des phosphoglycérides (phosphoryl-3-glycérol), présents dans les corps gras bruts.
- **Cériques** : ce sont des esters d'AG et de mono-(ou di-) alcools insolubles dans l'eau. On distingue :
 - ✓ Les cires naturelles (esters d'AG et de monoalcools aliphatiques) : présentes chez les animaux et les végétaux (contribuent à la formation de couches monoprotectrices des graines et des fruits) ;
 - ✓ les stérides : esters de stérols ou de molécules assimilées (méthylstérols et alcools triterpéniques) ;
 - ✓ les caroténocérides (lipochromes) à alcools colorés, différents des esters de chlorophylle, dans lesquels l'acide est le chromophore, sont des esters d'AG et d'hydroxycaroténoïdes ou xanthophylles, synthétisés uniquement par les végétaux.
- **Insaponifiables** : Cette fraction qui représente en général 0,2 à 2% d'un lipide non raffiné, comprend l'ensemble des constituants qui, après hydrolyse basique (saponification) sont très peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants des matières grasses (hexane, heptane, éther de pétrole, chloroforme,...). Les constituants chimiques de l'insaponifiable sont principalement :
 - Les hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés ;
 - les hydrocarbures triterpéniques ou tetraterpéniques ;
 - les alcools triterpéniques penta- ou tétracycliques ;
 - les pigments (carotènes, xanthophylles) ;
 - des alcools gras (produits de saponification des cires) ;
 - des vitamines (A, D, E).
- **Chlorophylles et dérivés** : ce sont des pigments verts des végétaux. Ils sont liposolubles du fait de la présence de la chaîne phytyle (LANFER-MARQUEZ et *al.*, 2005).
- **Produits d'altération** : Les huiles et graisses brutes obtenues industriellement à partir des matières premières stockées contiennent des AG libres, conséquence d'une dégradation biochimique des triglycérides, et des produits d'oxydation, dus à l'action de l'oxygène de l'air, pouvant engendrer des saveurs désagréables.

1.4. Propriétés physicochimiques :

La longueur de leur chaîne et le degré d'insaturation ont une influence importante sur les propriétés des lipides (ALAIS et *al.*, 2003) :

➤ Propriétés physiques :

- Les lipides sont insolubles dans l'eau ; ceci est dû aux groupements méthyles et aux chaînes carbonées des AG. Ils sont solubles dans les solvants organiques (éther, cétone,...);
- les lipides insaturés absorbent les radiations UV du spectre, du fait des liaisons dites conjuguées;
- les lipides bipolaires sont solubles dans l'eau, leur mélange forme des systèmes micellaires ou des émulsions.

➤ Propriétés chimiques : elles sont à la fois celle de la fonction ester et celle de la double liaison. On peut citer : l'hydrolyse acide ou enzymatique, l'estérification, la saponification, les réactions d'addition (hydrogénation) et la polymérisation oxydative (ALAIS et *al.*, 2003).

1.5. Rôles des corps gras :

Les corps gras alimentaires prennent une place considérable dans l'alimentation humaine et ce, en raison de diverses propriétés qu'ils possèdent :

➤ Aspect nutritionnel :

- Apport énergétique élevé 9Kcal/g (37 à 38KJl/g) ;
- apport d'acides gras essentiels ;
- apport des vitamines liposolubles (A, D, E, K), des antioxydants (tocophérols,.....) ;
- apport en phytostérols qui jouent un rôle hypocholestérolémiant.

➤ Aspect organoleptique :

- Les corps gras contribuent fortement à l'attrait sensoriel des aliments ;
- agents de texture dans la préparation des pâtes brisées, feuilletées, sablées ou dans la garniture des préparations culinaires ;
- agents de sapidité ;
- supports d'aromes ou de précurseurs des molécules aromatiques.

➤ Aspect technologique :

- Moyen de transfert de la chaleur pendant la friture;
- modification et contrôle de la viscosité;
- barrière contre l'humidité, l'oxygène et les microorganismes;
- agents structurant les aliments riches en graisse comme la mayonnaise et le beurre;
- agents émulsifiant.

➤ Aspect biologique :

- Composés entrant dans la structure membranaire des cellules (phospholipides) ;
- agissent comme réserve d'énergie et des molécules carburants ;
- précurseurs d'hormones.

1.6. Caractéristiques des huiles de tournesol et d'olive :

Les huiles végétales sont essentiellement constituées de triglycérides (99%), eux-mêmes composés d'acides gras et de glycérol ; le 1% restant se compose de phospholipides, de lipides complexes, de constituants non triglycéridiques comme la vitamine E et les phénols.

Les caractéristiques de chaque huile dépendent de la nature des acides gras contenus dans leurs lipides, de la région de provenance, des conditions pédoclimatiques, de la variété et du degré de maturation des fruits ou graines. De plus, la composition triglycéridique et la présence des antioxydants déterminent la stabilité oxydative des huiles.

1.6.1. Huile de tournesol:

L'huile de tournesol (TS) est extraite des graines d'*Helianthus annuus*. Elle possède des qualités gustatives et une valeur alimentaire qui lui permettent de tenir une place de choix parmi les autres huiles de grande consommation (MOHAMED, 2007 ; POIANA et al., 2009). Après traitement, on obtient une huile claire sans goût particulier, classée dans les huiles hautement polyinsaturées (67% d'acides gras polyinsaturés essentiellement acide linoléique), riche en phytostérols. A l'image des autres huiles, le TS se compose essentiellement de triglycérides et de composés mineurs. Elle comprend : 12% d'acides gras saturés, 21% d'acides monoinsaturés (dont 19% d'acide oléique), 67% d'acides polyinsaturés comprenant essentiellement l'acide linoléique) et les antioxydants lipophiles.

1.6.2. Huile d'olive:

L'huile d'olives (HO) provient uniquement du fruit de l'olivier (*Olea Europaea L.*). On peut la considérer comme un ingrédient du régime méditerranéen. Elle a de bonnes propriétés organoleptiques et nutritionnelles, contient une faible quantité d'acides gras polyinsaturés, riche en polyphénols ce qui la caractérise des autres huiles végétales (GALLI et VISIOLI, 1999 ; VISSERS et al., 2004 ; CERRETANI et al., 2007 ; KIRALAN et al., 2009). Elle se caractérise par l'abondance des acides gras monoinsaturés en particulier l'acide oléique (50-85%). Parmi les acides gras polyinsaturés, elle comprend essentiellement l'acide linoléique (3-20%).

La composition globale en AG, autres constituants ainsi que les caractéristiques physicochimiques de deux huiles sont représentés dans le tableau I.

Tableau I: Composition globale et caractéristiques générales de l'huile de tournesol et de l'huile d'olives (LEE et al., 2007).

	Huile de tournesol	Huile d'olive
Composition en AG (%) :		
-acide palmitique C ₁₆ : 0	5,3 ± 0,28	10,2 ± 0,28
-acide palmitoléique C ₁₆ : 1	0,2 ± 0,02	1,3 ± 0,07
-acide stéarique C ₁₈ : 0	3,3 ± 0,09	3,6 ± 0,07
-acide oléique C ₁₈ : 1	40,9 ± 0,18	75,8 ± 0,41
-acide linoléique C ₁₈ : 2	49,7 ± 0,23	7,9 ± 0,21
-acide linoléique C ₁₈ : 3	0,2 ± 0,03	0,7 ± 0,04
Composition en insaponifiables :		
-Squalène (mg/100g)	15-20	300-700
-Phytosterols (mg/100g)	325-515	80-180
-Campésterol (mg/100g)	31	12
-Stigmastérol (mg/100g)	30	1
-polyphénols (ppm)	nd	180,8
-Tocophérols (ppm) :		
-α	266 ± 14,26	104 ± 4,07
-β	19 ± 3,26	nd
-γ	4,9 ± 7,37	nd
-δ	nd	nd
Caractéristiques physicochimiques :		
-Acidité (% en acide oléique)	0,6 ± 0,03	1,4 ± 0,12
-Indice de peroxyde (méc O ₂ /kg oil)	1,7 ± 0,14	10,4 ± 0,64
-p-anisidine	6,9 ± 0,34	5,8 ± 0,53

II-Altérations des corps gras alimentaires

Les corps gras sont des constituants susceptibles de subir de nombreux changements durant leur traitement technologique ou leur conservation dont les plus notables résultent de leur acidification et de leur oxydation. L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire qui utilise de plus en plus d'acides gras hautement insaturés. On distingue plusieurs types d'altérations : des altérations biologiques, chimiques et thermiques.

2.1. Altérations biologiques :

Les huiles végétales sont peu altérées par les micro-organismes ; elles subissent surtout des changements physico-chimiques. Cependant, les germes lipolytiques peuvent parfois participer à des phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation pourtant le contrôle microbiologique des huiles est rarement appliqué (GUIRAUD, 2003).

2.2.1. Altérations chimiques :

2.2.1.1. Acidification:

L'acidification résulte d'après SERVILLI (2008) de l'hydrolyse d'un, deux ou trois liaisons esters. L'hydrolyse peut être de nature enzymatique (action des lipases) ou chimique et elle conduit à la formation d'acides gras libres et de glycérides partiels.

Ce phénomène ne s'observe pratiquement jamais sur les huiles raffinées car les enzymes responsables sont éliminées au cours de raffinage, il peut cependant intervenir sur les huiles brutes et sur les huiles de friture (ALUYOR et ORIJEU, 2008). Les acides gras (AG) libérés sont préjudiciables à la qualité du corps gras, ils s'oxydent plus vite et donnent un goût désagréable.

2.2.1.2. L'oxydation :

L'oxydation est un phénomène extrêmement répandu, les substrats de ces réactions sont principalement les acides gras polyinsaturés ; ils s'oxydent en général plus vite à l'état libre que lorsqu'ils font partie des molécules de triacylglycérols ou de phospholipides.

En fonction des agents initiateurs, POKORNY (2003) a classé l'oxydation en trois types :

- Auto oxydation : elle est catalysée par la température, les ions, les radicaux libres.
- Oxydation enzymatique : catalysée par les lipoxygénases.
- Photo oxydation : catalysée par la lumière en présence de photosensibilisateurs (chlorophylles, phéophytines, phéophorbines).

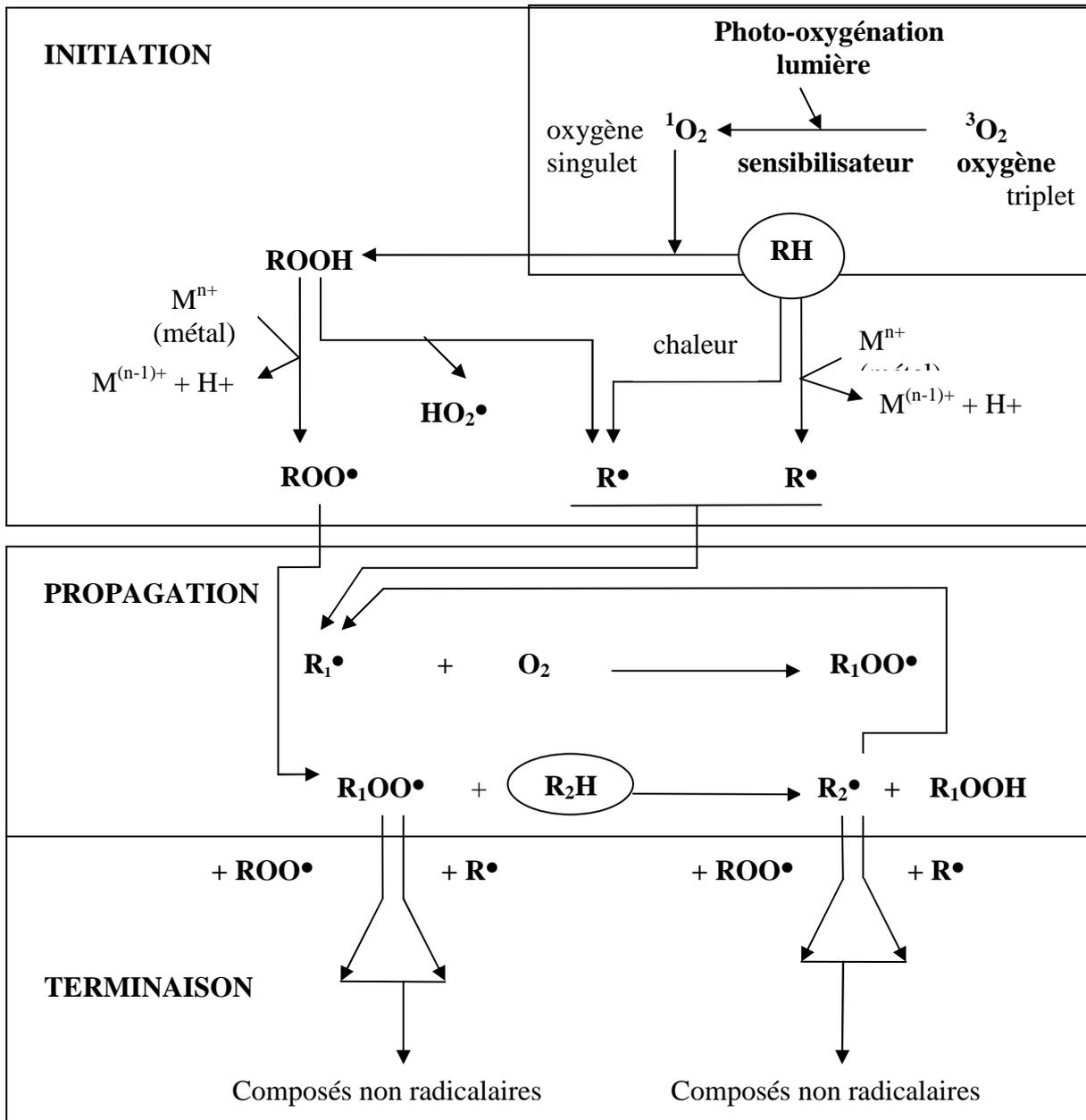
2.2.1.2.1. L'Auto oxydation :

Dans les aliments, l'auto-oxydation est le phénomène le plus important suivi par la photo-oxydation. L'auto-oxydation est une réaction en chaîne de radicaux libres se déroulant en trois étapes : initiation, propagation et terminaison (figure 1).

➤ **Initiation** : La première étape est la formation de radicaux libres à partir des lipides, ils sont produits par l'arrachement d'un proton de l'insaturation des AG. La réaction peut être déclenchée par l'irradiation, la chaleur et très souvent par réaction avec un radical libre.

➤ **Propagation** : c'est une réaction radicalaire en chaîne et rapide. Elle consiste en une profusion de radicaux libres qui progressivement fixent de l'oxygène. La propagation génère des hydroperoxydes (ROOH) (ALAIS et *al.*, 2003). La réaction en chaîne est courte à haute température et dans les systèmes polyinsaturés tels que les huiles de friture.

➤ **Réaction d'arrêt**: les radicaux libres s'associent donner des composés non radicalaires.



(**RH** : acide gras libre, **R•** : radical libre, **ROO•** : radical peroxyde, **ROOH** : hydroxyperoxyde, **RO•** : radical alkoxyde, **OH•** : radical hydroxyle)

Figure 1 : Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides (ALAIS et *al.*, 2003).

2.2.1.2.2. La photo-oxydation:

La photo-oxydation des AG insaturés est basée sur le fait que l'oxygène peut se trouver dans un état singulet et réagit facilement avec les insaturations. Dans ce mécanisme d'altération, les pigments et les colorants alimentaires peuvent agir comme photosensibilisateur grâce à leur capacité à absorber la lumière. Ce type d'oxydation n'est pas inhibée par les substances qui piègent les radicaux libres.

2.2.1.2.3. Oxydation enzymatique :

C'est une réaction radicalaire en chaîne qui se déroule de façon similaire à l'auto-oxydation. Les lipoxygénases (lipoxydases) sont très répandues dans les règnes végétal et animal. En général, ces enzymes exigent des AG libres comme substrat, bien qu'il y ait quelques isoenzymes qui réagissent avec les triglycérides. Ces enzymes sont actives à basse température et peuvent donc limiter la durée de conservation des produits surgelés. Ce type d'oxydation peut être ralenti par les antioxydants phénoliques.

2.3. Altérations thermiques :

Les cycles successifs de chauffage et de refroidissement aux quels sont soumis les corps gras lors de leur utilisation en friture provoquent de nombreuses transformations en particulier sur les AG insaturés. Ces transformations résultent de réactions complexes : oxydation, polymérisation, hydrolyse, cyclisation et pyrolyse (AUGUSTIN et BERRY, 1983 ; QUILES *et al.*, 2002 ; KALOGIANNI *et al.*, 2009). Les produits de dégradation des huiles sont généralement des composés volatils et non volatils.

La fraction volatile est essentiellement constituée d'aldéhydes saturés et insaturés, cétones, alcools, AG courts, esters. La quasi-totalité de ces produits est entraînée par le dégagement de la vapeur qui accompagne toute friture. Les produits non volatils de PM élevé (polymers, acides oxydés, monomères cycliques) restent dans l'huile, et donc une partie peut être absorbée par l'aliment (ALLAM et EL-SAYED, 2004 ; NAVAS *et al.*, 2007).

2.4. Facteurs accélérant l'oxydation :

Le comportement des lipides vis-à-vis de l'oxydation est très variable, ces variations peuvent être expliquées selon ALYOR et ORI-JESU (2008) par l'influence de différents facteurs qui sont :

- **Teneur en oxygène** : la dégradation des lipides par l'oxygène est la cause majeure de la détérioration des corps gras pendant le stockage.
- **Lumière** : elle active le phénomène de l'oxydation en accélérant la réaction d'initiation.
- **Température** : elle favorise également l'oxydation en augmentant la vitesse de décomposition des peroxydes. Les AG saturés ne se décomposent qu'à une température supérieure à 60°C, tandis que les polyinsaturés s'oxydent même lors de l'entreposage des aliments à l'état congelés.
- **Traces métalliques** : il est estimé que le fer et le cuivre à des concentrations de moins de 1ppm peuvent causer une réduction notable de la stabilité des corps gras (SHERWIN, 1978 ; ALYOR et ORI-JESU, 2008). Ce problème est amplifié par la présence d'AG libres qui agissent en solubilisant les métaux dans les lipides.

- **Teneur en AG libres** : les AG libres sont plus sensibles à l'oxydation que ceux estérifiés.
- **Enzymes** : la présence de lipoxygénases accélère le processus d'oxydation.

2.5. Les facteurs retardant l'oxydation :

L'oxydation est un processus de détérioration qui ne peut être que retardé. La connaissance des facteurs provoquant l'oxydation permet de développer des stratégies pour retarder ou contrôler l'oxydation des lipides durant leur stockage, leur commercialisation et même après leur vente.

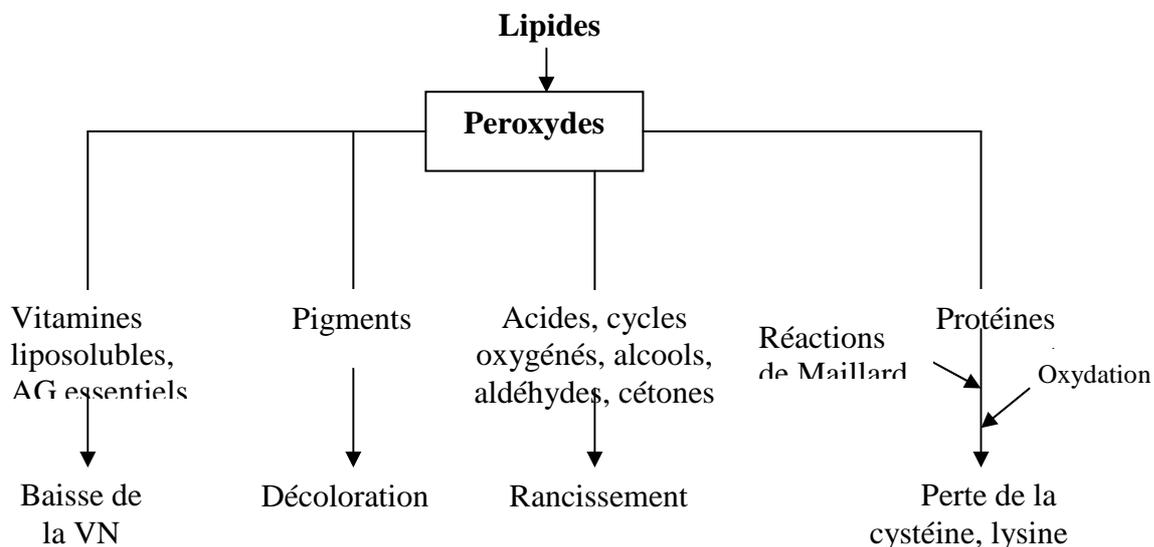
Pour limiter les réactions d'oxydation, l'industrie agroalimentaire utilise plusieurs moyens qui sont :

- Conservation des corps gras à basse température et à l'abri de la lumière.
- Exclusion de l'oxygène par conservation des huiles sous vide ou par utilisation des fixateurs d'oxygène (acide ascorbique).
- Destruction des enzymes d'oxydation (polyphénoloxydases) par blanchiment.
- Emploi d'agents de complexation des métaux lourds (acide citrique).
- Neutralisation des radicaux libres par l'emploi d'antioxydants naturels ou synthétiques.

2.6. Les conséquences des réactions d'altération des corps gras :

L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement), nutritionnelles (perte des vitamines liposolubles, acides gras essentiels (AGE) voir même toxicité due aux produits issus de la peroxydation des lipides (figure 2).

Les composés carbonyles peuvent réagir avec les protéines ou plus généralement favoriser le brunissement non enzymatique.



AG : Acides gras, VN : valeur nutritionnelle

Figure 2: Conséquences de la peroxydation des lipides (FRENOT et VIERLING, 1997).

2.7. Mesure de l'état d'oxydation :

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou de mélanges ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H[•].

2.7.1. Détermination de produits résultant de l'oxydation :

La détermination des produits résultant de l'oxydation peut se faire par :

- La mesure de la disparition des acides gras au cours du temps par chromatographie en phase gazeuse ;
- par le suivi de l'apparition des produits primaires d'oxydation (détermination de l'indice de peroxyde, de l'absorbance en UV à 234nm) ;
- par le suivi de l'apparition des produits secondaires d'oxydation : composés volatils, aldéhydes et les composés oxydés par la détermination de l'indice de *p*-anisidine, le test à l'acide thiobarbiturique (substances réactives de l'acide thiobarbiturique), de l'absorbance à 270nm.

2.7.2. Evaluation de l'aptitude des composés à piéger les radicaux libres :

➤ Test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) :

Le DPPH est un radical organique stable. Le test de DPPH est très utilisé pour estimer la capacité des antioxydants à neutraliser les radicaux libres. L'effet d'un antioxydant est proportionnel à la disparition de radical DPPH. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour quantifier ce radical dans différents systèmes : méthode spectroscopique par résonance électronique, RMN et spectrophotométrie (MOON et SHIBAMOTO, 2009). Cette dernière est la plus exploitée actuellement, le DPPH[•] montre une forte absorption à 517 nm. L'effet antioxydant peut être facilement évalué en suivant la diminution de l'absorption à 517nm.

➤ Test à l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique) (ABTS):

Ce test est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des composés dans les aliments et les boissons. L'activité antioxydante des produits naturels (composés phénoliques, caroténoïdes,...) est déterminée par la décoloration de la solution d'ABTS, en mesurant l'absorption à 734nm (GÜLÇİN, 2006, MOON et SHINAMOTO, 2009).

➤ Test de décoloration de β-carotène (BCB) : Bleaching β-carotène test):

Le β-carotène réagit avec les radicaux peroxy et produit les époxydes de β-carotène. Ce test se base sur la décoloration de la couleur jaune de β-carotène due à sa réaction avec les radicaux libres. La capacité antioxydante est évaluée par mesure de la diminution de l'absorbance à 470nm (PRATT, 1980 ; KUSILIC et *al.*, 2004 ; MOON et SHINAMOTO, 2009).

2.7.3. Les tests accélérés :

- **Test SWIFT ou Active Oxygen Method (AOM) :** ce test consiste à faire barboter un courant d'air dans un échantillon de matière grasse maintenu à 98°C. Suivre la variation de l'indice de peroxyde et évaluer ainsi la période d'induction (temps nécessaire pour que la valeur de l'indice de peroxyde soit égale à 100 méq d'O₂/ kg de matière grasse) (RAHMANI, 2007).

- **Utilisation de l'appareil Rancimat :** C'est un appareil commercialisé depuis quelques années, et qui réalise un test d'oxydabilité accélérée. Ce test est très utile pour apprécier l'effet de l'addition d'un antioxydant. Un flux d'air traverse un échantillon chauffé à 105°C, les corps volatils générés par l'oxydation sont recueillis dans un récipient contenant de l'eau distillée. L'augmentation de la conductivité de l'eau représente la résistance de l'échantillon à l'oxydation. L'avantage de ce test est la possibilité de suivre en parallèle plusieurs échantillons avec des durées d'analyse réduites. HIDALGO et *al.*, (2006) et RAHMANI (2007) ont confirmé que ce test est un outil puissant pour examiner l'activité antioxydante pendant la transformation des aliments.

3. Les antioxydants et mécanismes d'action

3.1. Définition :

Le mot « antioxydant » est utilisé, en général, pour n'importe quel agent chimique qui inhibe l'attaque par l'oxygène ou l'ozone (SCOTT, 1965). HALLIWELL (1995) a donné une définition large du terme antioxydant : « toute substance qui, présente à faible quantité comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient d'une manière significative l'oxydation de ce substrat ».

Appliqués aux huiles végétales, les antioxydants sont des composés qui interrompent le processus d'oxydation en réagissant préférentiellement avec les radicaux libres pour former d'autres radicaux plus stables (ANONYME 1, 2007) et protègent certaines vitamines (MOURE *et al.*, 2001).

Lorsqu'il s'agit de denrées alimentaires, les antioxydants sont regroupés comme additifs alimentaires qui augmentent la durée de vie de ces produits en les protégeant contre la détérioration (ANONYME 2, 2006).

Selon MARC *et al.* (2004), l'antioxydant alimentaire idéal, est facilement incorporé et efficace à faible dose, est non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur et ni saveur indésirable. Résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini.

3.2. Types d'antioxydants :

Les antioxydants peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action en antioxydants primaires ou antioxydants secondaires (MC CLEMENTS et DECKER, 2000).

3.2.1. Les antioxydants primaires ou radicalaires :

Ils sont caractérisés par la possession d'atomes d'hydrogène facile à soustraire. Ces antioxydants jouent un rôle d'évacuateur « scavengers » des radicaux libres qui retardent ou inhibent l'initiation ou interrompent l'auto oxydation. Ils peuvent réagir avec les lipides et les radicaux peroxyde et les transformer en radicaux stables ou des produits non radicalaires (figure 3).

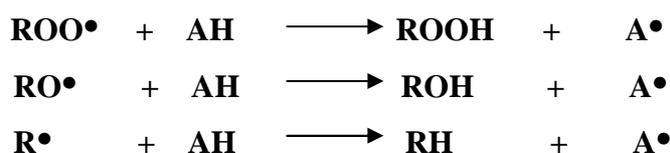


Figure 3: Réactions de rupture par l'antioxydant (AH : antioxydant ; ROO[•], RO[•], R[•] : radicaux libres).

Les antioxydants primaires peuvent aussi arrêter l'oxydation des lipides en réagissant avec les radicaux peroxyde, radicaux alkoxyde et autres antioxydants, selon les réactions suivantes de la figure 4 :

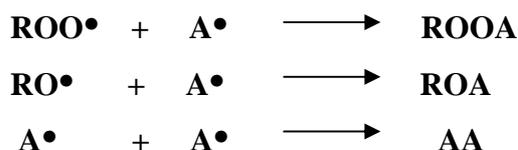


Figure 4: Rupture de l'oxydation des lipides par l'antioxydant.

Parmi ces antioxydants, on retrouve : le butylhydroxyanisole ou BHA (E 320), le butylhydroxytoluène ou BHT (E 321), gallates, tocophérols, flavonoïdes, vanilline, carnisol et l'acide carnosique (romarin). Les phénols et les amines aromatiques secondaires constituent les deux classes chimiques les plus importantes.

3.2.2. Les antioxydants secondaires ou « préventifs » :

Ils diminuent la vitesse de l'auto oxydation par différents mécanismes. Ils peuvent chelater les métaux et les désactiver, régénérer les antioxydants primaires, décomposer les radicaux peroxydes, désactiver l'oxygène singulet, absorber les radiations UV ou agir comme des « scavengers » de l'oxygène.

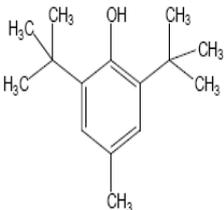
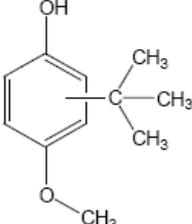
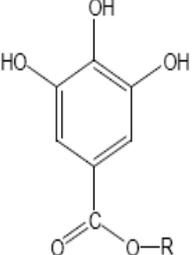
Ce sont des synergistes parce qu'ils renforcent l'activité des antioxydants primaires. L'acide citrique, l'acide ascorbique, le palmitate d'ascorbyle, les lécithines et l'acide tartrique sont des bons exemples de synergisme (HELME, 1990 ; POKORNÝ, 2003).

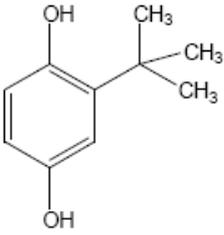
3.3. Les antioxydants des lipides alimentaires :

3.3.1. Les antioxydants de synthèse :

Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés par les industries alimentaires et sont donc impliqués dans la consommation humaine. Les plus utilisés sont : le butylhydroxytoluène, le butylhydroxyanisole et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle (E 310), gallate d'octyle (E 311), et de dodécyle (E 312) (SHAHIDI, 2008). Le tableau II donne les principaux antioxydants synthétiques utilisés.

Tableau II : Les principaux antioxydants synthétiques.

Antioxydant	Propriétés	Structure	Références
2,6-ditertiobutyl 4-méthyl phénol (BHT)	-liposoluble ; -antioxydant primaire ; -protection de la vitamine A et B.		SHERWIN (1978) ; ALAIS et <i>al.</i> (2003)
Butylhydroxyanisole (BHA)	-liposoluble ; -efficacité inférieure à celle du BHT ; - protection de la vitamine A et B.		SHERWIN (1978) ; ALAIS et <i>al.</i> (2003)
Gallates et ses dérivés: -gallate d'octyle, -gallate de dodécyle, -gallate de propyle	-dérivés d'un produit ; -naturel (acide gallique) ; -liposoluble		SHERWIN (1978)

<p>Tributhydroquinone (TBHQ)</p>	<p>-légèrement soluble dans les graisses ; -utilisé aux Etats-Unis et interdit au sein de l'Union européenne</p>		<p>HELME <i>et al.</i>, 1990 ; SHAHIDI, 2008</p>
---	--	--	--

On peut citer aussi d'autres antioxydants moins connus et moins utilisés :

- **L'acide nordihydrogualarétique (NDGA)** soluble dans les lipides, utilisé aux États-Unis dans les produits à usage courant;
- le **4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol** ou **Ionox 100**, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT.

Aucun de ces produits n'est autorisé dans l'Union européenne.

Les antioxydants de synthèse sont très efficaces et donnent une grande stabilité aux aliments. Cependant, leur utilisation a été limitée en raison de leur pouvoir carcinogénique et leur rejet par le consommateur (risques pour la santé) (KARPIŃSKA *et al.*, 2001 ; SCHIMIDT et POKORNÝ, 2005 ; IQBAL et BHANGER, 2007 ; FALLEH *et al.*, 2008). Actuellement, les recherches sont orientées vers le développement et l'utilisation des antioxydants naturels.

3.3.2. Les antioxydants naturels :

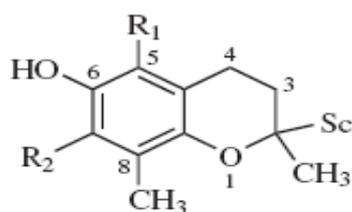
La quasi-totalité des huiles, des graisses et produits alimentaires contient un certain nombre d'antioxydants naturels. Les pigments caroténoïdes et les tocophérols sont présents dans toutes les huiles. D'autres antioxydants de nature phénolique sont présents uniquement dans une minorité d'huiles (SCHIMIDT et POKORNÝ, 2005).

3.3.2.1. Tocophérols « vitamine E » (E 306-E 309) :

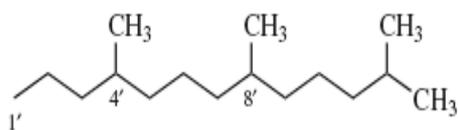
Les tocophérols sont des méthyles tocols. La molécule tocol constitue la structure de base des tocophérols, constituée d'un noyau hydroxychromane (extrémité hydrophile) sur le quel est fixé une chaîne entièrement saturée (extrémité hydrophobe).

La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Il s'agit de α , β , γ , et δ tocophérol et α , β , γ et δ tocotriénol. Les huit tocophérols et tocotriénols naturels isolés diffèrent entre eux par le nombre et la position relative des méthyles sur le cycle aromatique, mais la chaîne isoprénoïde dans chacune des sous-familles est la même.

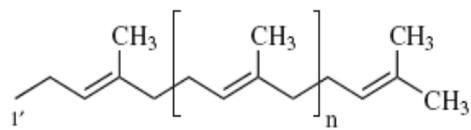
La vitamine E représente l'antioxydant le plus important des huiles végétales brutes et raffinées (KAMAL-ELDIN et APPELQVIST, 1996). Du fait de leur caractère lipophile, ils sont le plus souvent utilisés pour conserver les huiles végétales, la margarine et les produits à base de cacao. La structure de base des tocophérols est représentée dans la figure 5.



Noyau chromane



Sc : Tocophérols



Sc : Tocotriénols (n=3)

Tocophérols	Tocotriénols	R ₁	R ₂
α-tocophérol	α-tocotriénol	CH ₃	CH ₃
β-tocophérol	β-tocotriénol	CH ₃	H
γ-tocophérol	γ-tocotriénol	H	CH ₃
δ-tocophérol	δ-tocotriénol	H	H

Figure 5 : Cycle chromane et structure de la chaîne isoprénoloïde des tocophérols et des tocotriénols des huiles végétales (KHALIL, 2002).

L'activité antioxydante est fortement tributaire de la structure donc il est important de préciser à quel isomère on a affaire. D'ailleurs il existe une controverse quant à l'activité antioxydante de α-tocophérol. En effet, il a été montré, notamment par CILLARD et *al.* (1980) et MANNINO et *al.* (1999), qu'une concentration dans l'huile de soja supérieure à 0,1%, l'α-tocophérol joue le rôle de pro-oxydant. Il semble que des quatre principaux tocophérols, l'α-tocophérol soit plus rapidement oxydé à l'air et formerait un excès de radicaux libres tocophéroxyles susceptibles de relancer le mécanisme de l'auto oxydation (HELME et *al.*, 1990 ; BARRERA-ARELLANO et *al.*, 1999).

Le γ-tocophérol est plus puissant que l'α-tocophérol dans les huiles végétales conservées à faible température ou lors des traitements thermiques (KAMAL-ELDIN, 2005). Les professionnels admettent généralement une échelle d'activité antioxydante dans les produits alimentaires de l'ordre δ > γ > β > α (MOURE et *al.*, 2001 ; SCHMIDT et POKORNÝ, 2005). Les tocophérols protègent le β-carotène contre la destruction causée par le traitement thermique et l'exposition prolongée à l'oxygène.

3.3.2.2. Les caroténoïdes:

Ils constituent une des principales catégories de phytonutriments capables de procurer de nombreux bienfaits à la santé (DERBEL et GHEDIRA, 2005 ; KATALINIC et *al.*, 2006). Ce sont des pigments liposolubles, fortement insaturés d'origine végétale, largement distribués dans la nature, plus de 800 molécules ont été identifiées à ce jour (FAZEL et *al.*, 2008), une cinquantaine de caroténoïdes sont susceptibles d'être métabolisés en vitamine A (action pro vitaminique A). Les plus connus et utilisés en agroalimentaires sont : le β-carotène, le lycopène, la lutéine, la bixine et l'anatto.

Les caroténoïdes sont composés d'un enchaînement d'unités isopréniques et un noyau cyclique porteur de diverses fonctions. Les caroténoïdes exercent leurs activités anti oxydantes à basse température en diminuant la réactivité de l'oxygène singulet, comme des piègeurs des radicaux libres des acides gras ou des synergistes avec les tocophérols (KAMAL-ELDIN, 2005). Les structures du β -carotène et du lycopène sont représentées respectivement dans les 6 et 7.

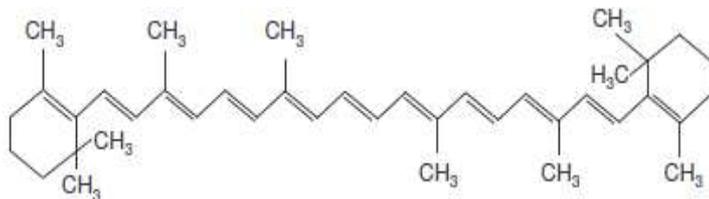


Figure 6 : Structure de la β -carotène (LÉGER, 2006).

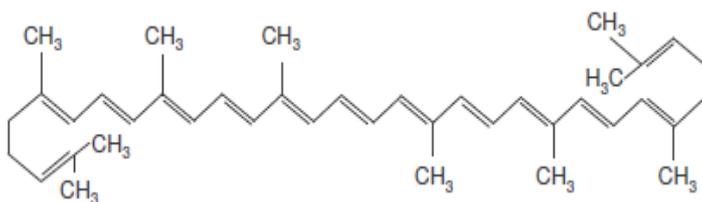


Figure 7 : Structure de la lycopène (DERBEL et GHEDIRA, 2005).

Le β -carotène ainsi que d'autres caroténoïdes présents dans l'huile d'olive (lutéine, violaxanthine,.....) sont connus comme désactivant de l' O_2 singulet et donc sont des inhibiteurs très efficaces de la photooxydation (LÉGER, 2006). En plus, les caroténoïdes peuvent aussi agir comme des piègeurs des radicaux libres. Cependant, sous pression partielle d'oxygène élevée, le β -carotène agit comme pro-oxydant dans certains systèmes (HALLIWELL, 2007). La forte réactivité des caroténoïdes avec l'oxygène limite leurs utilisations comme des antioxydants.

3.3.2.3. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques (CP) sont des métabolites secondaires des végétaux (RIBEREAU GAYON, 1968 ; ABEROUMAND et DEOKULE, 2008). Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (FERGUSON et *al.*, 2001 ; MARTIN et NDRIANTSITOHAINA, 2002, HABAUZIT et HORCAJADA , 2008).

Selon HENNEBELLE et *al.* (2004) et OVASKAINEN et *al.* (2008), l'élément structural de base des composés phénoliques est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique.

Selon BRUNETON (2001), une définition purement chimique semble être insuffisante, d'où la nécessité de faire intervenir un critère biosynthétique, pour mieux cerner les limites du groupe. Il propose : « dérivé non azoté dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacetate ».

❖ Les différentes formes chimiques :

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire. Ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carbone et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique.

Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des mono- ou polysaccharides ou à des acides organiques. Les différentes classes sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : Les différentes classes des composés phénoliques dans les plantes (FERGUSON, 2001).

Squelette carboné	Classe	Exemples
C ₆	Phénols simples, benzoquinones	Catéchol
C ₆ -C ₁	a. phénoliques	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₂	a. phenylacétiques	Acide <i>p</i> -hydroxyphenylacétique
C ₆ -C ₃	a. cinnamiques, phenylpropanoïdes	Acides : caféique, férulique
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangostin, mangiferin
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stibenes, Anthraquinones	Resvératrol, Emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
	-Flavones	Sinensetin, luteolin-7-rutinoside, tangeretin
	-Flavonols	Quercetine, kaempférol
	Flavonol glycosides	Rutine
	Flavanonols	Dihydroquercetin
	Flavanones	Naringénine, hespertine
	Anthocyanines	Cyanidine glycosides, 3-rutinoside
	Flavanols (catechines)	(+)-catechine, (-)-epicatechine
	Chalones	Dérivés de phloretine, arbutine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes, neolignanes	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Agathisflavone
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	Pinosésinol
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	protocyanidines

➤ **Les formes simples :**

Les formes les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C₆ aux flavonoides en C₁₅.

▪ **Les acides phénoliques :** ils sont subdivisés en 2 sous groupes :

✓ **Les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) :** existent fréquemment sous formes d'esters ou de glucosides et peuvent être intégrés dans les structures complexes. La forme générale est présentée par la figure 8.

R₁=R₃=H, R₂= OH : acide 4-hydroxybenzoïque

R₁=R₂=R₃ =OH: acide gallique

R₁=H, R₂=R₃=OH: acide protocatechuique

R₁=H, R₂=OH, R₃=OCH₃: acide vanillique

R₁=R₃=OCH₃, R₂=OH : acide syringique

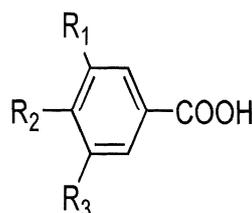


Figure 8 : Structure générale des acides hydroxybenzoïques (ROBARDS et al., 1999).

✓ **Les acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃)** : ils représentent une classe importante. Les molécules de base sont l'acide *p*-coumarique (et ses dérivés), l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. On rencontre au moins un de ces acides dans pratiquement tous les végétaux supérieurs (RIBUREAU GAYON, 1968). La structure générale est représentée par la figure 9.

R₁=R₂=H, R₃=OH, R₄=OCH₃ : acide férulique
 R₁=R₂=R₄=H, R₃=OH : acide *p*-coumarique
 R₁=R₂=H, R₃=R₄=OH : acide caféique
 R₁=H, R₃=OH, R₂=R₄=OCH₃ : acide sinapique

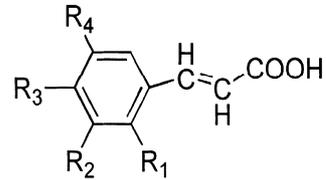


Figure 9: Structure générale des acides cinnamiques (phenylpropanoïdes) (ROBARDS et al., 1999).

L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique), libre ou estérifié, est généralement le composé le plus abondant et représente entre 75% et 100% de la quantité totale des acides hydroxycinnamiques de la plupart des fruits (MANACH et al., 2004). Il a été rapporté que l'acide caféique a montré un effet protecteur similaire que celui de α -tocophérol de l'oxydation de LDL et supérieur aux pouvoirs antioxydant de l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique (GÜLÇIN, 2006).

▪ **Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆)** : Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C₆-C₃-C₆, généralement constitués de deux cycles aromatiques A et B qui sont liés par un pont de 3 atomes de carbone (cycle C). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques des plantes (DUTHIE et al., 2000 ; PIETTA et al., 2003). Leur squelette de base est représenté dans la figure 10.

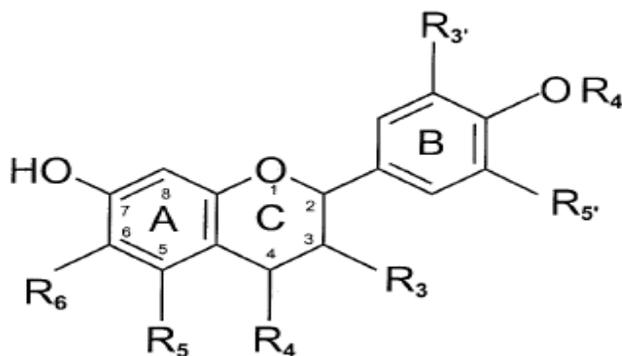


Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes (BECHEER, 2003).

C'est la structure de l'hétérocycle centrale et son degré d'oxydation qui permet de distinguer les différentes formes de flavonoïdes. A l'intérieur de chacune des classes, les substitutions autour de squelette chimique de base en C₁₅ comprennent l'hydroxylation, la méthylation, malonylation et la glycosylation (COOK et SAMMAN, 1996 ; MACHEIK et al., 2005 ; BALASUNDRAM et al., 2006). Les classes majeures des flavonoïdes sont : les flavonols, flavones, flavonones, catechines (flavanols), antocyanidines, isoflavones (PIETTA et al., 2003).

La plupart des flavonoïdes sont présent dans la nature sous forme de glycosides et autres formes conjuguées, ce qui contribue à leurs complexités et le grand nombre de molécules qui ont été identifié (plus de 5000 identifiées) (BEECHER, 2003 ; DE MEDINA et ZARZUELO, 2008).

➤ **Les formes condensées :**

Ces formes résultent de la condensation de certaines des formes simples évoquées précédemment. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient :

- **Les tanins** : on distingue 2 grands groupes :
 - **Tanins hydrolysables** : sont des esters d'acides gallique ou ellagique. Après hydrolyse, on distingue les gallotanins et ellagitanins.
 - **Tanins condensés (proanthocyanidines)**: sont des oligomères ou des polymères de -3-ols (polymers de flavonoïdes). Ils sont résistants à l'hydrolyse.

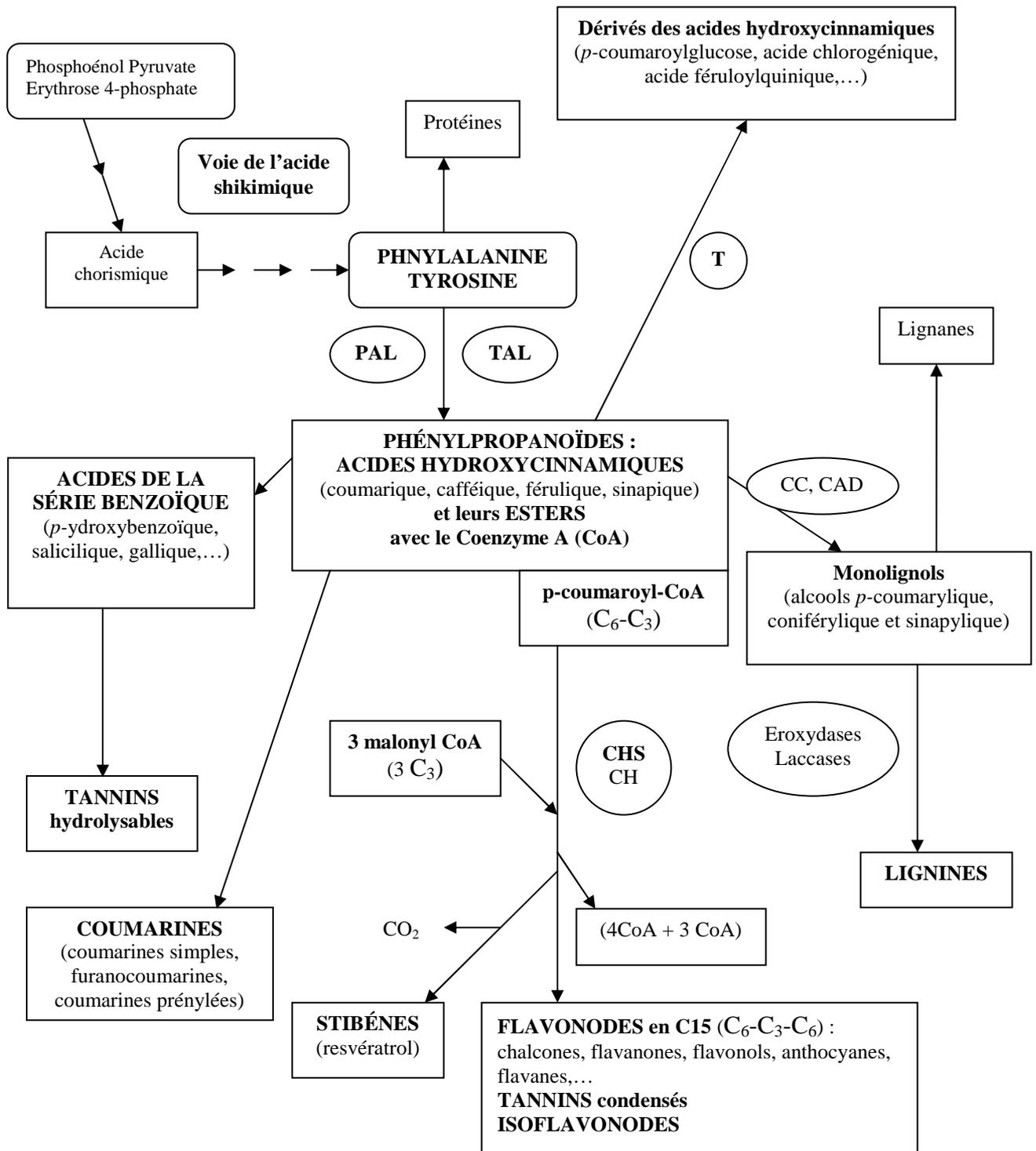
- **Les lignines** : les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de 3 molécules phénoliques de base dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférik et sinapylique (RICHTER, 2003 ; MACHEIK *et al.*, 2005).

❖ **Biosynthèse des composés phénoliques :**

Les CP sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques qui sont d'après BRAVO *et al.* (1994) et VISIOLI *et al.* (2000) :

- Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques.

Deux acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine, sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques. En effet, les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques formés par une désamination, permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques : vers les acides benzoïques par β oxydation, vers les esters hydroxycinnamiques par estérification, vers les coumarines par cyclisation interne, vers les lignines par deux réductions successives et vers les flavonoïdes. La figure 11 donne les voies de biosynthèses des composés phénoliques.



PAL : phénylalanine ammonialysase; **TAL** : tyrosine ammonialysase; **CC** : cinnamate CoA réductase; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase; **CHS** : chalcone synthase; **CH** : chalcone flavanone isomérase; **T** : transférases.

Figure 11 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes des polyphénols (MACHEIK et al., 2005).

❖ **Distribution :**

Les polyphénols (PP) ou Les composés phénoliques (CP) ne sont pas distribués uniformément dans la plante. Ils se trouvent dans toutes les parties de la plante mais leur nature et leurs concentrations varient entre les divers tissus (ROBARDS, 2003), ceux insolubles sont des composants des parois cellulaires par contre ceux solubles sont compartimentés à l'intérieur des vacuoles cellulaires (YAMAKI, 1984 ; NACZEK et SHAHIDI, 2004).

Les PP se rencontrent sous formes conjuguées avec les sucres, les acides organiques, les acides aminés et les lipides et rarement libres (HABAUZIT et HORCAJADA, 2008).

Les feuilles sont considérées comme le site principal du métabolisme de la plante. Les composés phénoliques identifiés sont : La quercétine (quercétine-3-rhamnoside), la rutine (quercétine-3-rutinoside), la luteoline-7-glycoside, la lutéoléine et l'acide 5-cafféoylquinic (HEIMLER et *al.*, 1992), l'acide chlorogénique (CLIFFORD, 2000), l'oleuropéine, le diméthyleoleopine, l'oleuroside, le verbascoside, le ligstoside (LE TUTOUR et GUEDON, 1992 ; DE NINO et *al.*, 1997) et les flavonoïdes.

Dans les olives, une large gamme de structures phénoliques a été reportée incluant les acides phénoliques simples comme les isomères de l'acide coumarique (ROMANI et *al.*, 1999). Cependant les graines et les enveloppes d'olive contiennent relativement une faible fraction phénolique qui inclut les phénols simples (tyrosol, a.caféique), flavonoïdes et secoridoïdes (RYAN et *al.*, 2001, 2002).

Dans la famille de l'*Olea Europaea*, l'oleuropéine, le déméthyleoleuropéine, le ligstroside et les oleosides représentent les oleosides phénoliques majeurs (SOLER-RIVAS et *al.*, 2000), alors que le verbascoside est le dérivé hydroxycinnamique prédominant des olives (RYAN et *al.*, 1999). L'oleuropéine est généralement le composé le plus abondant et sa concentration peut atteindre 140mg/g de matière sèche des olives jeunes (AMIOT et *al.*, 1986) et 60-90 mg/g de matière sèche des feuilles (LE TETOUR et GUEDON, 1992).

❖ **Sources des composés phénoliques :**

Les CP étant présent de façon ubiquitaire dans le règne végétal, ils sont présents dans de nombreux aliments, tels que les fruits, les légumes les céréales ou les fruits secs (BRAVO et *al.*, 1994), ainsi que dans les boissons, comme le vin, le cidre, la bière ou le thé (DUTHIE, 1999 ; KOLESNIKOV et GINS, 2001 ; MARTIN et ANDERIZNTSITOHAINA, 2002 ; HALLIWELL, 2007), les plantes aromatiques (DIMITRIOS, 2006).

Plusieurs auteurs ont montré que la consommation des aliments riches en antioxydants diminue les niveaux d'oxydation *in vivo* (LUACES et *al.*, 2005 ; KARAKAYA et *al.*, 2006).

❖ **Rôle des polyphénols :**

Les polyphénols sont importants pour la physiologie de la plante et ses relations avec l'environnement physicochimique et biologique. Les pigments de nature phénolique (anthocyanes, flavonols, pigments bruns) participent à la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits, graines) (HARBONE, 1990 ; DUTHIE et *al.*, 2003 ; NACZK et SHAHIDI, 2004 ; MACHEIX et *al.*, 2006 ; PETTI et SCULLY, 2009). Les polyphénols favorisent la fertilité de la plante et la germination de pollen (PETTI et SCULLY, 2009).

Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV, ils protègent donc les végétaux contre le rayonnement solaire (ROBARDS et ANTOLOVICH, 1997 ; LATTANZIO et *al.*, 2008). Ils ont d'autres fonctions défensives dont deux sont les plus importantes : défense de la plante contre les microorganismes pathogènes et contre les prédateurs (insectes) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006 ; TAYLOR et CHOM, 2006 ; PETTI et SCULLY, 2009). Ils protègent les plantes contre les blessures causées par les insectes (JAPON-LUAN et *al.*, 2006 ; LATTANZIO et *al.*, 2008).

❖ Les composés phénoliques des olives et produits dérivés :

L'olive de la famille *Olea Europaea* L., l'un des fruits les plus importants dans les pays méditerranéens, couvre environ 8 millions Ha, soit 98% de la récolte mondiale (TABERA et *al.*, 2004 cité par BOUAZIZ et SAYADI, 2005). En Algérie, la culture d'olive est l'une des activités les plus importantes, particulièrement en Kabylie. La wilaya de Tizi-Ouzou possède environ 3 millions d'oliviers répartis sur une superficie de 33027 Ha. L'oléaie représente 70% de la superficie arboricole. 90% de cette oléaie est composée de la variété « *Chamlal* » et 10% de la variété « *Azeradj* ». La wilaya de Tizi-Ouzou possède 405 huileries dont 311 traditionnelles et 96 modernes. Ces huileries, lors de l'extraction de l'huile d'olive, génèrent des quantités importantes de sous-produits: 40% de margines et 40% de grignons.

Les olives et les sous-produits (feuilles, margines) constituent des sources importantes de polyphénols ayant des propriétés antioxydantes très intéressantes.

▪ Les feuilles :

Les feuilles sont considérées comme le site principal du métabolisme de la plante (produits primaires et secondaires). Elles représentent une source des composés phénoliques et l'oléuropéine constitue le composant le plus abondant des extraits des feuilles (JAPON-LUAN et *al.*, 2006 ; MALIK et BRADFORD, 2008 ; DE LEONARDIS et *al.*, 2008). L'oléuropéine est un ester constitué de l'hydroxytyrosol (HT) ou 3,4-dihydroxyphényléthanol (3,4-DHPE) et l'acide élénolique.

HEIMLER et *al.* (1992) et BOUDET (2007) ont isolé et identifié les CP, spécifiquement les flavonoïdes glycosides (lutéoline 7-rutinoside, lutéoline 4'-glucoside, apigénine 7-glucoside et apigénine 7-rutinoside) et biflavonoïdes (apigénine, kaempférol, luteoline), des feuilles d'olive.

Les constituants majeurs des feuilles sont les secoïridoïdes comme l'oléuropeine, le ligstroside, le diméthyloléuropeine et l'oléoside (GARIBOLDI et *al.*, 1986, PEREIRA et *al.*, 2007). Elles contiennent aussi l'acide cafféique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol (SALTA et *al.*, 2009). La concentration des PP des feuilles dépend de la qualité, la variété et l'origine de la plante (ALTIOK et *al.*, 2008). La phytothérapie et la médecine moderne utilisent les feuilles pour le traitement et la prévention de l'hypertension, l'hypoglycémie, comme antiseptique et diurétique (FERREIRA et *al.*, 2007).

▪ **Les drupes d'olives :**

Le contenu phénolique des olives a été largement étudié. Les polyphénols représentent de 1 à 3% de poids frais d'olive à maturité. Parmi eux, les secoïridoïdes phénoliques et du ligstroside ainsi que de leurs dérivés aglycones, décarboxyméthylés et aldéhydiques (SILVA *et al.*, 2006).

L'hydroxytyrosol et le tyrosol sont les alcools phénoliques les plus abondants (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009), les flavonoïdes (les flavonols glucosides :lutéoline -7-glucoside et rutine), le verbascoside, dérivés d'acide hydroxycinnamique ont été identifiés dans la fraction phénolique des olives (ROMANI *et al.*, 1999). Bien que les acides phénoliques, les alcools phénoliques et les flavonoïdes se rencontrent dans beaucoup de fruits et végétaux appartenant à plusieurs familles botaniques, les secoïridoïdes sont présents exclusivement dans les plantes appartenant à la famille des *Oleaceae* dont *Olea Europea L.* (ROBARDS *et al.*, 1999 ; SERVILI et MONTEDERO 2002 ; SERVILI *et al.*, 2004 ; SILVA *et al.*, 2006).

Les secoïridoïdes sont caractérisés par la présence de l'acide élénolique ou ses dérivés dans leur structure. L'oleuropéine, le dimethyloleuropeine, le ligstroside et le nüzhenide sont les plus abondants dans les olives (SERVILI et MONTEDERO, 2002) dont l'oleuropéine est le principale CP des olives (BOUAZIZ *et al.*, 2005 ; DAMAK *et al.*, 2008).

La maturation des olives est caractérisée par le changement de la couleur et des modifications physiologiques et morphologiques. Le changement de la couleur est associé à la diminution de la quantité des chlorophylles et de l'oleuropéine et à l'apparition des anthocyanines (RYAN et ROBARDS, 1998). Les anthocyanines communs des olives sont des cyanidines et delphinidine glycosides.

▪ **Les olives de table :**

L'olive de table est une forme de transformation de la drupe d'olive destinée à la consommation, dont la concentration en CP est abaissée d'un facteur de 10 par rapport à celle de la drupe. Les pertes portent surtout sur les secoïridoïdes. Des échantillons des olives de table commercialisés ont été analysés par RP-HPLC et les résultats de cette analyse montrent la prédominance de l'hydroxytyrosol (DIMITRIOS, 2006). Les CP identifiés majoritairement sont : le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'acide oleanolique et la concentration de ces composés dépend du degré de maturation des olives et le traitement appliqué (BOSKOU *et al.*, 2006).

▪ **Les margines:**

Les margines ou eaux de végétation représentent un milieu complexe contenant principalement les polyphénols dont l'hydroxytyrosol est le plus abondant des monomères phénoliques (FEKI *et al.*, 2006 ; DE MARCO *et al.*, 2007 ; SAYADI *et al.*, 2008). La composition phénolique des margines varie en fonction de la composition des olives et le système d'extraction de l'huile d'olive (OBEID *et al.*, 2005).

La fraction phénolique est caractérisée par une grande complexité, les CP majeurs identifiés selon OBEID *et al.* (2007) sont : l'hydroxytyrosol , l'hydroxytyrosol glycosylé, le tyrosol, l'acide caféique, le verbascoside, l'oleuropéine, la lutéoline, la quercétine, l'apeginine et la rutine. BIANCO *et al.*, (2003) en utilisant HPLC-MS-MS ont identifié 20 composés.

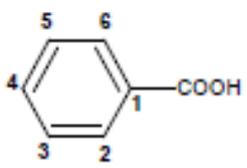
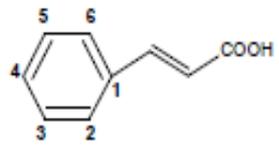
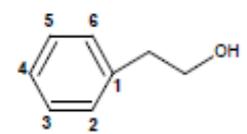
▪ **Grignons :**

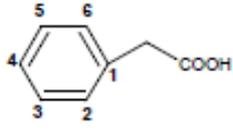
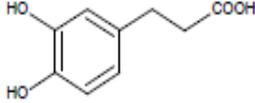
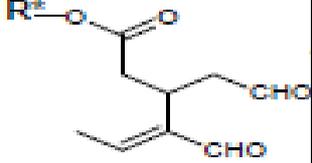
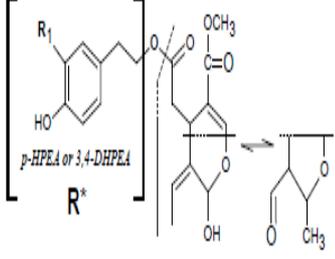
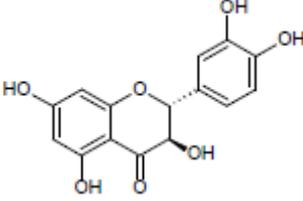
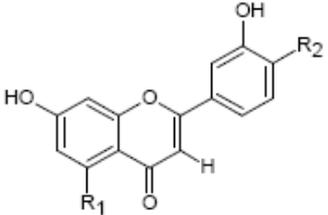
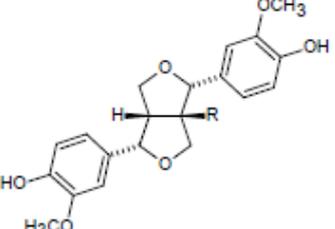
Les recherches ont confirmé la présence d'un sécoïridoïde majeur dans le noyau de l'olive, le nuzhénide (SILVA et al., 2006), et une autre catégorie de CP appelés lignanes, à laquelle appartiennent le pinorexinol et l'acetoxypinorexinol. D'autres composés ont été identifiés dans les grignons de la famille *Olea europaea* qui sont : le salidroside et le nuzhénide oléoside (SOLER-RIVAS et al., 2000 ; RYAN et al., 2002).

▪ **L'huile :**

Les phénols représentent les composants les plus abondants des antioxydants naturels de l'huile d'olive vierge (OWEN et al., 2004 ; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006 ; KIRALAN et al., 2009). L'huile d'olive contient les phénols simples, lignines et les secoïridoïdes, leurs structures sont consignées dans le tableau III (BENDINI et al., 2007). Cependant, les acides phénoliques : cafféique, vanillique, syringique, protocatechuique, *p*-coumarique et *o*-coumarique, 4-hydroxybenzoïque sont les premiers identifiés dans l'huile d'olive vierge (MONTEDERO, 1972 cité par TRIPOLI et al., 2005 ; VEKIARI et KOUTSAFTAKIS, 2002). Les lignanes (le (+)-1-acetoxypinoresinol et (+)-1-hydroxypinoresinol) ont été identifiés aussi dans certaines huiles d'olive et leurs concentration peut dépasser 100 mg/kg et ceci selon les variétés (TRIPOLI et al., 2005 ; OLEVERAS-LÓPEZ et al., 2007). L'étude faite par MORELLO et al. (2005) a rapporté que les flavonoïdes comme le luteoline et apeginine font partie de la fraction phénolique de l'huile d'olive.

Tableau IV : Les composés phénoliques de l'huile d'olive vierge (BENDINI et al., 2007)

Composés	substituant	Structure
Acides benzoïques et dérivés a. 3-hydroxybenzoïque a. <i>p</i> -hydroxybenzoïque a. 3,4-dihydroxybenzoïque a. gentisique a. vanillique a. gallique a. syringique	3 : OH 4 : OH 3,4 : OH 2,5 : OH 3 : OCH ₃ , 4 : OH 3, 4, 5 : OH 3,5 : OCH ₃ , 4 : OH	
Acides cinnamiques et dérivés a. <i>o</i> -coumarique a. <i>p</i> -coumarique a. caféique a. férulique a. sinapique	2 : OH 4 : OH 3,4 : OH 3 : OCH ₃ , 4 : OH 3,5 : OCH ₃ , 4 : OH	
Alcools ethylphényliques Tyrosol (<i>p</i> -hydroxyphenyl) éthanol ou <i>p</i> -HPEA Hydroxytyrosol (3,4-di hydroxyphenyl) éthanol ou 3,4-DHPEA	4 : OH 3,4 : OH	

Autre acides phénoliques et dérivés a. hydroxyphenilacetique a. 3,4-di hydroxyphenilacetique a. 4-hydroxy-3-methoxylacetique	3 : OH 3,4 : OH 3 : OCH ₃ , 4 : OH	
a. 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoïde		
Formes dialdedydique des secoiridoïdes Decarboxymethyloléuropeine aglycone (3,4-DHPEA-EDA) Decarboxymethyl ligstroside aglycone (<i>p</i> -HPEA-EDA)	R₁ : OH R₁ : H	
Secoiridoïdes aglycones Oleuropeine aglycone (3,4-DHPEA-EA) Ligstroside aglycone (<i>p</i> -HPEA-EA) Forme aldéhydique de l'oléuropeine aglycone Forme aldéhydique de ligstroside aglycone	R₁ : OH R₁ : H R₁ : OH R₁ : H	
Flavonols (+)-taxifoline		
Flavones Apigénine Lutéoléine	R₁ : OH, R₂ :H R₁ : OH, R₂ :OH	
Lignanes (+)-pinoresinol (+)-1-acetoxypinoresinol (+)-1-hydroxypinoresinol	R : H R : OCOCH ₃ R : OH	

❖ **Les facteurs influençant la composition phénolique :**

La composition en CP est déterminée par les facteurs génétiques et biologiques. La quantité varie sur une large gamme (de 50 à 1000 mg/kg) mais les teneurs usuellement sont comprises entre 100 et 300 mg/kg (DIMITRIOS, 2006).

Les facteurs qui déterminent cette concentration sont : le site de culture, le cultivar (VISIOLI et GALLI, 1998 ; CHEIKHOUSMA et *al.*, 2005), le degré de maturation (la quantité des PP diminue habituellement au stade avancé de maturation des olives) (VISIOLI et *al.*, 2002 ; TRIPOLI et *al.*, 2005), les pratiques agronomiques appliquées (fertilisation, irrigation) (GALLINA-TOSCHI, 2005 ; DAMAK et *al.*, 2008) et le climat (MEDINA, 2007). La quantité des CP dans l'huile d'olives est aussi influencée par l'état de la matière première et la conduite technologique d'élaboration de l'huile (système classique, centrifugation, filtration) (VERIARI et KOUTSAFTAKIS, 2002 ; KIRALAN et *al.*, 2009). L'huile produite par le système continu (centrifugation) présente généralement une faible concentration en CP que celle produite par les autres systèmes (RANALLI et *al.*, 1997, 1998, 1999 ; VISIOLI et *al.*, 2002 ; GALLINA-TOSCHI, 2005).

❖ Les composés phénoliques et le goût :

Les cp confèrent aux produits végétaux frais et transformés certaines de leurs propriétés organoleptiques majeures (couleur et goût) (CHEYNIER et SARNI-MANCHADO, 2006). Ils jouent un rôle déterminant sur le plan gustatif et tout particulièrement sur les sensations d'astringence et d'amertume. D'après HASLAM (2007), l'astringence est généralement associée aux tannins. Les CP sont à l'origine de l'amertume de certains produits alimentaires d'origine végétale, tels que les agrumes et l'olive. Ils sont aussi responsables de l'astringence des fruits et des boissons.

Dans les olives, l'amertume et l'astringence sont corrélées avec l'importance des teneurs en CP et en sécoiridoïdes particulièrement les *o*-diphénols (ARGEROSA et *al.*, 2000 ; RANALLI et *al.*, 2000). L'oleuropéine est le principe amer des olives (SOLAR-RIVAS et *al.*, 2000 ; BRIANTE et *al.*, 2002 ; DAMAK et *al.*, 2008) ainsi que les acides phénoliques et particulièrement l'acide cinnamique (VISIOLI et *al.*, 2002).

L'astringence connue comme la perte de la lubrification, caractéristique désirable de certaines boissons telles que les vins, thé, cidres, est associée spécifiquement aux interactions protéines-tannins (PIETTA et *al.*, 2003 ; HASLAM, 2007). D'une manière générale, l'astringence et l'amertume diminuent spontanément au cours de la maturation des fruits ou de la conservation des produits.

❖ La stabilité oxydative de l'huile d'olive :

La stabilité oxydative élevée de l'HO est principalement due à sa composition et à la présence des antioxydants naturels (tocophérols, les CP et β -carotène) (CINQUANTA et *al.*, 1997, 2001 ; CANIZARES-MACIAS et *al.*, 2004 ; MÉNDEZ et FALQUÉ, 2007). La contribution des CP au prolongement de la durée de vie des huiles est largement étudiée. VAZQUEZ RONCERO (1978) et GUTFINGER (1981) ont rapporté une corrélation entre la quantité des CP et la stabilité de l'HO. Cette corrélation a été confirmée par plusieurs études notamment celle de TSIMIDOU et *al.* (1992) et celle de CINQUANTA et *al.* (2001).

Selon TSIMIDOU et *al.*, (2005), la stabilité des huiles d'olive non filtrées est plus significative que celle des huiles filtrées, ceci coïncide avec le contenu phénolique total important des huiles non filtrées.

Il est bien connu que la stabilité oxydative élevée des HO est principalement due aux *o*-diphénols comme l'hydroxytyrosol et ses formes oleosidiques. APARICIO *et al.*, (1999), en utilisant l'analyse statistique des données relatives à 79 HO de deux variétés, ont mesuré les corrélations entre la stabilité oxydative (mesurée par Rancimat) et plusieurs variables compositionnelles. Les résultats de cette étude ont montré que les phénols, ratio oléique/linoléique et les tocophérols ont une corrélation maximale avec la stabilité oxydative. Les PP contribuent d'environ à 51% de la stabilité oxydative des HO (particulièrement 30% pour les phénols, et 21% pour les *o*-diphénols par contre le ratio oléique/linoléique va participer avec 27%, tandis que la contribution des tocophérols est de 9% et celle des chlorophylles et les caroténoïdes de 13%).

Dans les expérimentations effectuées par CARRASCO-PANCORBO *et al.*, (2006) l'activité antioxydante de plusieurs PP individuels de l'HO (hydroxytyrosol, tyrosol, acide élénolique, 3,4-DHPEA-EDA, + (-) pinoresinol, (+)-1-acetoxypinoresinol, oleuropeine aglycone, ligstroside aglycone) est évaluée. Les résultats obtenus montrent que l'hydroxytyrosol, 3,4-DHPEA-EDA et l'oleuropeine aglycone ont un pouvoir antioxydant puissant. L'acide élénolique (qui n'a pas de cycle phénolique) est l'un des composés qui présente une faible activité antioxydante, ceci a été reporté par BRIANTE *et al.*, (2003).

De plus, CHIMI *et al.* (1991) ont montré qu'à la température de 50°C et à l'obscurité, l'activité antioxydante des CP de l'huile d'olive vierge décroît dans l'ordre suivant : hydroxytyrosol > acide cafféique > oleuropéine > tyrosol.

❖ Modes d'action des composés phénoliques :

Les PP peuvent inhiber l'oxydation par différents mécanismes : balayeurs ou « scavengers » de radicaux libres et par séquestration des métaux (AFANAS'EV *et al.*, 1989 ; AMAROWICZ *et al.*, 2004 ; TAWAHA *et al.*, 2007 ; PETTI et SCULLY, 2009). Un autre mécanisme peut être impliqué *in vivo* lorsque les CP peuvent protéger le α -tocophérol de l'oxydation (s'oxydent eux mêmes) ou ils peuvent régénérer l' α -tocophérol (en donnant un atome d'hydrogène pour le radical de α -tocophérol) (ROBARDS *et al.*, 1999 ; MOURE *et al.*, 2001 ; TRIPOLI *et al.*, 2005 ; LÉGER, 2006). Certains CP sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier de la lipoxigénase, de la cyclo-oxygénase (COOK et SAMMAN, 1996 ; BERSSET, 2006 ; TEISSEDE, 2008), de la prostaglandine synthase (KARADENÜZ *et al.*, 2005), de la succinoxidase mitochondriale et de la NADH oxydase (ROCHA-GUZMÁN *et al.*, 2007).

Les CP sont des puissants agents réducteurs (ELZAAWLELY *et al.*, 2007). L'activité antioxydante des composés phénoliques réside dans leur capacité à bloquer la phase d'initiation en captant les radicaux libres des lipides. La figure 12 montre le mode d'action des antioxydants phénoliques.

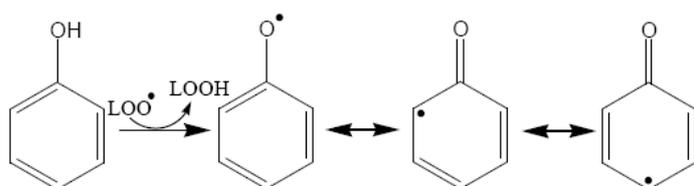


Figure 12 : Mécanisme antioxydant des composés phénoliques (SHERWIN, 1978).

❖ Relation structure-activité anti-oxydante :

La structure des CP est la clef déterminante de leurs activités (ABEROUMAND et DEOKULE, 2008). Dans le cas des acides phénoliques par exemple, l'activité anti-oxydante dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles sur le cycle (RICES-EVANS *et al.*, 1996 ; ROBARDS *et al.*, 1999 ; SINEIRO *et al.*, 2008).

De plus, FINOTTI et DIMAJO (2003) ont observés que les *ortho*- et *para*- substituant sont plus stables que les *meta*-. BENDINI *et al.* (2006) ont montré que les *ortho* diphénols assurent une activité antioxydante la plus significative.

Les acides hydroxycinnamiques montrent une activité antioxydante plus élevée que les a. hydroxybenzoïques (ANDREASEN *et al.*, 2001). Selon RICE-EVANS *et al.* (1996), cette activité peut être due au groupement CH=CH-COOH qui cède plus facilement l'hydrogène que le groupe carboxylique des a. hydrobenzoïques.

Cependant, la relation structure-activité est beaucoup plus compliquée pour les flavonoïdes et ceci en relation avec leur complexité structurale. Certaines caractéristiques sont la nature de substitutions sur le cycle B et C qui déterminent l'activité antioxydante des flavonoïdes (BALASUNDRAM *et al.*, 2006 ; ALUYOR et ORI-JESUS, 2008). L'activité des flavonoïdes est liée aux paramètres suivants:

✓ Le degré d'hydroxylation et la position de -OH sur le cycle B, particulièrement la structure *ortho*-dihydroxyle (RATTY et DAS, 1988 ; RICES-EVVAN *et al.*, 1996 ; VAN ACKER *et al.*, 1996 ; ROBARDS *et al.*, 1999 ; PIETTA, 2000).

✓ La présence de groupe hydroxyle en position 3', 4' et 5' sur le cycle B augmente l'activité antioxydante des flavonoïdes par rapport à ceux qui ont un seul hydroxyle (VAN ACKER *et al.*, 1996 ; PENG *et al.*, 2002 ; DE MEDINA et ZARZUELO, 2008). D'après BOUAZIZ *et al.* (2005), l'hydroxyle en position *ortho* 3' sur le cycle B contribue à l'activité antioxydante.

✓ La double liaison entre C₂ et C₃ conjuguée avec le groupe 4-oxo ou combinée avec 3-OH sur le cycle C augmente la capacité antioxydante des flavonoïdes (RICES EVAN *et al.*, 1996 ; VAN ACKER *et al.*, 1996 ; PIETTA, 2000). Par contre, d'après COOK et SAMMAN (1996), l'hydrogénation affecte le pouvoir antioxydant.

✓ La substitution de groupes hydroxyles par des groupes méthoxyl sur le cycle B altère le potentiel redox qui affecte la capacité antioxydante (COOK et SAMMAN, 1996 ; PIETTA, 2000 ; SEERAM et NAIR, 2002).

L'activité antioxydante des flavonoïdes est donc étroitement liée à la position et le degré d'hydroxylation de la molécule, les considérations majeures pour cette activité est l'hydroxylation du cycle B.

❖ Les propriétés biologiques des polyphénols :

Les CP suscitent actuellement beaucoup d'intérêts en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en terme de prévention des maladies liées au vieillissement (infarctus de myocarde, maladies dégénératives), cancers, maladies chroniques (HENNEBELLE *et al.*, 2004 ; SCALBERT *et al.*, 2005 ; SHAHIDI *et al.*, 2008). Des études épidémiologiques mettent en évidence les effets protecteurs de la consommation des CP contre les maladies cardiovasculaires.

Cependant, leurs effets protecteurs contre les cancers, les maladies neurodégénératives et la détérioration de la fonction cérébrale sont encore largement tirés des expériences *in vivo* sur des animaux et des études *in vitro* (SCALBERT et al., 2005). L'activité antimicrobienne des CP est utile contre les maladies infectieuses (PETTI et SCULLY, 2009), cependant, il reste la confirmation par des études sur l'être humain.

Dans le contexte du régime méditerranéen et maladies cardiovasculaires, il a été bien montré que le CP de l'HO augmentent la résistance des LDL contre l'oxydation (*in vitro* et *in vivo*) (VISIOLI et al., 1995). L'étude menée par BOGANI et al., (2007) confirme l'effet anti-inflammatoire et anti-thrombotique des CP de l'HO. Le tableau V résume quelques effets biologiques des CP de l'HO.

Tableau V : Quelques activités biologiques des composés phénoliques de L'HO.

Activités	Références
- Inhibition de l'oxydation de low density lipoprotein (LDL) (<i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i>).	SCACCINI et al. (1992) ; WISEMAN et al. (1992) ; VISIOLI et GALLI (1994) ; ARUOMA et al. (1998) ; FITO et al. (2007) ; SHAHIDI, 2007 ; TEISSEDRE (2008).
-Inhibition de l'agrégation plaquettaire	MOURE et al. (2001) ; HUBBARD et al. (2003) ; TRIPOLI et al. (2005) ; LOPEZ et al. (2008) ; OZDEMIR et al. (2009) ; CICERALE et al. (2010).
-Réduction de la production de thromboxane B ₂ (TXB ₂) et leukotriène B ₄ (LTB ₄) par l'activation de leucocytes (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>).	DE LA PUERTA et al. (1999) ; SANTAGELO et al. (2007) ; OVASKAINEN et al. (2008) ; HODZIC et al. (2009) ; CICERALE et al. (2010).
-Récupérations des espèces réactives d'oxygène.	VISIOLI et al. (1998) ; BENAVENTE-GARCIA et al. (2000) ; DUTHIE et al. (2003) ; HODZIC et al. (2009).
-Inhibition de la croissance bactérienne.	TURCOTTE et SAHEB (1978) ; KAMPA et al. (2003) ; RANDHIR et al. (2005) ; DE MARCO et al. (2007) ; RODRÍGUEZ VAQUERO et al. (2007).
-Induction de l'apoptose et de la différenciation cellulaire sur les cellules tumorales.	SAVARESE et al. (2007) ; ROCHA-GUZMÁN et al. (2007).

❖ Méthodes d'extraction, de quantifications et d'analyses des CP :

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des CP ont fait des progrès spectaculaires au cours de ces dernières années. Leur extraction est influencée par leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autres constituants végétaux.

Les méthodes d'extraction présentent le même principe à savoir solubilisation par un solvant organique polaire, filtration et délipidation par un solvant non polaire et enfin une concentration sous vide ; c'est une extraction liquide-liquide. L'extraction en phase solide a été aussi utilisée (LITRIDOU et *al.*, 1997 ; ROMANI et *al.*, 2001 ; PANAGIOTOPOULOU et TSIMIDOU, 2002). Plus récemment, les ultrasons et des micro-ondes assistées ont été utilisés par JAPÓN-LUJÁN et *al.*, (2006) pour leur extraction à partir des feuilles d'olive.

Diverses techniques ont été mises en œuvre pour l'analyse quantitative des cp. La méthode classique est la procédure colorimétrique utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la séparation chromatographique sur papier (CARRASCO-PANCORBO et *al.*, 2005), sur couche mince (ROBARDS et ANTOLOVICH, 1997, DEMECHKI et *al.*, 2001) ou sur colonnes avaient été largement développées, les séparations par électrophorèse sur papier, ainsi que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (BRIANTE et *al.*, 2002).

La technique HPLC est, de très loin, la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des CP (RP-HPLC plus particulièrement). Durant la décennie passée, l'identification des composés individuels est facilitée par la mise en œuvre des méthodes couplées à l'HPLC notamment la spectrométrie de masse (MS) (RYAN et *al.*, 1997 ; ANTOLOVICH et *al.*, 2004 ; NACZEK et SHAHIDI, 2004 ; DAMAK et *al.*, 2008). Différentes options de HPLC-MS ont été utilisées particulièrement ESI-MS-HPLC (HE et XIA, 2007 ; SAVARESE et *al.*, 2007) et HPLC-APCI-MS (RYAN et *al.*, 1999 ; SILVA et *al.*, 2005). Un autre outil puissant pour la détermination de nouvelles structures phénoliques est la résonance magnétique nucléaire (RMN) seule (OBEID et *al.*, 2007) ou couplée à la HPLC ou à la MS (DIMITRIOS, 2006 ; BENDINI et *al.*, 2007).

La caractérisation et la quantification des CP ont été réalisées avec succès par la CG et la HPLC mais l'utilisation des techniques plus rapides est recommandée notamment l'électrophorèse capillaire (EC) qui est caractérisée par une haute résolution, faible volume d'échantillon (μ l) et quelques minutes pour l'analyse (CARRASCO-PANCORBO et *al.*, 2006). L'EC peut être couplée à plusieurs détecteurs (UV, détecteurs électrochimiques) et à la MS. Actuellement la technique prometteuse pour l'estimation des CP totaux dans l'huile d'olive est la spectrométrie de fluorescence.

3.3.2.4. Quelques extraits naturels utilisés comme antioxydants dans les huiles:

Afin d'augmenter la stabilité oxydative des huiles, plusieurs sources d'antioxydants naturels ont été utilisées pour l'enrichissement des huiles de friture. Le tableau VI donne un aperçu des extraits naturels utilisés.

Tableau VI : Quelques extraits naturels utilisés pour enrichir les huiles.

Extraits	Huiles	Références
Extrait d'origan	Huile de palme	LOLOS <i>et al.</i> (1999)
Poudre d'origan	Huile de coton	HOUHOULA <i>et al.</i> (2004)
Extrait de romarin Extrait de sauge	Huile de palme	CHE MAN et JASWIR, (1999)
Extrait éthanolique de la sarriette	Huile de tournesol	YANISLIEVA <i>et al.</i> (1997)
Extrait méthanolique des feuilles de thé ; Extrait d'avoine	Huile de coton	ZANDI <i>et al.</i> (1999) TRIAN et WHITE (1994)
Poudre des épinards	Huile de soja	LEE <i>et al.</i> (2002)
Extraits des feuilles : chou, épinards,.....	Huile de tournesol, huile d'arachide	SHYAMALA <i>et al.</i> (2005)
Extrait des feuilles d'olive	Huile d'olive, huile de palme, huile de tournesol	SALTA <i>et al.</i> (2009)
Extrait méthanolique de l'avoine	Huile de tournesol Huile de Coton	TIAN <i>et al.</i> (1994)
Extrait des feuilles d'olive	Huile d'olive, de tournesol, de palme	CHIOU <i>et al.</i> (2007)
Extrait de la pulpe de grenade	Huile de tournesol	EL ANANY (2007)
Extrait de feuilles vertes de thé	Huile de canola	CHEN <i>et al.</i> (1996)
Extrait de feuilles de thé	Huile de colza	ZANDI <i>et al.</i> (1999)
Extrait de feuilles de thé	Huile de blé	NAZ <i>et al.</i> (2004)
Extrait de Pomposia	Huile de tournesol	REHAB. (2010)

3.3.2.5. Efficacité des antioxydants :

L'efficacité d'un antioxydant dépend des conditions de son application dans les produits alimentaires. L'activité des antioxydants dépend de leur polarité, les antioxydants liposolubles sont plus actifs dans les émulsions, par contre les antioxydants polaires agissent dans les graisses et huiles. Les antioxydants non polaires (tocophérols, palmitate d'ascorbyle) sont plus efficaces dans les émulsions du type huile/eau que dans les huiles. De plus, il est connu que l'efficacité des composés antioxydants naturels dépend de leurs structures tels que le nombre et la position de groupes hydroxyles et méthoxyles dans la molécule et elle est favorisée par la capacité de délocaliser et de stabiliser les électrons impairs et par la capacité de former des ponts hydrogène intramoléculaires (MANNINO *et al.*, 1999).

Partie pratique

1. Matériel et méthodes :

1. Matériel :

1.1. Matières premières :

✓ **Olives** : des olives vertes de la variété « *Chamlal* » ont été récoltées en janvier 2010. Ces olives proviennent d'un verger situé à Tadmait (Wilaya de Tizi-Ouzou). Les olives prélevées sont immédiatement triées, réparties en petites quantités de 200mg dans des sacs en plastique, puis congelées -18°C.

✓ **Feuilles d'olive**: des feuilles d'olive de la variété « *Chamlal* » ont été recueillies en mars 2009, ces feuilles proviennent de même verger. Ces feuilles sont triées, séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après séchage, les feuilles sont broyées en poudre. La poudre de feuilles est conservée dans un flacon teinté à température ambiante.

✓ **Margines** : des margines proviennent d'une huilerie moderne située à Tadmait (Tizi-Ouzou). Ces margines issues des récoltes de la saison 2008 /2009 sont immédiatement répartis dans des flacons en plastique de 250ml puis congelés à -18°C.

✓ **Huiles végétales** : deux huiles à large consommation sont utilisées : une huile de tournesol et une huile d'olive.

1.2. Appareillage :

- agitateur ;
- balance de précision (OHAUS) ;
- bain Mari (MEMMERT) ;
- centrifugeuse réfrigérée (SIGMA) ;
- rotavapeur (HEIDOLPH) ;
- spectrophotomètre UV Visible (SHINADZU) ;
- étuve : ((MEMMERT).

1.3. Produits chimiques et réactifs :

- solvants : acétate d'éthyle, acétone, acide acétique, acide trichloracétique, benzène, chloroforme, hexane, éthanol, méthanol.

-réactifs spécifiques et colorants : DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), acide thiobarbiturique, réactif de Folin-Ciocalteu, phénophtaléine.

- autres : carbonate de sodium, hydroxyle de sodium, thiosulfate, potassium ferricyanide, phosphate monopotassique, phosphate dissodique, iodure de potassium, FeCl₃.

1.2. Méthodes d'analyse:

1.2.1. Extraction des polyphénols des olives, des feuilles et des margines :

Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir d'olives est basé sur la méthode décrite par BRENES *et al.* (1997) dont les principales étapes sont résumées dans la figure 13.

La figure 14 illustre les principales étapes d'extraction des polyphénols à partir des feuilles d'olive en se basant sur la méthode de GARIBOLDI *et al.* (1986).

Pour l'extraction des polyphénols à partir des margines, nous avons opté pour la méthode décrite par DE MARCO et *al.* (2007) dont les principales étapes sont résumées dans la figure 15.

1.2.2. Dosage des polyphénols totaux :

La concentration des composés phénols est déterminée par la méthode de SINGLETON et *al.* (1999) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et repose sur l'oxydabilité des composés phénoliques lors de la réaction. Les acides phosphomolybdique et tungstique seront réduits en présence de ces composés en donnant une coloration bleue dont l'intensité est estimée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

La méthode de SINGLETON et *al.* (1999) consiste à rajouter successivement à 125 µl d'échantillon ou de ses dilutions :

- 500 µl d'eau distillée ;
- 125 µl de réactif de Folin-Ciocalteu;
- 1,250 ml d'une solution de carbonate de sodium (7%) ;
- de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 3ml;
- Après une heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

Les concentrations sont données en équivalent d'acide gallique (mg/g). La gamme des concentrations utilisée pour établir la courbe étalon varie de 0,025-0,05mg/ml.

1.2.3. Extraction et dosage colorimétrique des polyphénols totaux dans l'huile :

La figure 16 illustre les principales étapes d'extraction et de dosage des polyphénols dans l'huile. La méthode de CAPANNESI et *al.* (2000) a été utilisée pour les extraire et les doser. La courbe étalon est obtenue en utilisant une gamme des concentrations de l'acide gallique de 0,04 - 0,2 mg/ml.

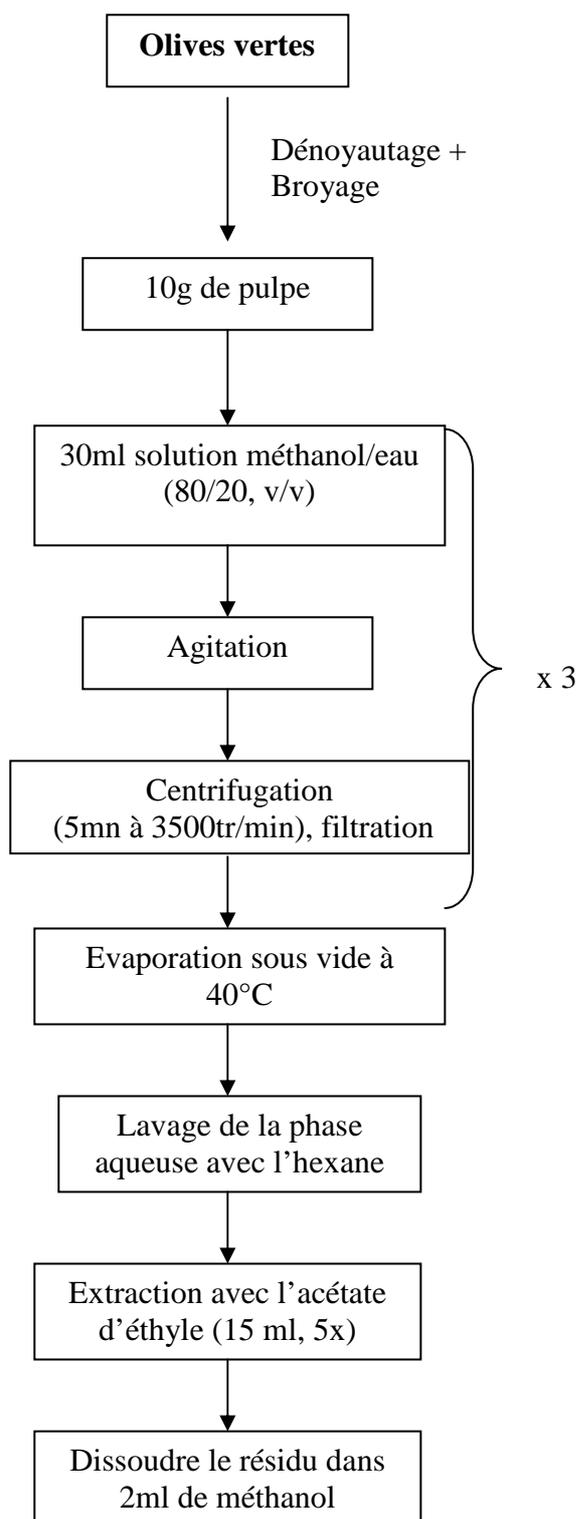


Figure 13 : Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des olives vertes (BERNES *et al.*, 1997)

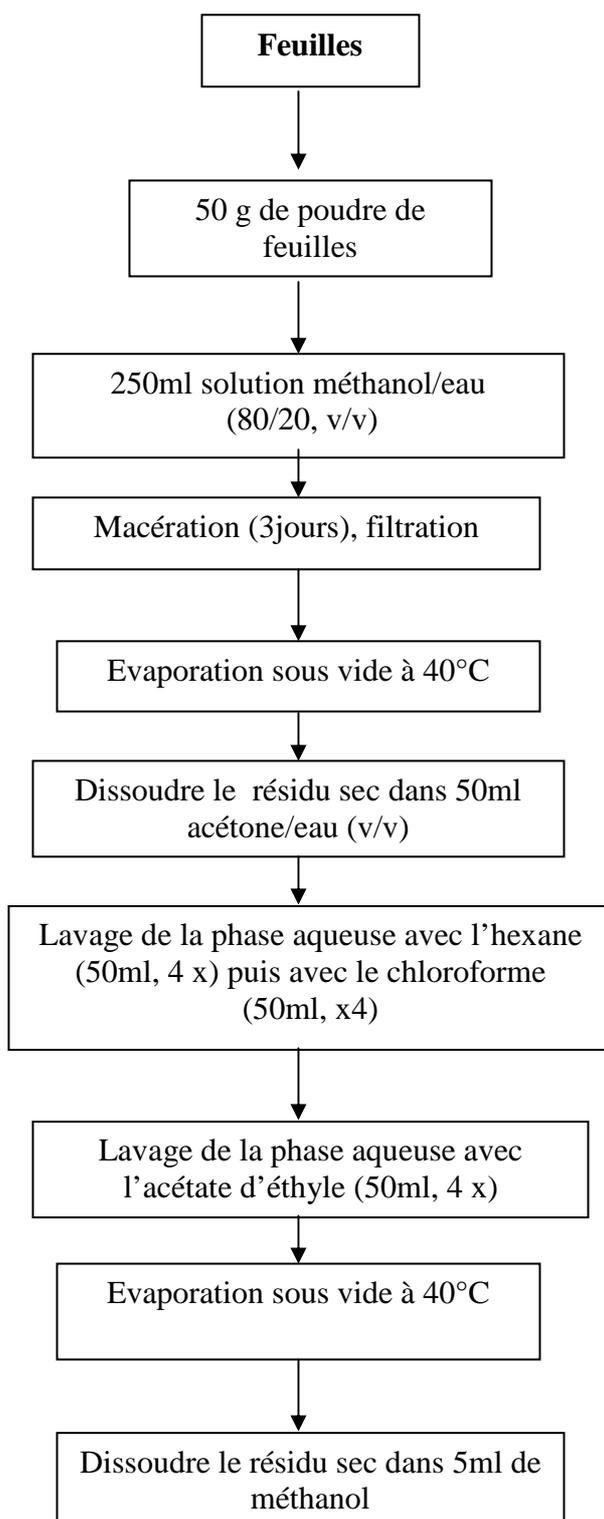


Figure 14: Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olive (GARIBOLDI *et al.*, 1986)

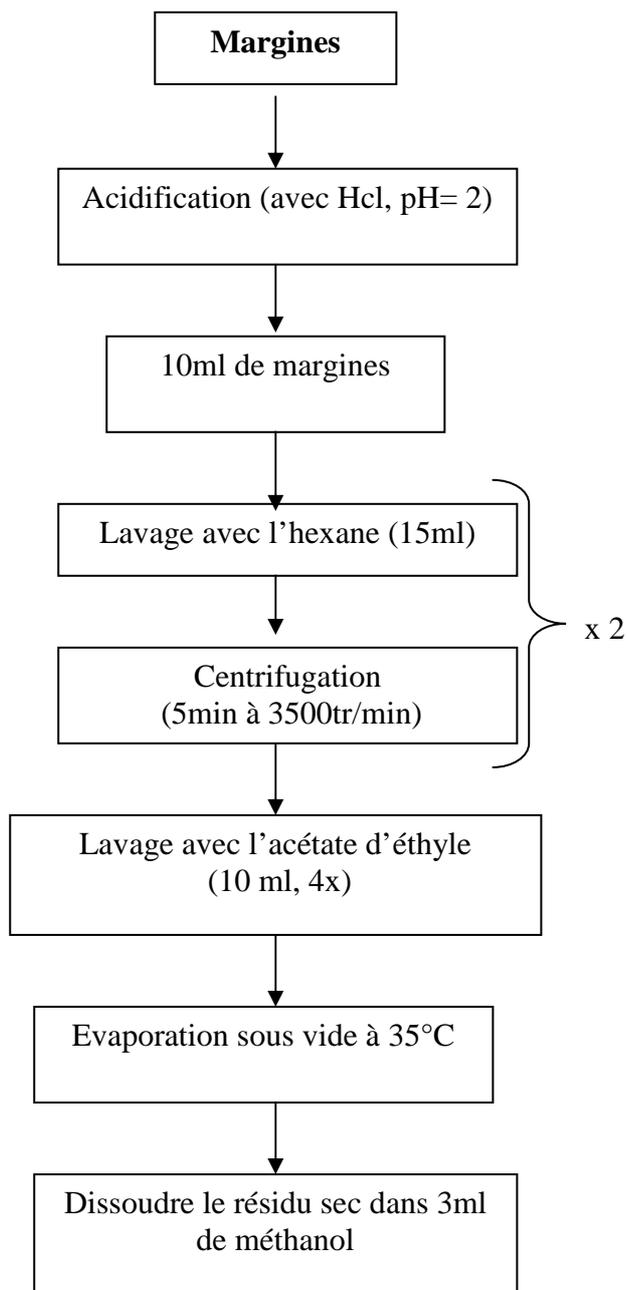


Figure 15: Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines (DE MARCO et al., 2007)

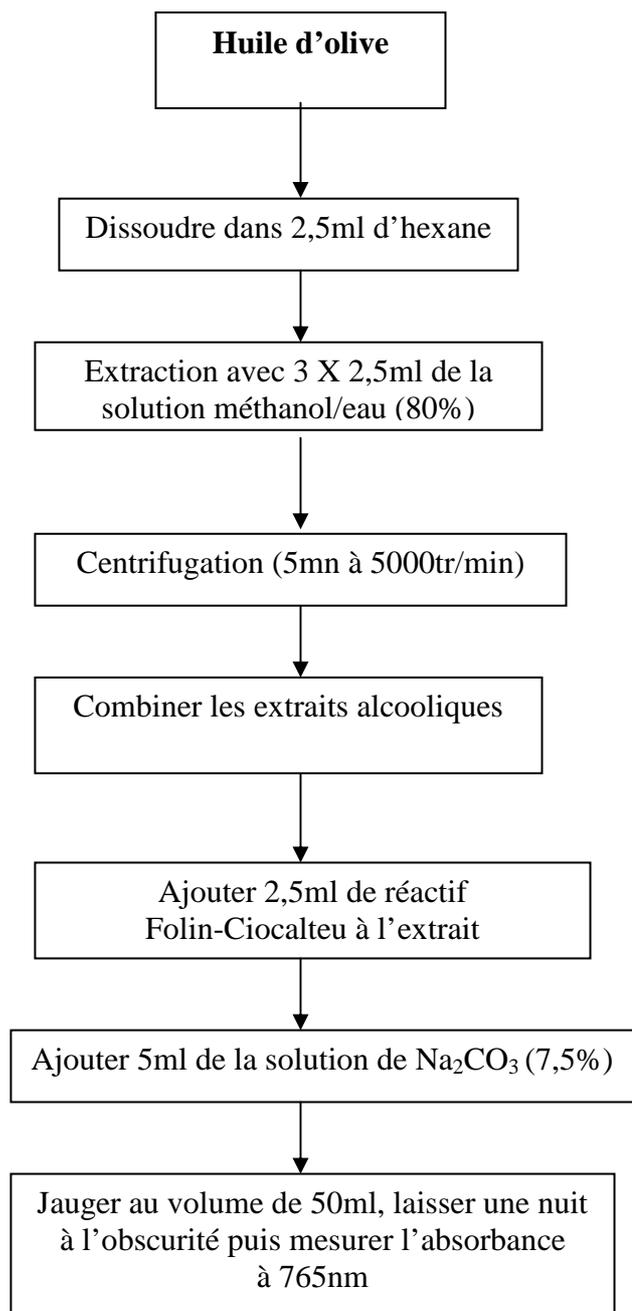


Figure 16: Diagramme d'extraction et de dosage des composés phénoliques des huiles (CAPANNES et al., 2000)

1.2.4. Détermination de la capacité antiradicalaire :

Le radical libre DPPH· est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante des extraits phénoliques, qui en présence d'un antioxydant est réduit en DPPH-H et ainsi son absorbance est diminuée. La figure 17 montre le mécanisme par le quel le radical DPPH· accepte l'hydrogène d'un antioxydant.

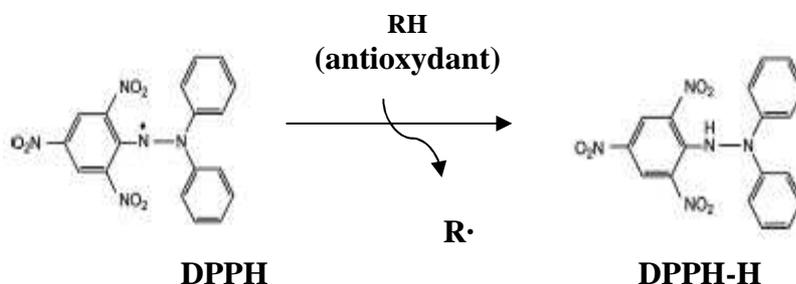


Figure 17: Réaction de réduction de DPPH· par l'antioxydant (MOON et SHIBAMOTO, 2009).

La capacité antiradicalaire des extraits a été évaluée par la méthode de KUSILIC et *al.* (2004), qui consiste à rajouter à 50µl de l'extrait ou à ses dilutions 3ml de la solution méthanolique de DPPH (6×10^{-5} mM). Après 60 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517nm. La diminution de l'absorbance est mesurée par la IC₅₀ (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH·). Une IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydante élevée de l'extrait. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_{(\text{DPPH})} - A_{(\text{échantillon})}}{A_{(\text{DPPH})}} \times 100$$

$A_{(\text{DPPH})}$: absorbance de la solution méthanolique de DPPH (6×10^{-5} M).

$A_{(\text{échantillon})}$: absorbance de l'échantillon après 60 min d'incubation.

1.2.5. Détermination du pouvoir réducteur (FRP) (réduction ferrique) :

La méthode décrite par CHEW et *al.* (2009) est adoptée pour déterminer le FRP des extraits phénoliques. Ce test est utilisé pour tester la capacité des antioxydants à réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} impliquant le mécanisme de transfert des électrons.

1ml de l'extrait à différentes concentrations, sont ajoutés 2,5ml du tampon phosphate (0,1M ; pH = 6,6), 2,5ml de solution à 1% de potassium ferricyanide. Le mélange est agité puis incubé à 50°C pendant 20 min.

Après l'incubation, 2,5ml de solution à 10% de TCA (acide trichloracétique) sont ajoutés suivie d'une centrifugation à 3352xg pendant 10 minutes. 2,5ml de surnageant sont prélevés, la dilution se fait avec 2,5ml d'eau distillée puis 0,5ml de solution à 0,1% de FeCl_3 sont ajoutés. Le tout est incubé à 28°C pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 700nm. L'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

1.2.6. Analyse des huiles :

L'acidité, l'indice de peroxydes, le test de TBA et le test de DPPH sont utilisés pour estimer l'effet antioxydant des phénols individuels et des extraits phénoliques ajoutés aux huiles de tournesol et d'olive.

Les conditions de traitement thermique appliqué sont :

- Température choisie (température simulant la friture) : $180 \pm 5^{\circ}\text{C}$;
- Durée de chauffage en présence et en absence de pomme de terre (comme aliment de friture) : 15 min.

Les concentrations des extraits phénoliques et les phénols individuels testés sont 100mg/kg d'huile (simple concentration) et 200mg/kg d'huile (double concentration). La double concentration de 200mg/kg d'huile est la concentration en polyphénols autorisée.

Le choix de l'acide gallique et de l'acide caféique qui sont des acides phénoliques simples est dû à leurs appartenance à deux groupes : l'un appartient au groupe d'acides benzoïques ($\text{C}_6\text{-C}_1$) et l'autre au groupe d'acide cinnamique ($\text{C}_6\text{-C}_3$). L'effet antioxydant de la vanilline (aldéhyde) et de l'oleuropéine (secoiridoïde); constituant majeur des feuilles et des olives, a été également testé.

1.2.6.1. Détermination de l'indice d'acide (Norme AFNOR NFT 60-204, 1988) :

L'acidité d'une huile est définie comme étant le pourcentage d'acides gras libres exprimé selon la nature du corps gras :

- Acide palmitique de poids moléculaire 256g/l (huile de palme) ;
- Acide laurique de poids moléculaire 200g/l (huile de coprah et palmiste) ;
- Acide oléique de poids moléculaire 282,5g/l (autres huiles).

Une prise d'essai est dissoute dans l'alcool (éthanol), porté au voisinage d'ébullition, et préalablement neutralisée par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,1 N, en présence de phénophtaléine, puis les acides gras libres présents sont titrés à l'aide de la même solution d'hydroxyde de potassium.

Le pourcentage d'acide oléique est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'acide oléique} = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

V : volume, en millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium.

C : concentration, en M/l de solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ($C = 0,1$).

M : masse molaire de l'acide oléique.

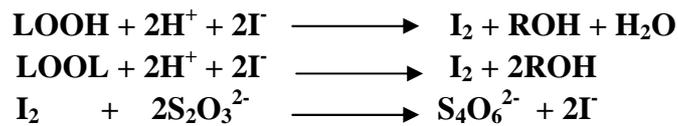
m : masse en gramme de la prise d'essai.

1.2.6.2. Détermination de l'indice de peroxyde (Norme AFNOR NFT 60-220, 1968) :

L'indice de peroxyde (I_p) d'un corps gras représente le nombre de milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme de matière grasse (méq d' O_2 /kg d'huile).

Les corps gras sont traités en solution, dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium. Par la suite, l'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de sodium (0,01 N), en présence d'empois d'amidon utilisé comme indicateur.

Le mécanisme réactionnel est le suivant :



L'indice de peroxyde est donné par la formule suivante :

$$\text{Ip (még d'O}_2 \text{ actif / kg d'huile)} = \text{N x (V - V}_0\text{) x 1000 / m}$$

N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium ($\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O).

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium (0,01 N) utilisée pour l'essai.

V₀ : volume de la solution de thiosulfate de sodium (0,01 N) utilisée pour le blanc.

m: prise d'essai exprimée en gramme d'huile.

1.2.6.3. Test de TBA (acide thiobarbiturique):

Le test TBA est un test fréquemment utilisé pour évaluer l'état d'oxydation des corps gras. Il rapporte le niveau des aldéhydes (produits secondaires de l'oxydation) dans les huiles.

La valeur de TBA représente le nombre de milligrammes de malondialdéhyde (MDA) par kilogramme de l'échantillon. Ce test se base sur la réaction entre le TBA et les produits secondaires d'oxydation des lipides.

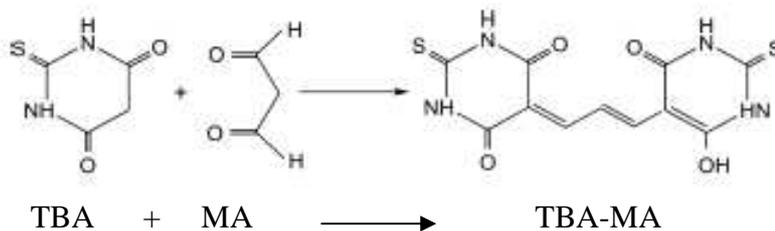


Figure 18: Formation de substances réactives d'acide thiobarbiturique (MOON et SHIBAMOTO, 2009).

La méthode décrite par SIDWELL et *al.* (1954) a été utilisée. Une prise d'essai (3g) est traitée dans un solvant organique (10ml de benzène), auquel est ajoutée la solution de TBA (10ml, 0,67%). Après agitation, la phase aqueuse est séparée puis incubée dans un bain marie bouillant pendant 30 minutes. Après refroidissement à l'eau de robinet, l'absorbance est mesurée à 530 nm contre l'eau distillée. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des produits secondaires formés.

1.2.6.4. Capacité antioxydante :

La capacité antioxydante des huiles testées avant et après enrichissement est mesurée par le test de DPPH. Les antioxydants présents dans l'huile neutralisent le DPPH· et la diminution de la concentration de ce radical est suivie par la diminution de l'absorbance à 517 nm. La solution initiale de couleur violette tourne vers le jaune lorsque toute la quantité de radical est neutralisée par les antioxydants.

La capacité antioxydante des huiles est estimée suivant la méthode décrite par SALTA et *al.* (2009), qui consiste à ajouter à 1ml de la solution de l'huile (huile dans le chloroforme : 10%, p/v) 4ml de la solution de DPPH (DPPH dans le chloroforme, 6×10^{-5} M). Après incubation de 30 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH}\cdot = [(A_c - A_{t=30}) / A_c] \times 100$$

A_c : absorbance de contrôle (solution de DPPH· dans le chloroforme, 6×10^{-5} M).

$A_{t=30}$: absorbance de l'échantillon.

2. Résultats et discussion :

2.1. Concentration des polyphénols extraits à partir des olives, des feuilles et margines : Le dosage des extraits obtenus à partir de la pulpe d'olive, des feuilles et des margines nous a permis de déterminer leur concentration en utilisant la courbe d'étalonnage de la figure 19.

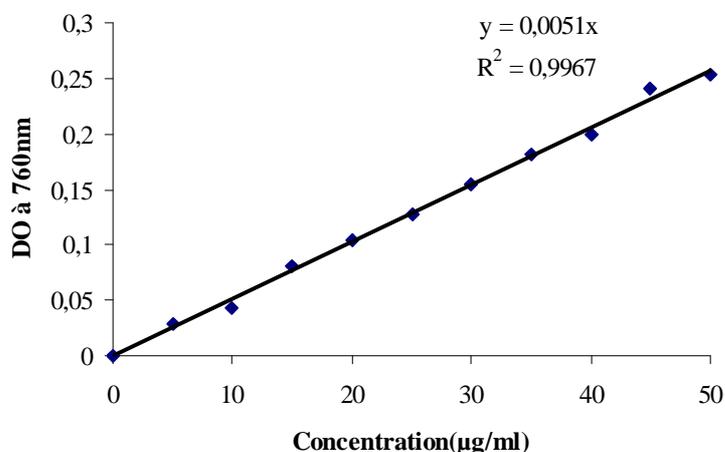


Figure 19 : Courbe étalon de dosage des polyphénols des extraits phénoliques.

La concentration en PPT est déterminée et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Concentrations des polyphénols des extraits des olives, feuilles et les margines (nombre d'essai = 3).

Matières premières	Concentration en PPT (g/kg)
Feuilles	16,78 ± 1,76
Pulpe	7,49 ± 0,36
Margines	2,63 ± 0,64

La concentration des PPT des feuilles trouvée (16,78g/kg) est supérieure à celles apportées par BOUDHRIOUA *et al.* (2008) qui varie de 1,4 à 2,4g/kg et DE LEONARDIS *et al.* (2008) qui est de 0,6g/kg. Toutefois, la concentration trouvée reste dans la gamme rapportée par SILVA *et al.* (2006) qui se situe entre 11,7 et 40,1g/kg.

La concentration des PPT des margines est très supérieure aux valeurs apportées par RAMEZANI et PEYVAST (2002) et AIT BADDI *et al.* (2008) qui sont situées entre 25 et 38mg/kg et 0,80g/g, respectivement. Néanmoins, la valeur trouvée reste très inférieure aux valeurs données par SOBHI *et al.* (2004) (6,8g/l), GONÇALVES *et al.* (2009) (5-12g/l) et OBEID *et al.* (2007) (17,7-21,1mg/g).

En ce qui concerne les PPT des olives, la valeur trouvée est très faible par rapport à celle apportée par SILVA *et al.* (2006) qui varie entre 13,9-30g/kg. Toutefois, la valeur trouvée (7,49g/kg) est supérieure à celle trouvée par OWEN *et al.* (2004) (4,48g/kg).

La différence entre les valeurs trouvées et celles apportées par la bibliographie peut être expliquée par la nature du matériel de départ et la méthode d'extraction adoptée.

En fait, la variabilité de la teneur en PPT est largement dépendante de plusieurs facteurs : cultivar, degré de maturation (BOUDHRIOUA *et al.*, 2008), des conditions climatiques, géographiques (MYLONAKI *et al.*, 2008), de l'état physiologique et l'âge de la plante (DE LEONARDIS *et al.*, 2008).

De plus, le rendement d'extraction dépend de la polarité du solvant utilisé, qui détermine la quantité, la qualité des composés phénoliques extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal (SINEIRO *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont rapportées que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. D'après, SAVARESE *et al.* (2007), FALLEH *et al.* (2008) et CHEW *et al.* (2009), le méthanol est le solvant de choix pour l'extraction des PPT à partir des fruits, végétaux et huiles. Grâce à sa polarité et sa capacité à réduire l'activité des polyphénol-oxydases, ce solvant a prouvé son efficacité d'extraire les PPT simples (RYAN *et al.*, 2001 ; ABAD-GARCIA *et al.*, 2007). Quand à l'acétate d'éthyle, c'est un solvant très sélectif pour les molécules de bas (180 Da) et moyen (13KDa) poids moléculaire (LESAGE-MEESSEN *et al.*, 2001 ; OBEID *et al.*, 2005). De plus, ALLOUCHE *et al.* (2004) ont montré que l'acétate d'éthyle exerce un haut pouvoir d'extraction par rapport aux autres solvants (diéthyl éther, méthyl isobutyl cétone).

L'utilisation de l'hexane ou le chloroforme n'augmente pas la concentration des PPT dans l'extrait mais elle permet d'éliminer la fraction lipidique du matériel végétal (MICHAILOF *et al.*, 2008).

D'après OBEID *et al.* (2005a), l'acidification, lors de l'extraction des polyphénols à partir des margines, précipite les protéines, hydrolyse des liaisons entre les biophénols et les composants des parois cellulaires et augmente la solubilité des polyphénols dans les solvants organiques. En plus, l'acidification cause l'hydrolyse des composés phénoliques complexes, par conséquence, la libération des phénols monomères (DE MARCO *et al.*, 2007). Cet effet a été confirmé par ces mêmes auteurs, qui ont observé une augmentation de la concentration de de l'hydroxytyrosol, du tyrosol, de l'acide cafféique et du verbascoside dans les extraits de margines acidifiés.

De plus, le facteur temps d'extraction est une considération très importante, un temps long augmente la possibilité d'oxydation des CP, à moins que des agents réducteurs sont ajoutés dans le système d'extraction (acide ascorbique, bisulfite à raison de 2%) (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; OBEID *et al.*, 2005b).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisé pour quantifier les PPT des extraits, se basant sur le mécanisme de transfert d'électron et la capacité réductrice des phénols. Les niveaux de PPT déterminés ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel du départ mais sont en fait, basés sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente de l'acide gallique. En effet l'absorbance molaire d'un phénol dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles, mais la capacité réductrice est augmentée quand deux groupes hydroxyles d'un phénol sont en position *para* ou *ortho* (MC DONARD *et al.*, 2001 ; KATALINIC *et al.*, 2006).

Cependant, CARRASCO-PANCORBO *et al.* (2005) a rapporté que les composés monophénoliques conduisent à la formation de la moitié des complexes colorés, en comparaison aux composés diphénoliques, et font ainsi, approximativement la moitié de l'absorbance molaire. Ceci signifie que les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait. La diversité des composés phénoliques et leur distribution dans la plante peuvent expliquer la différence de concentrations des polyphénols obtenues.

2.2. Estimation de la capacité antioxydante des extraits obtenus :

Selon ALMELA *et al.* (2006) et OBEID *et al.* (2007), la quantification et l'identification des polyphénols des extraits végétaux sont considérées comme la première étape vers l'évaluation de la capacité antioxydante. De plus, MINIOTI et GIORGIU (2010) considèrent que la quantification des polyphénols totaux est un indice de l'activité antioxydante totale de l'huile d'olive.

Le DPPH est un radical stable à température ambiante, accepte un électron ou un hydrogène et devient stable (RAJESHWAR *et al.*, 2005). La capacité anti radicalaire des extraits phénoliques est déterminée en utilisant ce radical. Ce test est largement utilisé pour évaluer la capacité antioxydante en relation avec sa faible consommation du temps par rapport aux autres méthodes.

La méthode est basée sur la réduction de ce radical en présence d'un antioxydant qui cède un proton ou un électron. La solution de DPPH de couleur violet montre une absorption maximale à 517 nm, en présence d'un antioxydant l'absorption diminue et la décoloration de la solution est stochiométrique. Donc, la capacité de réduction de DPPH \cdot est estimée par la diminution de l'absorbance induite par les antioxydants présents dans les extraits phénoliques.

La capacité des extraits phénoliques et de l'acide gallique à neutraliser le DPPH \cdot est donnée par la figure 20.

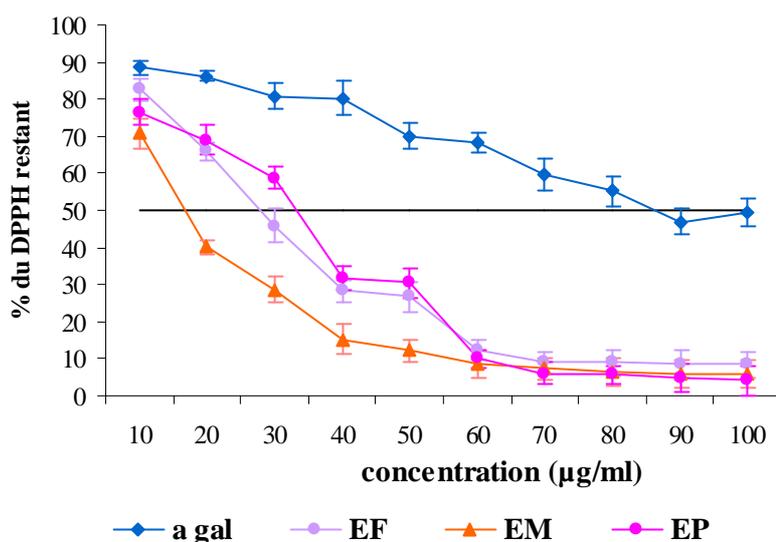


Figure 20 : Le pourcentage de neutralisation de DPPH des extraits phénoliques et de l'acide gallique (a gal : acide gallique ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

Les trois extraits testés ont la capacité de réduire le radical DPPH, la neutralisation augmente en augmentant la concentration des CP de 10 à 100µg/ml. Au de là de 60µg /ml, les trois extraits phénoliques inhibent totalement le DPPH. L'extrait des margines a montré une forte activité par rapport aux extraits de feuilles et de pulpe.

Le tableau VIII donne les valeurs de la IC₅₀ des extraits phénoliques et de l'acide gallique. La détermination de la valeur absolue de la capacité antioxydante des extraits est difficile parce qu'elle dépend de la concentration de radical, de sa dégradation durant l'analyse et la possibilité d'interférence avec d'autres composants du milieu. Pour ces raisons, on calcule la IC₅₀, la quantité équivalente (µg/ml) de l'extrait qui neutralise 50% du radical. La IC₅₀ est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, ce qui permet de mettre en relief l'activité plus importante de l'extrait de margines par rapport aux autres extraits de feuilles et de pulpe et de l'acide gallique.

Tableau VIII : Activité antioxydante des extraits phénoliques et de l'acide gallique exprimée en IC₅₀.

	IC ₅₀ (µg/ml)
Acide gallique	84,58 ± 1
Extrait de pulpe (EP)	27 ± 0,8
Extrait de feuilles (EF)	23 ± 0,7
Extrait de margines (EM)	12 ± 0,5

La capacité antioxydante de ces extraits devient plus claire quand on l'exprime en indice d'efficacité (1/IC₅₀), la figure 21 rapporte l'efficacité de EF, EM, EP et a gal.

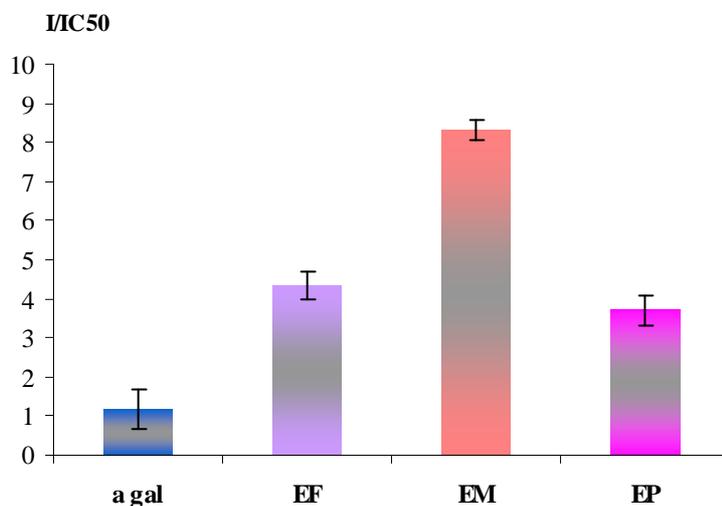


Figure 21 : Indice d'efficacité des extraits phénoliques et de l'acide gallique (EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe, a gal : acide gallique).

D'après ces résultats, les trois extraits montrent des activités anti oxydantes différentes et sont supérieures à celle de l'acide gallique. Les résultats obtenus avec ces extraits montrent que la quantité et la qualité des PPT est corrélée avec la capacité antioxydante (r = 0,843).

Plusieurs auteurs ont montré la corrélation entre ces deux facteurs (MOYER *et al.*, 2002 ; WANG *et al.*, 2009). RAJESHWAR *et al.*, (2005) ont rapporté que les composés phénoliques peuvent contribuer directement à l'activité antioxydative. De plus, MINIOTI et GEORGIU (2010) ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante évaluée par le test de DPPH ($r = 0,89$) et le test de ABTS ($r = 0,69$).

Cette différence peut s'expliquer par la différence de la composition phénolique de ces extraits ; la capacité de réduction des radicaux libres est largement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (CHEUNG *et al.*, 2003 ; ALZAAWELY *et al.*, 2007).

Selon De MARCO *et al.* (2007), les CP des margines, qui sont plus abondants et responsables de pouvoir polluant de ce résidu, sont caractérisés par une forte activité antioxydante. Durant l'extraction de l'huile d'olives, les composés phénoliques constituent le substrat de réactions enzymatiques, chimiques et physiques qui les modifient et déterminent leur présence dans les eaux de végétation. Après l'extraction, moins de 2% de composés phénoliques de fruit se retrouvent dans l'huile d'olive et plus de 98% passent dans les eaux de végétation (RODIS *et al.*, 2002), par conséquent, ce résidu peut être considéré comme source importante de ces composés. De plus, la variabilité du type et de la quantité des polyphénols des margines est due à plusieurs facteurs : géographique, variétal, saisonnier et le mode d'extraction.

La composition phénolique des margines a été largement étudiée, SERVILLI *et al.*, (1999) ont montré qu'elle est très différente de celle de fruit d'olives : bien que les olives sont très riches en sécoiridoïdes glycosides, les margines contiennent une concentration élevée de dérivés de sécoiridoïdes comme l'hydroxytyrosol et la forme dialdéhyde de décarboxyméthyl oleuropéine aglycone. Néanmoins, la fraction phénolique est caractérisée par une grande complexité comme il a été démontré par BIANCO *et al.*, (2003), qui ont identifié 20 composés en utilisant la technique HPLC-MS-MS.

Parmi les composés phénoliques des margines, selon DE MARCO *et al.* (2007), le plus abondant et très intéressant de point de vue nutritionnel est l'hydroxytyrosol [2-(3, 4-dihydroxyphényl) éthanol : HT], largement étudié et ses propriétés antioxydantes et pharmacologiques ont été démontrées. Dans les margines, le HT se présente à l'état libre (monomère), sous forme lié (oleuropéine, verbascoside) et sous forme glycosylée (OBEID *et al.*, 2007). Un autre composé phénolique simple identifié dans les margines est le 3, 4-dihydroxyphénylglycol (DHPG), de structure similaire à celle de HT mais avec présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire et doué des propriétés antioxydantes (LIMIROLI *et al.*, 1996). RODRIGUEZ *et al.*, (2007) ont démontrés que l'efficacité antioxydante de DHPG dans un milieu hydrophile est supérieure à celle de l'acide ascorbique et celle de HT, alors que dans un milieu lipidique elle est comparable à celle de la vitamine E malgré sa polarité élevée. RODRIGUEZ *et al.*, (2009) ont prouvés que les eaux de végétation des huileries constituent une source importante de DHPG.

De plus, OBEID *et al.* (2007) ont identifiés d'autres composés phénoliques simples des margines avec un haut pouvoir antioxydant. Il s'agit de l'hydroxytyrosol acyclodihydroelenolate et *p*-coumaryl-6'-secologanoside, les deux montrent *in vitro* une capacité de piéger le radical DPPH comparable à celle de HT et oleuropéine.

Cependant, l'hydroxytyrosol acyclodihydroelenolate est plus efficace que le HT et l'oleuropéine, il semble que la structure linéaire de ce composé est plus accessible (GORDON et KOURIMSKA, 1995).

Il est bien connu que les composés phénoliques des fruits et les feuilles de la famille de l'*Olea europaea* varient quantitativement et qualitativement durant les processus de développement et de maturation. Les feuilles constituent un autre sous produit de l'industrie oléicole, qui a été exploré comme source de composés phénoliques. Selon DE LEONARDIS et *al.* (2008), la composition phénolique des feuilles est similaire à celle des olives, l'oleuropéine et autres sécoiridoïdes sont les principaux composés, mais les formes simples dont le HT sont présents mais en faible quantité.

La concentration de l'oleuropéine dans les feuilles est significativement plus élevée que dans le fruit ou dans l'huile (SCHEFFLER et *al.*, 2008). Les feuilles contiennent aussi le HT, le verbascoside, la rutine, l'apeginine-7-glucoside et le luteoline-7-glucoside (ALTIOK et *al.*, 2008). Les oleosides (oleuropéine et ligstrosides) sont les composés les plus significatifs du fruit.

La majorité des composés phénoliques est stockée presque exclusivement sous forme conjuguée. La conjugaison augmente la solubilité et peut être impliquée dans la compartimentation de certains composés dans la cellule (RYAN et *al.*, 2002).

L'activité antioxydante des CP est due à leurs propriétés redox, qui leurs permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs de proton ou séquestrants d'oxygène singulet. BENAVENTE-GARCIA et *al.* (2000) ont rapporté que la séquence de capacité neutralisante des radicaux libres est la suivante : rutine > catéchine \approx lutéoline > HT > diosmetine > acide cafféique > verbascoside > oleuropéine > lutéolin-7-glucoside \approx acide vanillique \approx diosmetin-7-glucoside > apeginine-7-glucoside > tyrosol > vanilline.

De plus, BOUAZIZ et *al.* (2005), en testant l'activité anti radicalaire des flavonoïdes pures et des phénols simples, ont démontré la forte activité de HT, suivie de celle de l'acide cafféique et de la quercétine. Ces composés selon ces mêmes chercheurs montrent un pouvoir antioxydant comparable à celui du BHT, composé synthétique utilisé comme antioxydant dans la plupart des aliments. L'hydroxylation de cycle aromatique a prouvé son influence sur le pouvoir antioxydant, la présence de deux groupes hydroxyles en position *ortho*- (comme HT, acide cafféique) confère une activité puissante par contre l'existence d'un seul groupe OH (cas de tyrosol, acide *p*-coumarique) montre un faible pouvoir antioxydant (FEKI et *al.*, 2005).

Il existe donc des différences quantitatives et qualitatives en composition phénolique des feuilles, de fruits (olives) et les sous produits issus de l'industrie oléicole ce qui peut expliquer la différence de l'activité antioxydante des extraits obtenus.

2.3. Détermination de la capacité réductrice (FRAP) :

La capacité antioxydante des extraits peut être évaluée aussi par la détermination du pouvoir réducteur. La figure 22 montre le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et de l'acide gallique en fonction de leurs concentrations.

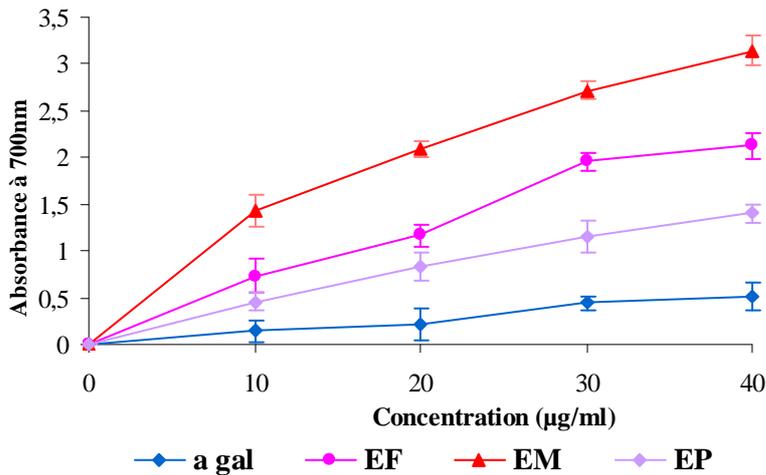


Figure 22 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et de l'acide gallique (a gal : acide gallique ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

L'activité antioxydante a été reportée pour être concomitante avec le développement de pouvoir réducteur. La capacité réductrice d'un composé donné sert comme un indicateur significatif de son pouvoir antioxydant.

Dans ce test, la couleur jaune des solutions à tester vire vers le vert bleu, dépendant du pouvoir réducteur de chaque composé. La présence des réducteurs tel que les antioxydants provoquent la réduction du complexe Fe^{+3} / ferricyanide donnant la forme ferreux (Fe^{+2}).

Le FRAP des extraits ainsi que celui de l'acide gallique augmentent avec la concentration. Les résultats obtenus montrent une corrélation significative entre le FRAP et la concentration en PPT ($r = 0,9$). D'après THAIPONG *et al.* (2006) le FRAP est un test simple, reproductible et montre une corrélation significative avec la quantité des PPT.

Les extraits ont montré un FRAP plus élevé que celui de l'acide gallique. Cependant, l'extrait de margines montre un haut pouvoir réducteur. Le FRAP augmente dans l'ordre suivant : $EM > EF > EP > \text{acide gallique}$. Ceci peut s'expliquer par la différence de la composition phénolique des extraits, l'extrait de margines contient les formes simples des phénols et leurs dérivés tandis que l'extrait de feuilles et de pulpes contiennent des formes plus complexes en composés phénoliques (oleuropéine est le constituant majeur).

Les résultats de la capacité réductrice et la capacité anti radicalaire des extraits phénoliques montrent une corrélation significative avec la concentration des polyphénols totaux. Des résultats similaires ont été obtenus par THAIPONG *et al.* (2006) en étudiant l'activité antioxydante de l'extrait des fruits par comparaison des différents tests d'estimation de pouvoir antioxydant. Dans le même contexte, AKINMOLDUN *et al.* (2007) ont démontré une corrélation positive entre les polyphénols, le pouvoir réducteur et la capacité antioxydante mesurée par le test de DPPH. Le pouvoir antioxydant d'un extrait végétal dépend de sa pureté, de la nature, la structure chimique et la bioactivité de ses constituants.

2.4. Analyse des différents paramètres de l'huile de tournesol enrichie lors du chauffage :

2.4.1. Évolution de l'indice de peroxyde (Ip) :

Les figures 23 et 24 montrent l'évolution de l'Ip de l'huile de tournesol (TS) enrichie avec les extraits phénoliques et les acides phénoliques individuels aux concentrations de 100 et 200 mg/kg respectivement.

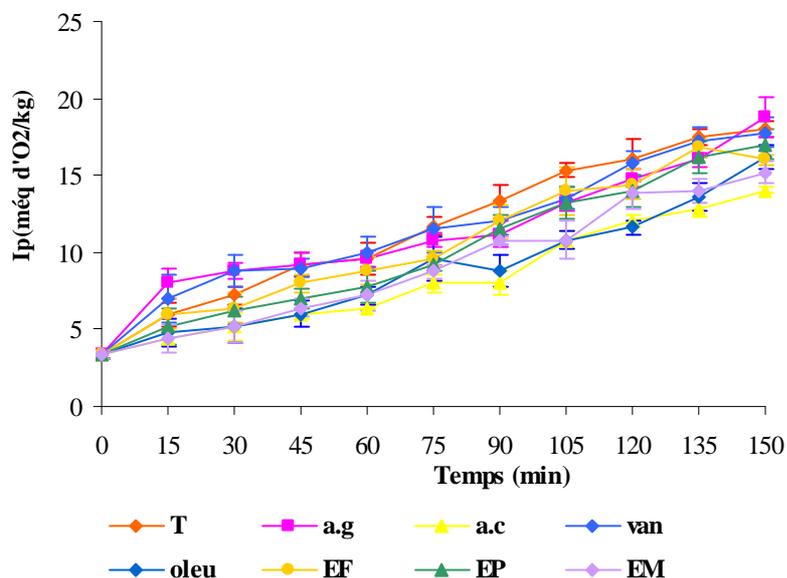


Figure 23 : Évolution de l'Ip de l'huile de tournesol additionné avec 100 mg/kg des anti oxydants lors du traitement thermique à 180°C (T : témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe).

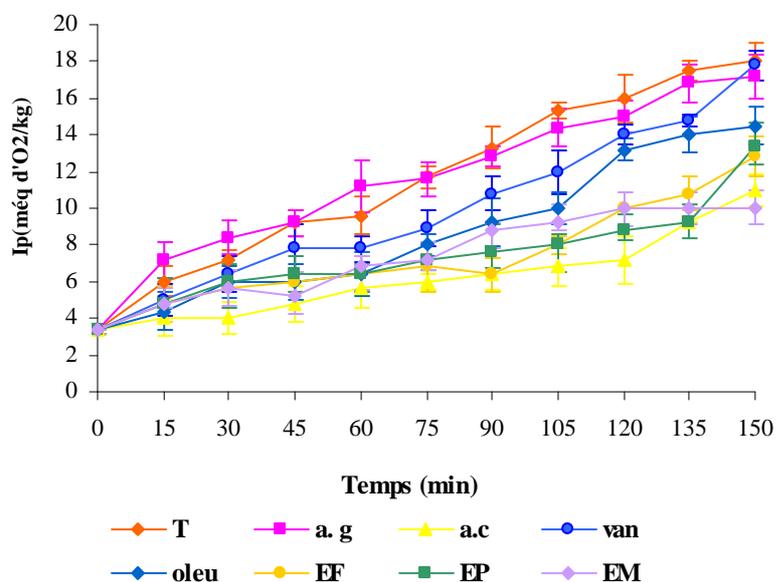


Figure 24 : Évolution de l'Ip de l'huile de tournesol (TS) enrichie avec 200mg/kg d'anti oxydants lors du traitement thermique à 180°C (T : témoin, a g : acide gallique, a c : acide cafféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe).

L'indice de peroxyde est un paramètre qui peut nous renseigner sur l'évolution de l'oxydation de l'huile lors du traitement thermique ou au cours de friture des aliments. Les hydroperoxydes sont considérés comme étant les produits primaires qui fourniraient l'information la plus pertinente sur l'intensité de la peroxydation. La méthode utilisée pour les mesurer correspond au titrage iodométrique.

Dans leur globalité, les résultats consignés dans les figures 23 et 24 montrent une augmentation progressive de l'Ip de TS lors du traitement thermique et ceci en présence des antioxydants aux deux concentrations étudiées. LUKEŠOVÁ *et al.*, (2009) ont montré que les valeurs de peroxydes de l'huile de tournesol augmentent graduellement au cours de traitement thermique dans les microondes. De plus, REHAB (2010) a rapporté que les valeurs de peroxydes augmentent graduellement au cours de traitement thermique des huiles.

L'huile de TS sans additifs d'antioxydants (témoin) présente les plus hauts Ip. En fait, la valeur initiale de peroxydes de TS était de 3,4 méq d'O₂/kg d'huile, il est 6 fois plus élevé (18 méq d'O₂/kg d'huile) à la fin de l'expérience. Déjà la valeur initiale de l'indice de peroxyde est très élevée. Ceci pourrait être attribué à de mauvaises pratiques lors du conditionnement ou du stockage ou les deux à la fois qui favorisent la formation des produits primaires de l'oxydation.

Les hydroperoxydes, produits primaires de l'oxydation des lipides, donc leurs déterminations peuvent être utilisés comme indice d'oxydation des premiers stades d'oxydation. BEŠTER *et al.* (2007) considèrent que la valeur de peroxyde est utile pour contrôler les stades initiaux de l'oxydation, mais son utilisation est limitée pour la mesure de l'oxydation continue à des conditions sévères. A une température d'environ de 100°C, les produits d'oxydation primaires se forment et se décomposent rapidement en composés volatils et non volatils. Néanmoins, SHYU *et al.* (1998) et ALLAM et EL SAYED (2004) ont montrés que l'Ip augmente graduellement au cours du traitement thermique à une température stimulant la friture. De plus, JEAN-MARC et MEREILLE (2003) ont montré que l'indice de peroxydes et l'indice de para-anisidine (mesure des produits secondaires de l'oxydation) semblent être de bons indicateurs pour évaluer l'état d'oxydation et la stabilité oxydative des produits.

En effet, les vitesses relatives d'oxydation des acides gras, aboutissant à des hydroperoxydes, augmentent avec le nombre d'insaturation. En fait, à 100°C, les vitesses d'oxydation relatives des acides stéarique (C18 :0), oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2) et linoléique (C18 :3) sont : 1, 100, 1000, 1500 et 2000-3500, respectivement (CRAPISTE *et al.*, 1999 ; CILLARD, 2006). L'acide linoléique, qui représente en moyenne 67% d'acides gras totaux de l'huile de TS, s'oxyderait donc le premier, puis l'acide oléique.

L'Ip des huiles contenant des extraits phénoliques suit un rythme moins accentué que celui de témoin. Cependant, les valeurs de peroxydes des séries d'acide gallique et la vanilline à différentes concentrations (100 et 200 mg/kg) progressent selon la même allure que celle du témoin et ils apparaissent dans certains cas confondus.

L'acide gallique et la vanilline sont sans effet sur la vitesse de l'apparition des produits primaires de l'oxydation de l'huile de TS. Ce ci pourrait être attribué à la structure chimique et à la polarité de chaque composé.

Les courbes obtenues avec l'acide cafféique et l'oleuropéine se situent entre le témoin et l'huile enrichie en CP. Il est à souligner que les valeurs obtenues avec l'acide cafféique montrent un taux d'oxydation moins notable que l'oleuropéine et ceci dans le cas des deux concentrations testées. Les faibles valeurs de peroxydes pourraient être attribuées à la diminution de la vitesse de formation de ces molécules par les composés antioxydants.

D'après les résultats obtenus avec les deux concentrations, l'activité antioxydante des composés phénoliques testés décroît dans l'ordre suivant : acide cafféique > oleuropéine > acide gallique > vanilline. Ces composés peuvent être classés comme des acides benzoïques (acide gallique), acides hydroxycinnamiques (acide cafféique), sécoiridoïdes (oleuropéine) et la vanilline est un arôme.

Selon MC DONALD et *al.* (2001), cette distinction peut être faite par le nombre de groupement hydroxyle et méthoxyle, acidité relative (acides benzoïques contre les acides hydroxycinnamiques) et la solubilité des phénols dans les systèmes aqueux et lipidiques. Ces caractéristiques structurales semblent être importantes pour la détermination de cette tendance. La principale considération est la nature et la position des hydroxyles sur le cycle aromatique. La présence d'un seul groupe hydroxyle confère une activité limitée.

La structure *o*-diphénol augmente l'aptitude des phénols pour agir comme des antioxydants (cas de l'acide cafféique). Les *o*-diphénols, d'après MEYER et *al.* (1998b), peuvent agir comme des chélateurs puissants des métaux.

En général, l'aptitude de céder l'hydrogène et l'inhibition de l'oxydation sont augmentées avec le nombre de groupements hydroxyles des phénols. Cependant, l'acide gallique ayant trois groupes hydroxyles, ne montre pas une activité exceptionnelle. Ceci peut être dû au caractère hydrophile de l'acide gallique qui est réduit partiellement dans les systèmes lipidiques (JACOBSON et *al.*, 1999).

MC DONALD et *al.* (2001) ont rapporté que l'activité anti-oxydante des cp à une concentration de 100 mg/l dans un système lipidique (acide linoléique) diminue dans l'ordre suivant : acide cafféique > tyrosol \approx naringine \approx acide chlorogénique > acide vanillique > acide 4-hydroxybenzoïque \approx acide *p*-coumarique \approx acide gallique > naringinine > acide 2,4-dihydroxybenzoïque \approx oleuropéine.

L'oleuropéine a montré une activité anti-oxydante mais plus faible que celle de l'acide cafféique.

Les études faites sur la relation structure-activité des acides phénoliques ont montré que les dérivés de l'acide cinnamique ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui des dérivés benzoïques, qui peut être dû à la présence des insaturations qui facilitent la délocalisation. Parmi les acides cinnamiques, l'acide cafféique est plus fort que l'acide férulique, qui a son tour est mieux que les acides *p*-coumariques. Les ortho-dihydroxybenzenes (catechol) sont cruciaux pour augmenter l'activité antioxydante (LU et YEAP FOO, 2001).

L'étude faite par NAZ et *al.* (2004), étudiant l'effet de l'addition des antioxydants (acide cafféique, acide vanillique et acide férulique) et l'extrait de feuilles de thé sur l'huile de blé analysée après 30, 60 et 90 min de chauffage à 180°C, a montré que l'acide cafféique est l'antioxydant le plus efficace et que ce composé a diminué l'Ip et l'indice de *p*-anisidine. L'activité antioxydante selon ces mêmes auteurs, diminue dans l'ordre suivant : acide cafféique > acide vanillique > acide férulique > extrait de feuilles de thé. Cette différence peut être due à leurs structures chimiques de base.

La présence de groupe $-OCH_3$ en position *ortho* ou *para* par rapport aux groupements hydroxyle sur le cycle de l'acide vanillique et l'acide férulique affecte l'activité antioxydante. De plus, l'acide cafféique ayant deux groupes $-OH$ adjacents agit comme chélateur des ions métalliques (prooxydants) et peut catalyser cette réaction en présence de traces des ions (NAZ et *al.*, 2004).

Aussi concernant l'addition des extraits de feuilles, de margines et de pulpe à l'huile a un pouvoir de diminuer les valeurs de peroxydes démontrant leur pouvoir protecteur. Des résultats significatifs ont été obtenus avec la concentration de 200 mg/kg. A la fin de l'opération du chauffage, le témoin passe de l'Ip de 3,4mécq d'O₂/kg d'huile à la valeur de 18mécq d'O₂/kg d'huile (soit 6 fois la valeur initiale). Après 150 min de chauffage à l'étuve, les Ip de TS enrichie de l'extrait de feuilles, de pulpe et de margines sont respectivement de 12,8 ; 13,4 et 10 méq d'O₂/kg d'huile à la concentration de 200 mg/kg.

L'étude faite par HOULOULA et *al.* (2004), sur l'effet de l'origan sur la stabilité oxydative de l'huile de coton durant la friture à 185°C, a montré que la poudre ou l'extrait éthanolique d'origan diminue l'accumulation de diènes conjugués (produits primaires d'oxydation), des composés polaires, triacylglycérols polymérisés, triacylglycérols dimériques et les valeurs de *p*-anisidine de l'huile de friture.

Les résultats obtenus par IQBAL et BHANGER (2007) ont montré que l'extrait d'ail à une concentration de 1000ppm stabilise mieux l'huile de tournesol chauffée à 65°C que le BHA et le BHT. L'effet de l'addition des antioxydants sur l'Ip est représenté par la figure 25.

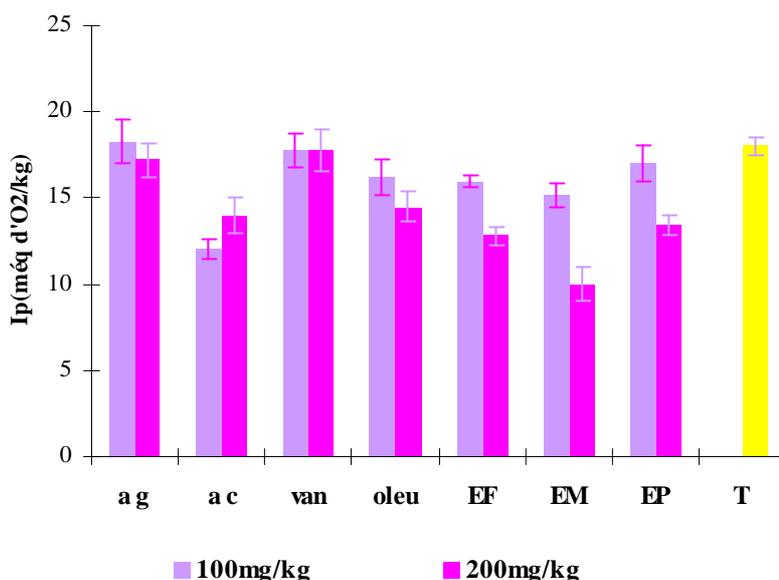


Figure 25 : Effet de l'ajout des antioxydants sur l'Ip de l'huile de TS après 150 min de chauffage à l'étuve à 180°C (a g : acide gallique ; a c : acide cafféique, van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

La figure 15 montre que l'extrait de margines augmente significativement la stabilité oxydative de TS lors du traitement thermique à 180°C par diminution significative de la vitesse de production des hydroperoxydes lors de chauffage. L'extrait de margine renferme des constituants phénoliques simples à pouvoir antioxydant puissant.

On remarque aussi que parmi les phénols testés individuellement, l'acide cafféique a montré son efficacité dans la diminution de la vitesse d'apparition des peroxydes.

Les valeurs de l'Ip de l'huile de TS enrichie décroît dans l'ordre suivant : extrait de margine > extrait de feuilles > extrait de pulpe > acide cafféique > oleuropéine > acide gallique > la vanilline. On peut conclure que l'acide gallique et la vanilline n'améliorent pas la stabilité oxydative de cette huile lors du chauffage.

2.4.2. Evolution des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARs) :

Les résultats de test au TBA réalisé sont consignés dans les figures 26 et 27 aux deux concentrations testées.

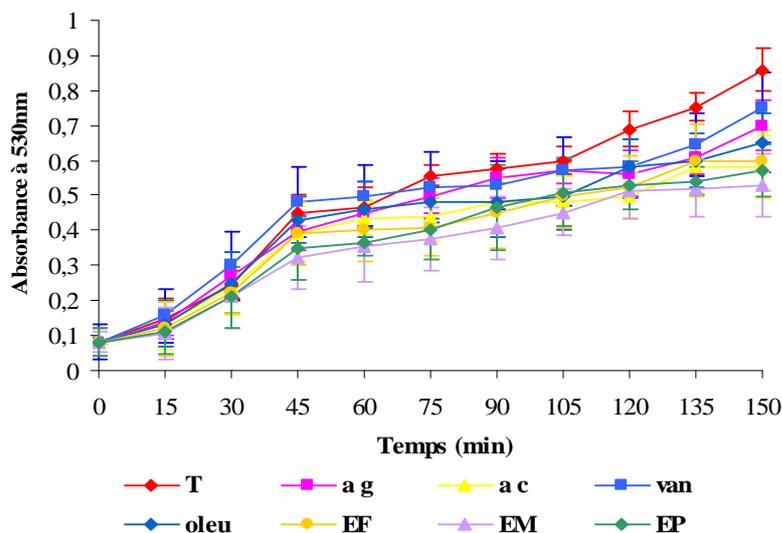


Figure 26 : Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants en fonction du temps de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

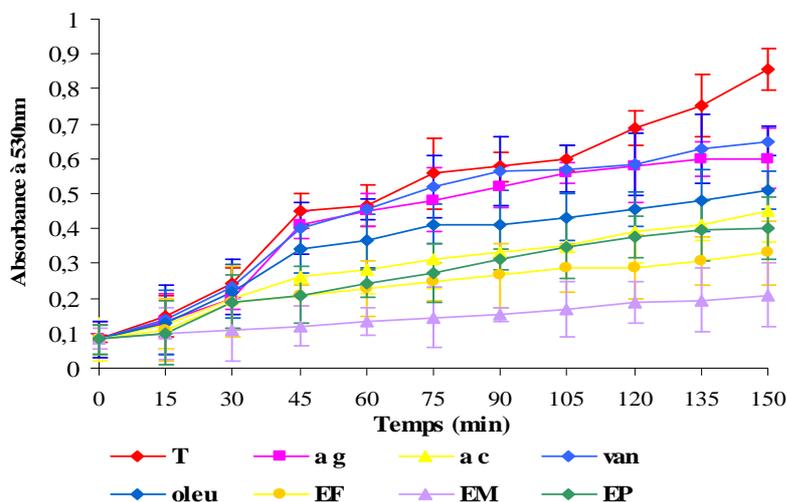


Figure 27 : Evolution de l'absorbance des TBARs de TS enrichie avec 200 mg/kg d'antioxydants en fonction du temps de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

Le test TBA est un test facile à réaliser et rapide pour l'évaluation de la peroxydation lipidique. Ce test se base sur le développement de pigment rose résultant de la réaction de TBA avec les produits secondaires résultant de la dégradation des acides gras, en particulier avec le MDA.

En 1951, PATTON et *al.* ont rapportés que le MDA est le principal réactant avec le TBA. Ceci a été confirmé par les travaux de MOON et SHIBAMOTO (2009). Plusieurs auteurs suggèrent que le composé coloré formé est le résultat de la condensation entre deux molécules de TBA avec une molécule de MDA sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu. Ce complexe présente le maximum d'absorption à 530 nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des produits secondaires de l'oxydation. FRANKEL (1991) ont rapporté que les alcools, les aldéhydes saturés, les aldéhydes insaturés α et β et les composés époxy sont les produits secondaires majeurs d'oxydation qui sont plus stables et sont générés par la décomposition des peroxydes. Le TBA peut donner une réaction positive avec ces produits.

La formation de complexe TBA-MDA est initiée par une attaque nucléophile impliquant le carbone 5 de TBA sur le carbone 1 de MDA suivie d'une déshydratation.

Par conséquent, ce test est devenu l'un des tests le plus utilisé pour étudier l'oxydation des lipides et tester les activités antioxydantes de divers produits naturels.

Les résultats obtenus montrent une augmentation progressive de la densité avec les deux concentrations lors du chauffage. Les valeurs les plus élevées sont obtenues avec l'huile de TS témoin (sans ajout d'antioxydants), l'absorbance passe de 0,080 (avant chauffage) à 0,858 nm après 150 min de chauffage à 180°C. L'absorbance initiale peut s'expliquer par la présence d'une certaine quantité de produits secondaires de l'oxydation issus de la décomposition des hydroperoxydes. L'absorbance finale des produits secondaires est multiplié par un facteur de 7.

L'addition des antioxydants pris individuellement (acide gallique, acide cafféique, oleuropéine) et des extraits phénoliques à l'huile de TS a un effet sur une production moindre des produits secondaires de l'oxydation, montrée par les densités optiques plus faibles de TBARS. Cependant, l'ajout de la vanilline n'a pas d'effet sur l'oxydation de l'huile de TS.

Les antioxydants agissent avec les hydroperoxydes limitant ainsi leurs décompositions, par conséquent, empêchent la formation des produits secondaires de l'oxydation qui donnent une réaction positive avec le TBA.

Cependant, les résultats obtenus avec les extraits phénoliques sont plus intéressants que ceux obtenus avec les antioxydants individuels.

La figure 28 permet de comparer l'effet de l'addition de 100 et 200 mg d'antioxydants par kilogramme d'huile sur la densité optique des produits secondaires de l'oxydation de l'huile sous l'effet d'un traitement thermique (180°C) simulant la température de friture.

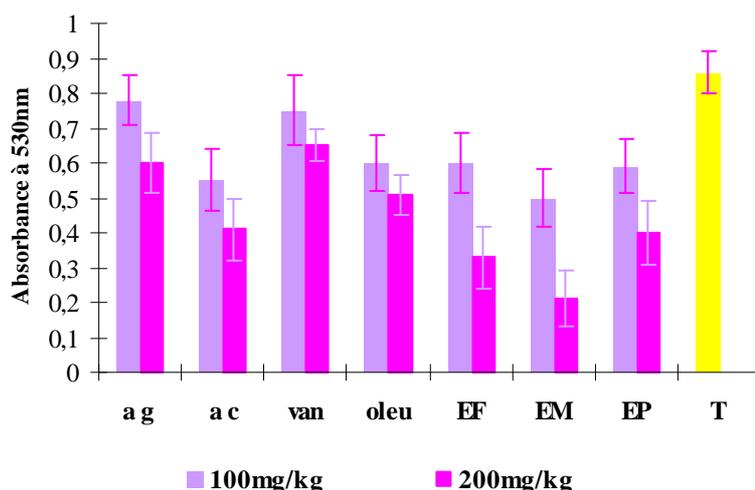


Figure 28 : Evolution de l'absorbance à 530 nm après 150min de chauffage à 180°C de l'huile de TS enrichie avec 100 et 200 mg/kg d'antioxydants (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe respectivement).

Les résultats de l'absorbance des TBARs obtenus avec l'extrait de margines confirment les valeurs de peroxydes abaissées par le même extrait. Les antioxydants agissent avec les peroxydes et donc empêchent leur décomposition en produits secondaires ce qui explique la diminution de l'absorbance des TBARs après enrichissement de l'huile de TS.

L'absorbance des TBARs de l'huile enrichie avec les extraits phénoliques diminue dans l'ordre suivant : extrait de margine > extrait de feuilles \approx extrait de pulpe. Pour les phénols individuels testés est le suivant : acide caféique > oleuropéine > acide gallique > vanilline. L'effet antioxydant d'un composé donné dépend largement de sa structure chimique et le milieu dans le quel se retrouve. Par contre, cet effet avec les extraits dépend de la composition en constituants phénoliques de chaque extrait, le degré de pureté, la présence d'autres composés synergiques ou inhibiteurs.

2.4.3. Evolution de l'acidité :

L'indice d'acidité est un paramètre qui renseigne sur l'évolution de l'hydrolyse au cours de chauffage. Les résultats obtenus sont représentés par les figures 29 et 30.

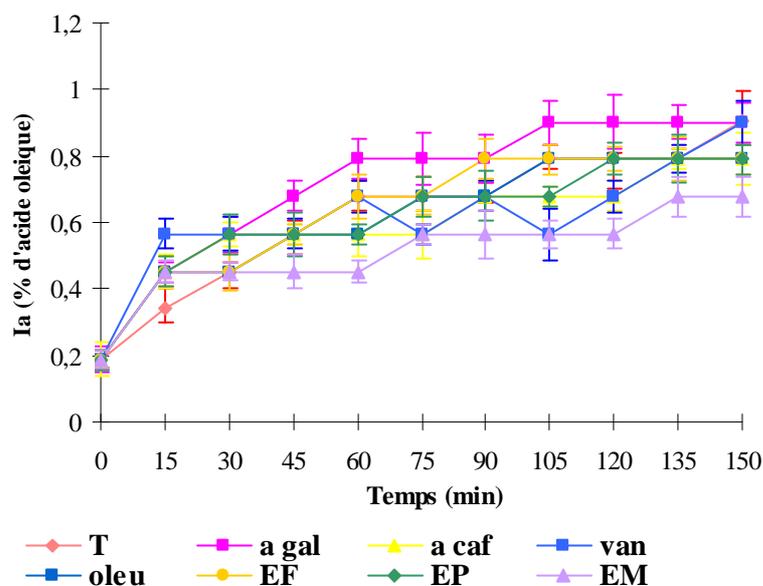


Figure 29 : Evolution de l'indice d'acidité lors de chauffage à 180°C de l'huile de TS additionnée de 100 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

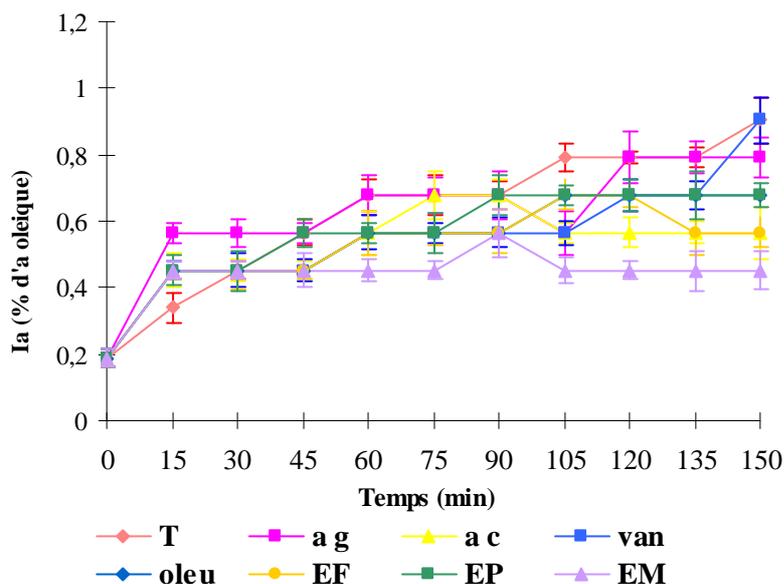


Figure 30 : Evolution de l'indice d'acidité lors de chauffage à 180°C de l'huile de TS additionnée de 200 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

L'acidité augmente graduellement dans tous les échantillons durant le chauffage. Les valeurs d'acidité oscillent entre 0,188% et 0,905% dans le cas de l'huile témoin. L'évolution de l'acidité pourrait être liée à l'oxydation des AG dès qu'ils sont libres.

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par OUARZKI (2007), qui a montré que l'acidité de l'huile de TS augmente légèrement après 3 cycles de chauffage de 30min à 180°C.

YOSHIDA *et al.*, (1992) ont rapporté que l'acidité des huiles végétales croît lors de chauffage des huiles végétales (tournesol, huile de colza, huile de soja, huile de blé).

L'addition de l'acide gallique et de la vanilline à 100mg/kg et 200mg/kg n'affecte pas l'apparition des produits d'hydrolyse, les valeurs finales de l'acidité sont respectivement de 0,864% et 0,904%. Néanmoins, l'ajout de l'acide caféique et de l'oleuropéine a diminué la vitesse de formation des acides gras libres, l'acidité finale est de 0,565% et 0,678% respectivement.

Les valeurs d'acidité des huiles enrichies avec les extraits de feuille, de margines et de pulpe ont subi la plus faible augmentation parmi les huiles enrichies avec les acides phénoliques, en particulier avec l'extrait de margines. Cet effet pourrait être en relation avec un taux probablement considérable d'acides phénoliques simples apportés par les extraits phénoliques.

BEŠTER *et al.* (2007) ont enregistré une élévation de l'acidité en même temps qu'une baisse en AGPI durant 124 heures de chauffage à 100°C. Selon ces mêmes auteurs, l'augmentation de l'acidité est induite par l'hydrolyse des triacylglycérols et par la formation de produits secondaires d'oxydation, à savoir les acides carboxyliques volatils (acide formique, acide acétique).

La figure 21 donne l'évolution de l'acidité après 150 min de chauffage à 180°C de l'huile de TS enrichie avec les extraits naturels et les acides phénoliques.

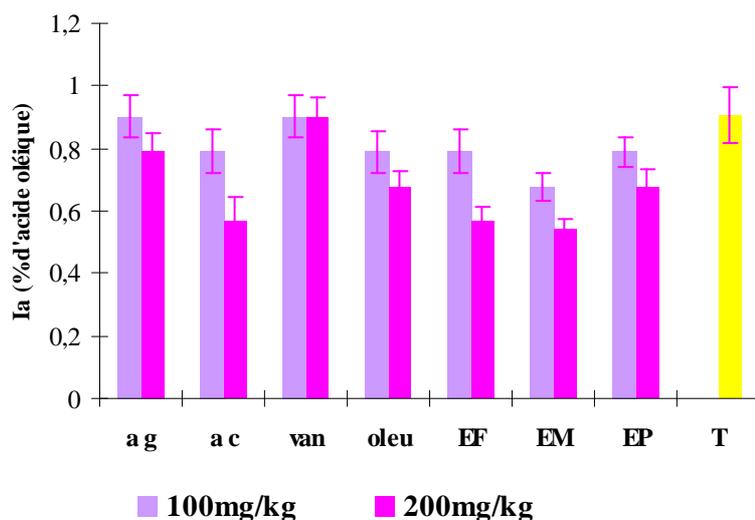


Figure 31 : Effet de l'addition de 100 et 200 mg/kg d'antioxydants sur l'Ia après 150mn de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

La figure 31 montre que l'addition des extraits phénoliques de margines et de l'acide caféique a contribué à une diminution remarquable de l'acidité. Selon les résultats obtenus, l'acidité de l'huile enrichie diminue dans l'ordre suivant : EM ≈ EF > acide caféique > EP ≈ oleuropéine > acide gallique > vanilline.

MARC *et al.* (2004) ont montré que l'acidité oléique doit être utilisée comme une spécification de composition et non de qualité : il n'y a aucune corrélation entre la quantité d'acides gras libres et leur état d'oxydation. Cependant, NAVAS *et al.* (2007) ont considéré ce paramètre comme un test très important pour évaluer la stabilité des huiles végétales.

2.4.4. Evolution des polyphénols totaux:

Deux concentrations de PPT : 100 et 200 mg/kg sont utilisées pour la fortification des huiles. Le dosage des PPT, par référence à la courbe étalon de la figure 32, révèle un enrichissement notable comme il est indiqué dans le tableau IX.

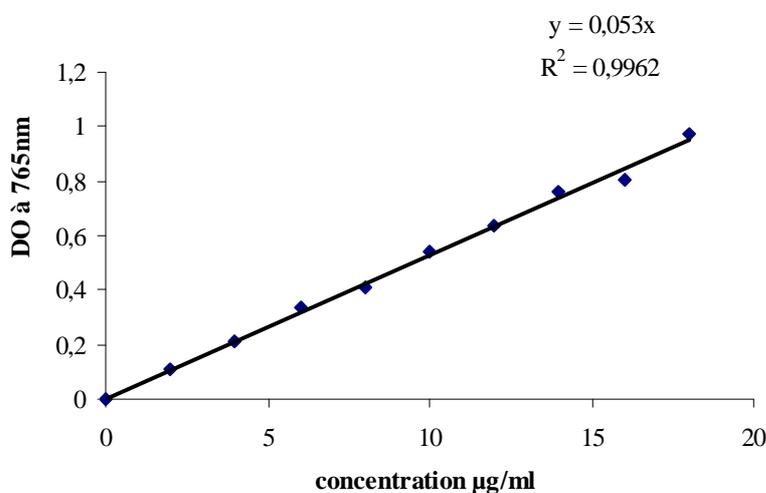


Figure 32 : Courbe étalon de dosage des polyphénols des huiles.

Le tableau IX montre la concentration totale de PPT (exprimée en équivalent en acide gallique/kg d'huile) avant et après enrichissement de l'huile de TS.

Tableau IX : Evolution des PPT après chauffage de TS à 180°C pendant 150 min.

Quantité des extraits ajoutée (mg/kg)	Quantité des PPT avant et après chauffage (mg/kg)					
	Avant			Après		
0	nd			Nd		
100	EF	EM	EP	EF	EM	EP
	95±0,5	97±0,4	94±0,2	63±0,3	66±0,3	62±0,5
200	190±0,3	196±0,4	190±0,1	132±0,5	148±0,2	132±0,2

nd : non déterminée, **EF**, **EM**, **EP** : extrait de feuilles, margines et de pulpe, respectivement.

L'huile de tournesol est dépourvue de composés phénoliques, ce qui est en accord avec les données bibliographiques (KAYA *et al.*, 1993 ; NORMAND *et al.*, 2006 ; SALTA *et al.*, 2009). Les quantités de PPT déterminées après enrichissement ne reflètent pas l'addition systématique des teneurs en PPT ajoutés aux concentrations des PPT originellement présents dans l'huile.

L'effet additif n'est pas tranchant, on suppose que dans la totalité des polyphénols dosés après addition, certains seraient impliqués dans des liaisons non susceptibles d'être détectées par ce type de dosage. Cet effet est observé par CHIOU *et al.*, (2007) et aussi par OUARZKI (2007). CHIOU *et al.* (2007) attribuent ces variations aux différences dans la composition chimique et/ou les paramètres physiques tels que la viscosité, le point de fusion, qui peut interférer la puissance d'extraction des PPT.

La quantité des PPT déterminée, après l'addition des extraits phénoliques, après 150 min de chauffage à 180°C a diminué quelque soit l'échantillon utilisé. Plusieurs études ont rapportés la diminution des polyphénols lors des traitements thermiques. Lorsque les polyphénols sont portés aux température simulant la friture, la disparition des CP dépend de chacun des composés individuels (BRENES *et al.*, 2002).

Des résultats similaires ont été obtenus par OUARZKI (2007). Cette diminution peut être attribuée à la destruction thermique des PPT ou à leurs utilisations dans la protection de l'huile de TS lors de chauffage.

2.4.5. Evolution de la capacité antioxydante :

La capacité antioxydante des huiles est estimée par la méthode utilisant le radical DPPH. La capacité antioxydante, avant et après addition des extraits, est indiquée dans le tableau X.

Tableau X : Evolution de la capacité antioxydante avant et après enrichissement.

Quantité des extraits ajoutée (mg/kg)	% d'inhibition de radical DPPH									
	avant					Après				
0	63,56 ± 0,9					33,6±04				
100	a.c	oleu	EF	EM	EP	A c	oleu	EF	EM	EP
	78±0,4	72±0,2	75±0,1	83±0,5	75±0,2	50±0,3	52±0,2	56±0,3	60±0,2	53±0,1
200	84±0,2	80±0,5	85±0,5	90±0,3	87±0,1	59±0,1	58±0,3	62±0,5	65±0,3	60±0,3

a.c : acide cafféique, **oleu** : oleuropéine, **EF** : extrait de feuilles, **EM** : extrait de margines, **EP** : extrait de pulpe.

Plusieurs études ont été développées pour élucider la stabilité oxydative des huiles. En général, une quantité élevée des acides gras polyinsaturés et une faible concentration en antioxydants favorisent l'oxydation des huiles.

La capacité de neutraliser le radical DPPH par les antioxydants de l'huile est attribuée à la quantité de tocophérols (GORDON *et al.*, 1995), à la quantité de polyphénols (BOSKOU *et al.*, 2006) et le contenu en chlorophylles (LANFER-MARQUEZ *et al.*, 2005).

Donc, la capacité antioxydante de l'huile de TS, avant enrichissement (63,56%), est fortement corrélée à sa richesse en vitamine E, du fait de l'absence des CP et les chlorophylles. Après l'addition des extraits naturels, le pourcentage d'inhibition de radical DPPH est augmenté (88,34% ; 92,5 %; 85,09% pour EF, EM et EP avec la concentration de 100 mg/kg, respectivement). La double concentration a augmenté d'avantage les pourcentages de neutralisation de radical DPPH.

L'augmentation de la capacité antioxydante est majoritairement attribuée aux polyphénols des extraits rajoutés. Cet effet est observé aussi par SALTA *et al.* (2009) lors de l'enrichissement de l'huile de tournesol avec l'extrait phénolique de feuilles d'olive avec une concentration de 195mg/kg d'huile.

La capacité antioxydante la plus significative est obtenue avec l'extrait de margines avec la concentration de 200 mg/kg d'huile. Cependant, l'extrait de feuilles et de pulpe montrent des activités similaires à la même concentration. Cette différence pourrait être en relation avec la composition phénolique des extraits. De plus, la capacité antioxydante de l'oleuropéine est

légèrement faible par rapport à celle des extraits de feuilles et de pulpe. L'oleuropéine est le constituant majeur des feuilles et des olives, les résultats de CHIOU *et al.* (2007) ont montré que la concentration de ce composé dans l'extrait de feuilles d'olive peut atteindre 1,253 g/kg de feuilles. La différence de l'activité antioxydante de l'oleuropéine et les extraits de feuilles et de pulpe peut être liée à la présence d'autres composés antioxydants dans les extraits.

Plusieurs chercheurs ont rapporté la présence de l'HT, de l'acide cafféique, de la quercétine, de l'acide férulique, et d'autres composés dans les margines (BOUAZIZ *et al.*, 2005 ; DE LEONARDIS *et al.*, 2008).

La neutralisation de radical DPPH diminue après 150 min de chauffage à 180°C. Ce résultat est en accord avec la plupart des études données par la bibliographie. Plusieurs études portant sur la perte des antioxydants ont été reportés, concernant les tocophérols (GORDON et KOURIMSKA, 1995 ; BARRERA-ARELLANO *et al.*, 1999) ou les polyphénols durant la friture (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2002 ; GÓMEZ-ANLONSO *et al.*, 2003) ou durant le traitement thermique simulant la température de friture (BRENES *et al.*, 2002).

D'après, QUILES *et al.* (2002) la capacité antioxydante dépend de l'interaction entre les antioxydants et les acides gras.

SEEL *et al.* (2005) ont démontré qu'à la température de 180°C, α et γ tocophérols sont moins stables que β et δ tocophérols. Ce résultat a été observé par BARRERA-ARELLANO *et al.* (1999). La dégradation des tocophérols est influencée par le degré d'insaturation de l'huile (plus ce degré est élevé, la dégradation est accélérée) ce qui contribue à la diminution de la capacité antioxydante et par conséquence la diminution de la stabilité oxydative de l'huile lors du chauffage (SEEL *et al.*, 2005).

2.5. Analyse des différents paramètres de l'huile d'olive enrichie lors du chauffage :

2.5.1. Evolution de l'indice de peroxyde :

Les figures 33 et 34 rapportent l'évolution de l'indice de peroxyde au cours de traitement thermique à 180°C.

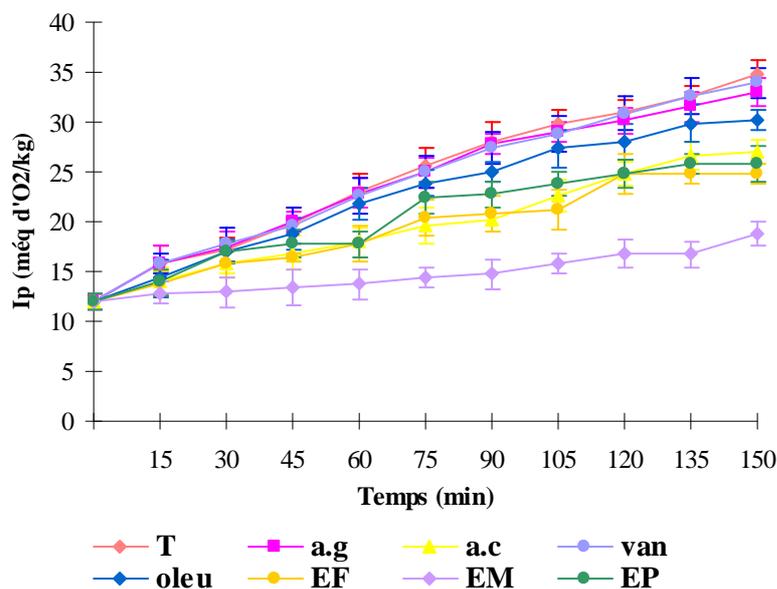


Figure 33 : Évolution de l'Ip de HO enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants lors du chauffage à 180°C (T: témoin, a g : acide gallique, a c : acide caféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe).

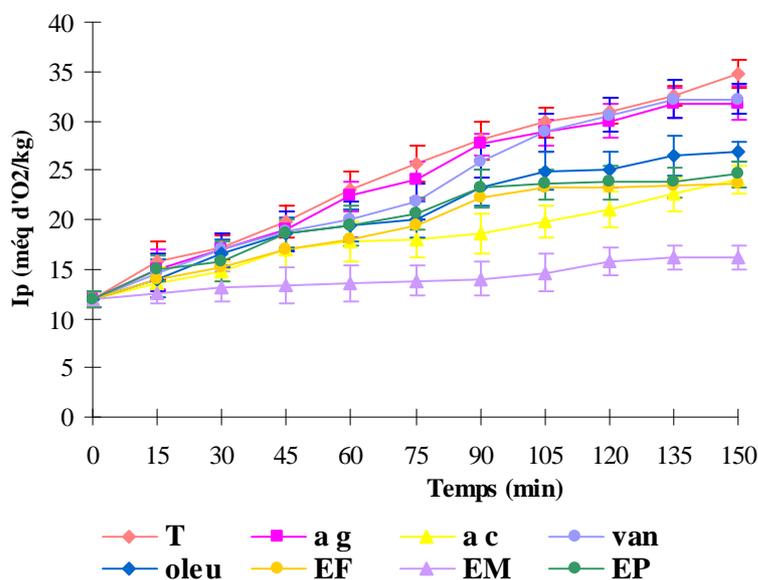


Figure 34 : Évolution de l'Ip de HO enrichie avec 200 mg/kg d'antioxydants lors du chauffage à 180°C (T: témoin, a g : acide gallique, a c : acide caféique, van : vanilline, oleu : oleuropéine, EF : extrait de feuilles, EM : extraits de margines, EP : extrait de pulpe).

La quantité maximale de peroxyde est observée avec l'huile témoin sans additifs, la valeur initiale est de 12mécq d'O₂/kg d'huile. La valeur trouvée se trouve dans la gamme rapportée par YANISHLIEVA *et al.* (2002) qui s'oscille entre 6,0-14,8mécq d'O₂/kg. La valeur élevée de l'Ip de l'huile d'olive comparée à celle de l'huile de TS peut être due à l'absence de raffinage de l'huile d'olive.

LEE *et al.* (2007) ont rapporté que 67% de peroxydes sont éliminées lors de raffinage de l'huile de soja. Des résultats similaires ont été reportés par QUILES *et al.* (2002).

L'huile utilisée n'est pas raffinée et ceci explique la quantité initiale élevée de peroxydes.

L'indice de peroxyde caractérise le degré d'oxydation lipidique, les valeurs les plus élevées, lors de traitement thermique, sont observées avec l'huile sans additif (témoin).

Les courbes obtenues en présence des antioxydants dans l'huile suivent la même allure mais avec un rythme moins accentué que celle du témoin. L'Ip passe de 12 méq d'O₂/kg à 34,8mécq d'O₂/kg après 150 min de chauffage à 180°C. La valeur finale est multipliée par un facteur de deux.

L'huile enrichie avec les phénols individuels montre, donc, des faibles valeurs. Ainsi, la présence des extraits phénoliques de feuilles, de margines et de pulpe aux deux concentrations retardent la formation des peroxydes lors de chauffage.

La figure 35 présente l'effet des antioxydants testés après 150min de chauffage à l'étuve à 180°C.

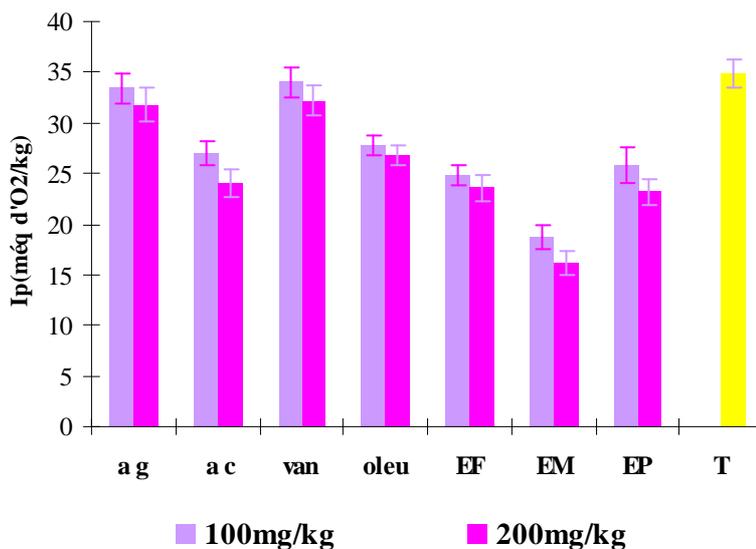


Figure 35 : Effet de l'addition de 100 et 200mg d'antioxydants et d'extraits phénoliques /kg d'huile d'olives sur l'Ip après 150min de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

L'acide gallique et la vanilline sont sans effet sur ce paramètre par contre l'acide cafféique a diminué la vitesse d'apparition des peroxydes. L'activité antioxydante des acides phénoliques, selon SATUE HUNG et FRANKEL (1995), diffère selon la formation ou la décomposition des hydroperoxydes.

L'effet de l'oleuropéine se rapproche de celui des extraits de feuilles et de pulpe. Cette différence d'action peut être attribuée à la différence structurale et les propriétés de chaque composé.

Cependant, la formation des peroxydes, lors de chauffage à une température simulant la friture, est influencée considérablement par l'addition de l'extrait de margines à une concentration de 200mg/kg d'huile. L'ajout de cet extrait a diminué les valeurs de l'indice peroxydes, à la fin de chauffage la valeur trouvée est 18 méq d'O₂/kg comparativement à celle trouvée avec l'huile sans addition (34,8 méq d'O₂/kg). CHENG et *al.* (2003) ont rapporté que l'activité antioxydante d'un matériel végétal est corrélée à sa quantité en composés phénoliques.

GÓMEZ-ALONSO et *al.*(2007) ont montré que les valeurs de l'indice de peroxyde augmentent graduellement durant le stockage de l'huile d'olive à la température ambiante.

2.5.2. Evolution des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARs) :

Le test de TBA est utilisé pour évaluer les produits secondaires de l'oxydation lipidique. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 36 et 37.

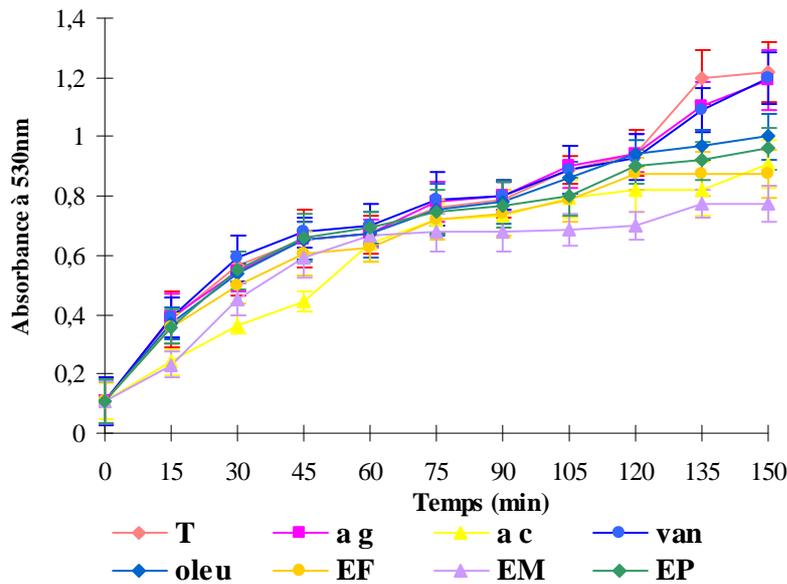


Figure 36 : Evolution de l'absorbance des TBARs de HO enrichie avec 100 mg/kg d'antioxydants lors de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

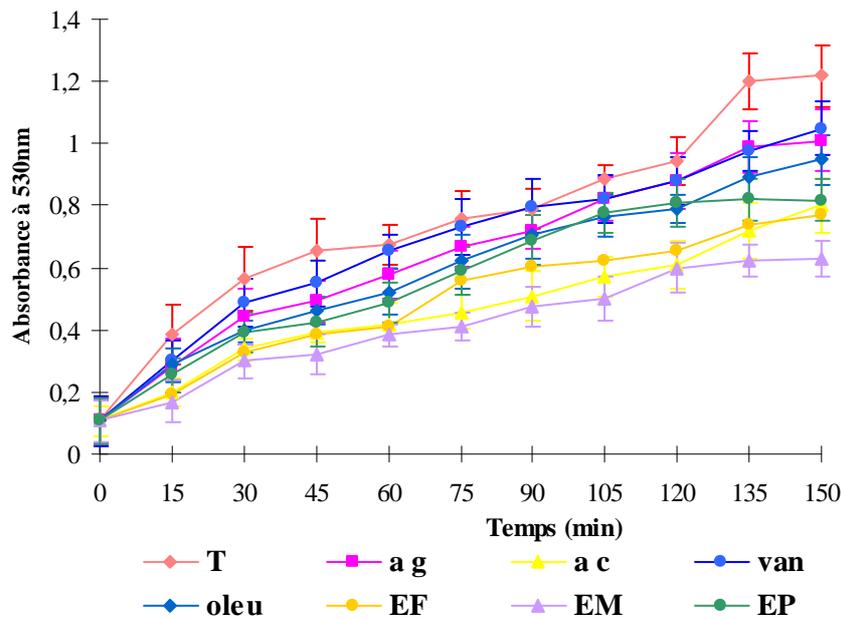


Figure 37 : Evolution de l'absorbance des TBARs de HO enrichie avec 200mg/kg d'antioxydants lors de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g : acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF : extrait de feuilles ; EM : extrait de margines ; EP : extrait de pulpe).

L'absorbance à 530 nm est une mesure des produits secondaires issus de l'oxydation des corps gras. Les figures 36 et 37 montrent une augmentation graduelle de l'absorbance avec tous les échantillons. Les valeurs les plus élevées sont observées avec l'huile témoin (sans additifs), qui passe de la valeur initiale de 0,106 à 1,217 après chauffage. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec l'huile de tournesol. Cette différence peut être attribuée aux caractéristiques de la composition de chaque huile.

Les résultats sur les caractéristiques de HO après traitement thermique, obtenus par BEŠTER *et al.* (2007) montrent que la composition en acide gras après chauffage à 100°C pendant 100 heures change avec réduction en premier lieu de l'acide linoléique suivie de l'acide linoléique, ce qui favorise la formation des produits secondaires.

Cependant, l'addition de l'acide caféique, de l'oleuropéine ainsi que les extraits phénoliques a diminué les valeurs de l'absorption des substances secondaires de l'oxydation. Cette diminution peut être attribuée à la diminution de la vitesse d'apparition des produits primaires et par conséquent diminution des produits secondaires et donc une plus faible absorbance.

L'effet de l'ajout des acides phénoliques et des extraits phénoliques sur l'absorbance des substances secondaires de l'oxydation après 150 min de chauffage à 180°C est illustré par la figure 38.

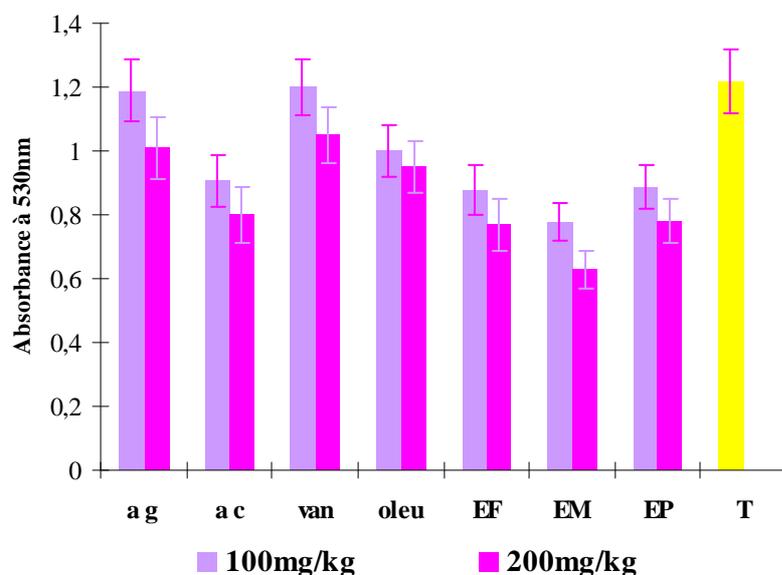


Figure 38: Evolution de l'absorbance à 530nm après 150min de chauffage à 180°C de l'huile de HO enrichie avec 100 et 200mg d'acides phénoliques et d'extraits phénoliques naturels/kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

La figure 38 montre clairement que l'addition des extraits phénoliques influence positivement au vu des densités optiques des échantillons analysés après le chauffage des deux huiles. L'extrait de margines à 200 mg/kg par rapport aux autres phénoliques a diminué significativement les absorbances à 530nm. Cette faible valeur des D.O peut être attribuée à la diminution de la vitesse d'apparition des produits primaires de l'oxydation et par conséquent la formation des produits secondaires est retardée. La différence d'action de ces extraits peut être due à la variabilité de leur composition phénolique.

L'acide gallique et la vanilline à 100mg/kg sont sans effet sur la vitesse d'apparition des produits secondaires de l'oxydation. Cependant, l'acide cafféique est plus efficace que l'oleuropéine. A une concentration de 200mg/kg, l'effet des phénols individuels diminue dans l'ordre suivant : acide cafféique > oleuropéine > acide gallique ≈ vanilline. Cette différence peut être expliquée par la différence structurale de ces composés.

2.5.3. Evolution de l'acidité :

L'évolution de l'indice de peroxyde en fonction du temps de traitement thermique est donnée dans les figures 39 et 40.

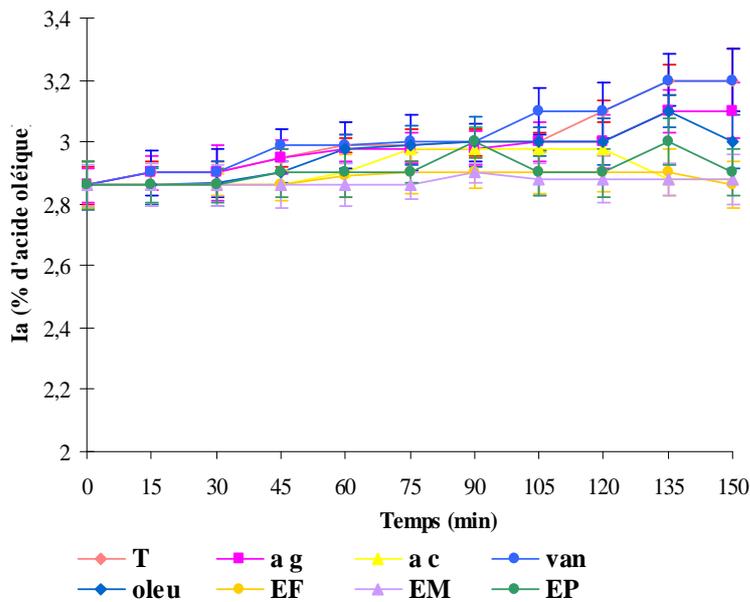


Figure 39: Evolution de l'indice d'acidité lors de chauffage à 180°C de l'huile de HO additionnée de 100 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

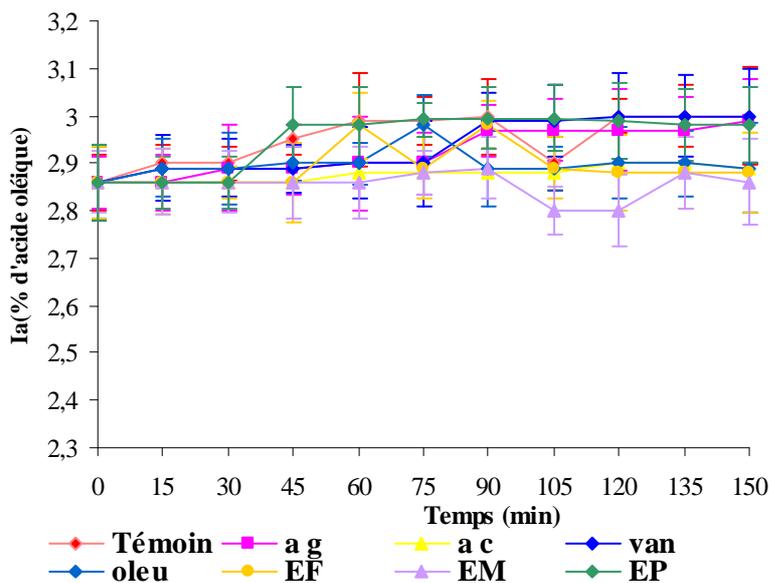


Figure 40 : Evolution de l'indice d'acide lors de chauffage à 180°C de l'huile de HO additionnée de 200 mg d'antioxydants /kg d'huile (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide caféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

L'acidité, le pourcentage d'acide gras libres totaux, est utilisée pour étudier les modifications hydrolytiques de l'huile ayant subi un chauffage aux températures de la friture.

Les modifications hydrolytiques dépendent de la valeur initiale de ce paramètre et le temps de chauffage. Ces variations dépendent aussi de la volatilité des acides gras libres qui peuvent se former et s'évaporer en même temps dans l'huile.

L'huile d'olive contient 2,86% d'acides gras libres qui sont probablement formé par l'activité hydrolytique des enzymes lipolytiques durant la préparation des olives.

Les figures 29 et 30 révèlent une légère augmentation de l'acidité lors du chauffage. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par OUARZKI (2007).

La figure 41 résume l'effet de l'addition de 100 et 200 mg d'antioxydants et d'extraits phénoliques sur l'acidité de l'huile d'olive après 150 min de chauffage à 180°C.

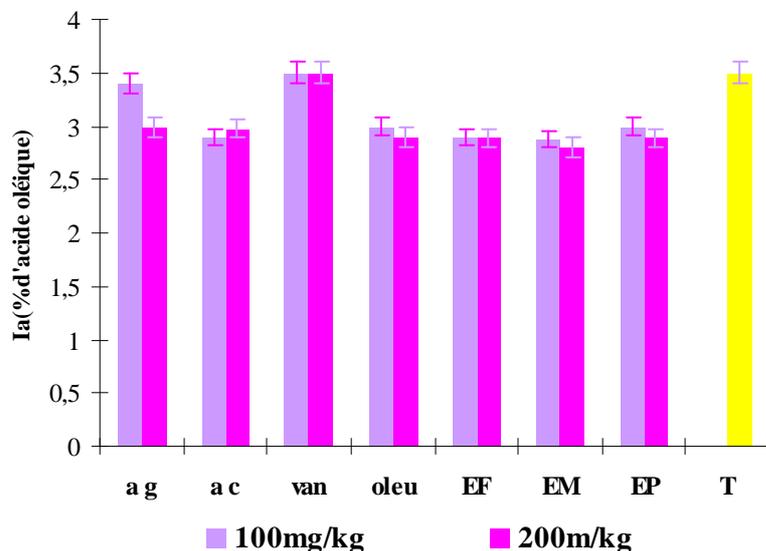


Figure 41 : Effet de l'addition de 100 et 200 mg/kg d'antioxydants sur l'Ia après 150 min de chauffage à 180°C (T : témoin ; a g acide gallique ; a c : acide cafféique ; van : vanilline ; oleu : oleuropéine ; EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement).

Au vu de la figure 41, les ajouts de l'acide gallique et de la vanilline sont sans effet sur la vitesse d'apparition des acides gras libres. Néanmoins, l'addition de l'acide cafféique, de l'oleuropéine et des extraits phénoliques abaissent l'acidité de l'HO lors de chauffage.

ALLOUCHE et *al.* (2004) ont remarqué qu'à une température de 180°C, les profils chromatographiques des AG de deux variétés de l'huile d'olive présentent une diminution de l'acide palmitoléique après 4 heures de chauffage. L'acide oléique ne montre pas de changement durant 36 heures ; quant aux acides linoléiques et linoléique, leurs teneurs sont réduites après 6 heures puis restent stables.

De plus, HENNA et TAN. (2009) ont montré que après 75 minutes de friture (6cycles de 5min chacun) la composition en acide gras de l'huile d'olive change, diminution de pourcentage des acide gras insaturés (acide linoléique).

2.5.4. Evolution des polyphénols totaux:

La quantité de PPT des échantillons est indiquée dans le tableau XI.

Tableau XI : Concentration en PPT avant et après chauffage de HO à 180°C.

Quantité des extraits ajoutée (mg/kg)	Quantité des PPT avant et après chauffage (mg/kg)					
	avant			Après		
0	615 ± 0,3			314 ± 0,6		
100	EF	EM	EP	EF	EM	EP
	680±0,2	700±0,5	670±0,3	540±0,4	600±0,5	567±0,7
200	781±0,3	795±0,2	775±0,2	601±0,3	690±0,6	589±0,4

EF, EM, EP : extrait de feuilles, de margines et de pulpe, respectivement.

Selon les données bibliographiques, l'huile d'olive est la seule huile végétale qui est pourvue de composés phénoliques. Les huiles non raffinées contiennent la plus grande concentration, selon QUILES *et al.*, (2002), elle est de l'ordre de 1501mg/kg. MONTEDERO *et al.* (1992) ont rapporté une concentration de 1000 mg/kg, en général, les valeurs apportées par la bibliographie sont plus faibles (GUTFINGER, 1981 ; CINQUANTA *et al.*, 1997 ; LEE *et al.*, 2007).

Dans ce travail, l'huile d'olive utilisée est non raffinée, la concentration en PPT est de 615 ± 0,3 mg/kg. Elle se situe dans la gamme des valeurs données par la bibliographie sur les huiles non raffinées. Le raffinage de l'HO élimine certaine quantité des CP (AKASBI *et al.*, 1993).

Après chauffage, la concentration en PPT diminue, elle passe de 615 mg/kg à 314mg/kg. On constate qu'il y a une disparition graduelle des PPT. Ce résultat est en accord avec le résultat trouvé par BEŠTER *et al.* (2007). Le traitement thermique réduit la quantité de PPT, ceci est probablement dû à la destruction thermique de ces molécules ou bien de leurs utilisations dans la protection de l'huile. Ces composés, selon CORTESI *et al.* (1995), disparaissent lors de stockage long de l'huile d'olive, conséquence des réactions d'hydrolyse. CINQUANTA *et al.* (1997) ont rapporté que l'hydroxytyrosol, moins stable que le tyrosol, est détruit après 18 mois de stockage. BRENES *et al.* (2002) ont montré la disparition totale des composés phénoliques lors de traitement thermique simulant la friture, ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

D'après RASTRELLI *et al.* (2002), les composés phénoliques semblent être plus efficaces que le α -tocophérol dans la protection de HO contre l'oxydation. Les mêmes résultats ont été observés par BEŠTER *et al.* (2007). BALDIOLI *et al.* (1996) ont montré que la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge est corrélée majoritairement avec la quantité des polyphénols et en particulier avec les secoïridoïdes principalement l'hydroxytyrosol.

NISSIOTIS et TASIOULA-MARGARI (2002) ont montré qu'à des valeurs élevées de peroxydes, la quantité de HT et α -tocophérol sont minimisées et la concentration de tyrosol reste inchangée après chauffage de HO à 100°C. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par CHEIKHOUSMAN *et al.* (2005) et BEŠTER *et al.* (2007).

2.5.5. Evolution de la capacité antioxydante :

Le tableau XI indique la capacité antioxydante de l'HO avant et après chauffage.

Tableau XII : La capacité antioxydante de HO avant et après 150min de chauffage.

Quantité des extraits ajoutée (mg/kg)	% d'inhibition de radical DPPH·									
	Avant chauffage					Après chauffage				
0	65,75 ± 0,7					34,9 ± 0,6				
100	A c	oleu	EF	EM	EP	A c	oleu	EF	EM	EP
	84±0,3	75±0,2	78±0,9	87±0,5	78±0,4	54±0,1	54±0,5	57±0,2	63±0,8	59±0,2
200	89±0,2	85±0,3	92±0,2	96±0,4	91±0,3	59±0,5	58,7±0,5	66,3±0,3	78,5±0,2	64±0,5

Ac : acide cafféique ; **oleu** : oleuropéine ; **EF** : extrait de feuilles ; **EM** : extrait de margines ; **EP** : extrait de pulpe.

La capacité antioxydante initiale de l'HO est plus élevée que celle de l'huile de TS, ceci peut s'expliquer par la présence de composés phénoliques et des chlorophylles. ESPIN et *al.* (2000) ont supposé que la capacité antiradicalaire de l'huile d'olive est assurée aussi par les tocophérols qui montrent une synergie d'action avec les phénols. GÓMEZ-ALONSO et *al.* (2007) ont rapporté que les chlorophylles agissent comme pro oxydants en présence de la lumière et comme antioxydant à l'obscurité.

L'étude faite par NISSIOTI et TASIOLA-MARGARI (2002) a montré qu'à des Ip comprises entre 20 et 30 mg/kg, l'HT est le premier antioxydant perdu lors de traitement thermique de l'HO. Le tyrosol semble être, selon ces mêmes auteurs, le composé le plus stable et l' α -tocophérol semble être oxydé après une diminution significative de la concentration en HT. De plus, PAPODOPOULOS et BOSKOU (1991) ont montré que HT contribue à une stabilité remarquable de l'HO chauffée à 60°C et le tyrosol n'a pratiquement pas d'effet antioxydant. CHIMI et *al.* (1991) ont rapporté que les composés phénoliques de l'HO ont un effet antioxydant qui diminue dans l'ordre suivant : HT > oleuropéine > tyrosol.

BALDIOLI et *al.* (1996) ont montré que la stabilité oxydative de HO est corrélée majoritairement avec la concentration des phénols hydrophiles et en particulier avec les formes oléosidiques de l'hydroxytyrosol. Selon ces mêmes auteurs, l' α -tocophérol, le plus important des tocophérols de l'huile, peut avoir un effet synergique avec certains composés phénoliques particulièrement avec l'HT. LEE et *al.* (2007) ont montré cette synergie. Cependant, RASTELLI et *al.* (2002) ont suggéré que les composés phénols sont plus efficaces que l' α -tocophérol dans la protection de l'huile d'olive contre l'oxydation. MÉNDEZ et FALQUÉ (2007) ont rapporté que la diminution de la capacité antioxydante est liée à la disparition des CP lors de stockage ou lors de traitement thermique.

Les résultats d'analyses de quelques paramètres chimiques d'évaluation de l'état d'oxydation de ces deux huiles enrichies par des acides phénoliques (acide cafféique, acide gallique), l'oleuropéine et des extraits phénoliques de l'olive montrent que l'extrait de margines, à la concentration de 200mg/kg, a amélioré significativement la stabilité oxydative de ces deux huiles. Le tableau XIII résume les résultats des différents paramètres analysés après l'addition de 200mg/kg d'extrait de margines à l'huile d'olive et l'huile de tournesol et après 150minutes de chauffage à 180°C.

Tableau XIII : Evolution des différents paramètres analysés après 150minutes de chauffage de deux huiles (TS, HO) enrichies avec 200mg/kg d'extrait de margines.

	Indice de peroxyde (méc d'O ₂ /kg)		Indice d'acidité (% d'acide oléique)		DO à 530nm		% d'inhibition du radical DPPH	
	TS	HO	TS	HO	TS	HO	TS	HO
T	18±0,5	35±1,4	0,9±0,07	3,5±0,1	0,75±01	1,2±7	33±0,6	35±0,6
EM	10±0,9	16±1,2	0,5±0,04	2,8±0,09	0,4±0,08	0,6±0,06	65±0,3	78±0,2

T : témoin (sans ajout) ; **EM** : extrait de margines ; **TS** : huile de tournesol ; **HO** : huile d'olive.

Il est intéressant d'observer que les deux huiles (TS, HO) avec une composition en acides gras, des paramètres physicochimiques très différents ont pratiquement la même réponse durant le temps de traitement thermique.

Les changements chimiques à des températures élevées sont originaires de réactions d'hydrolyse : polymérisation, isomérisation et cyclisation. Ces réactions affectent les propriétés sensorielles, nutritionnelles et organoleptiques de l'huile. Toutes ces réactions peuvent être favorisées par la présence d'oxygène, de l'humidité, de traces métalliques et de radicaux libres.

Selon KALANTZAKIS et *al.* (2006), les huiles d'olives vierges se sont montrées plus thermostables comparativement à l'huile d'olive raffinée et aux huiles végétales (huile de tournesol, soja), estimation faite par la stabilité du contenu polaire à 180°C pendant 25 heures.

De plus, GERTZ et *al.* (2000) ont observé que les huiles non raffinées s'avéraient plus stables que celles raffinées.

SANCHEZ-MUNIZ (2006), par comparaison aux huiles (tournesol, maïs, coton et soja) ont observé que l'HO présente le degré de détérioration le plus faible ceci par la mesure de la viscosité, des composés polaires et par la perte en antioxydants.

Les résultats obtenus par QUILS et *al.* (2002) permettent de conclure que la résistance des huiles à l'oxydation dépend de l'interaction entre les antioxydants et les acides gras.

Compte tenu de ces résultats, on peut déduire que l'évolution de l'Ip, l'absorbance à 530 nm et l'acidité dépendent du degré d'insaturation de l'huile et de la présence d'antioxydants qualitativement et quantitativement. Après chauffage pendant 150min à 180°C, l'Ip de huile de TS et de HO sont multiplié par le facteur de 5 et 3, respectivement. En fait, l'ajout des phénols individuels et les extraits phénoliques ont permis de réduire la vitesse d'apparition des produits primaires (les peroxydes) et les produits secondaires de l'oxydation des huiles de tournesol et d'olives.

Les extraits phénoliques de feuilles, de margines et de pulpe ont réduit considérablement les valeurs des paramètres testés. Cependant, l'extrait de margines a montré un effet stabilisant plus élevé que les autres extraits.

GÓMEZ-ALONSO *et al.* (2003), (2007) ont rapporté que les composés phénoliques agissent avec les radicaux libres et interrompent ainsi les réactions d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides, par conséquent, la formation des composés secondaires est empêchée.

Ceci se traduit par la diminution des valeurs de peroxydes, de *p*-anisidine ainsi que l'absorbance des substances réactives de l'acide thiobarbiturique.

2.6. Evolution des paramètres en présence de pomme de terre :

2.6.1. Evolution de l'indice de peroxyde :

Les résultats se rapportant à la détermination de cet indice sont présentés dans les figures 42 et 43.

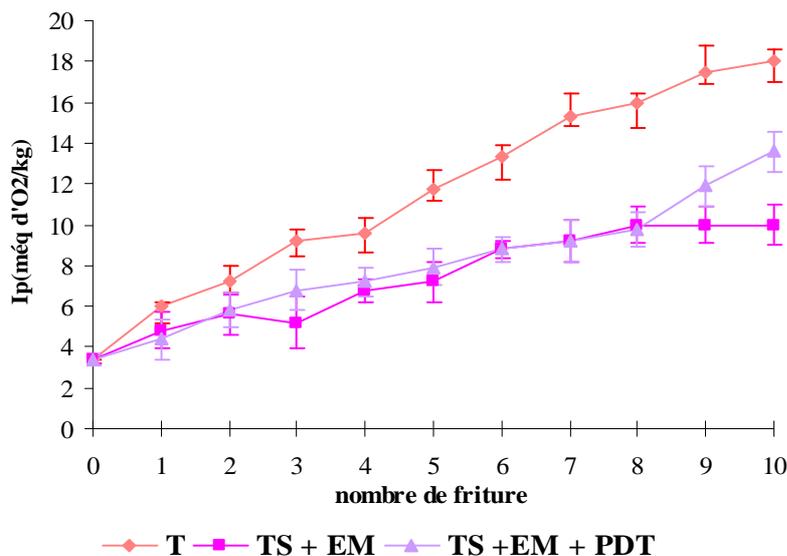


Figure 42 : Evolution de l'Ip de l'huile de tournesol en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre).

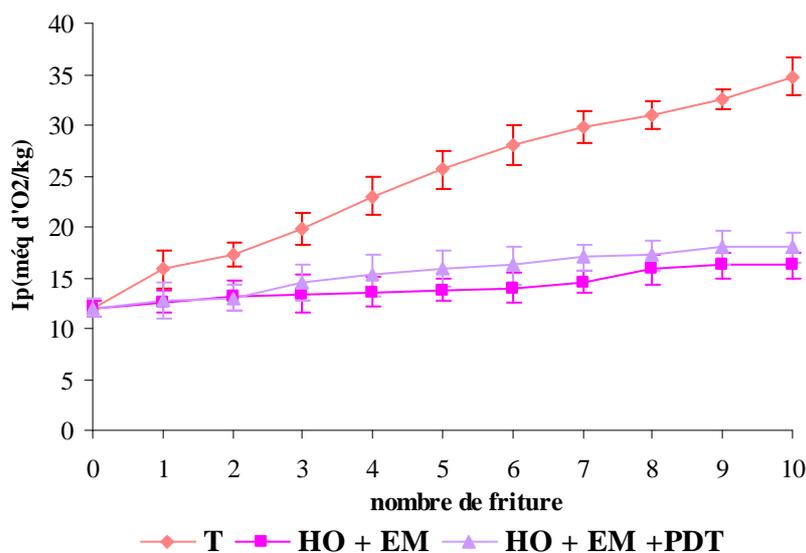


Figure 43: Evolution de l'Ip de l'huile d'olive en fonction de nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre).

Les figures 42 et 43 montrent que les valeurs obtenues avec les deux huiles progressent selon la même allure que celle de témoins respectifs. Notons que les courbes obtenus lors de la friture se situent entre le témoin (absence d'additif) et l'huile enrichie avec l'extrait de margine.

L'augmentation des valeurs de peroxyde peut être liée à la formation de peroxyde lors de traitement thermique ou lors de friture. L'addition de l'extrait de margines a permis la diminution de la formation de peroxydes. BLEKAS et *al.* (1995) ont rapporté que la présence de biophénols protège l'huile dans le stade initial de l'oxydation. La plupart des auteurs ont rapporté le changement des paramètres physicochimiques de différentes huiles après friture ou chauffage à des températures simulant la friture. Des niveaux semblables de l'Ip de l'huile de tournesol, de l'huile d'olive et de l'huile d'olive vierge ont été observés après 60 min de friture mais le taux des composés polaires totaux le plus élevé est enregistré pour l'huile de tournesol (QUILES et *al.*, 2002).

L'étude faite par HOULOULA et *al.* (2004), sur l'effet d'origan sur la stabilité oxydative de l'huile de coton durant la friture à 185°C, a montré que la poudre ou l'extrait éthanolique d'origan diminue l'accumulation de diènes conjugués, des composés polaires, triacylglycérols polymérisés, triacylglycérols dimériques et les valeurs de *p*-anisidine de l'huile de friture.

NAZ et *al.* (2004) ont étudié l'effet de l'addition des antioxydants individuels (acide caféique, acide vanillique, acide férulique) et l'extrait de feuilles de thé sur l'huile de maïs au cours de la friture. Après 90 min de friture à 180°C, les antioxydants abaissent les valeurs de peroxydes et de *p*-anisidine dans l'ordre suivant : acide caféique > acide vanillique > acide férulique > extrait de feuille de thé. Ces auteurs expliquaient cette différence de l'efficacité par la différence de la structure chimique des acides phénoliques et par la présence des impuretés dans l'extrait de feuilles de thé.

L'étude faite par REHAB (2010), sur l'effet de l'extrait de pomposia sur la stabilité oxydative de l'huile de tournesol durant la friture à 180°C, a montré que l'extrait diminue les valeurs de peroxydes.

2.6.2. Evolution de l'absorbance à 530 nm:

Le test à l'acide TBA mesure les produits secondaires de l'oxydation des acides gras. Les résultats de l'absorbance de ces composés lors de la friture sont donnés par les figures 44 et 45.

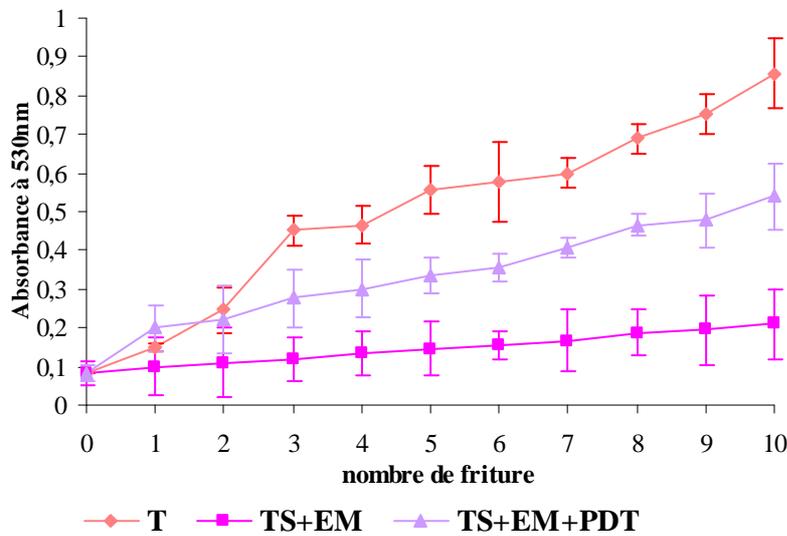


Figure 44 : Evolution de l'absorbance à 530nm en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol, EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre).

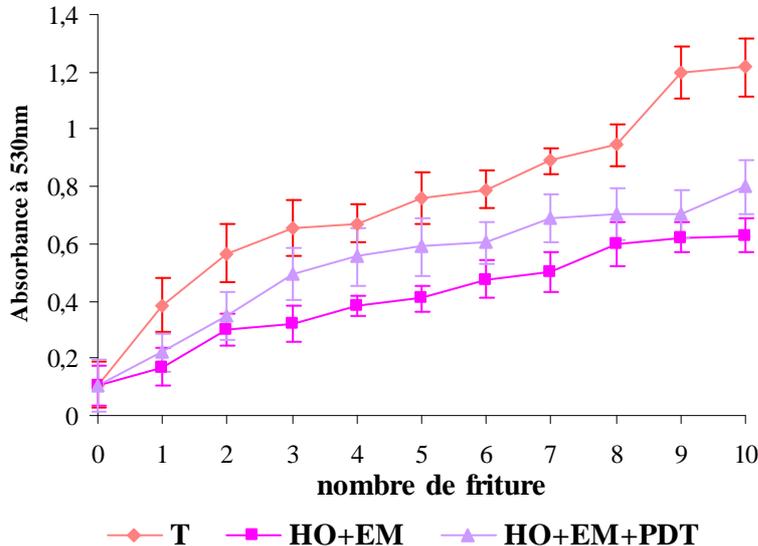


Figure 45 : Evolution de l'absorbance à 530 nm en fonction de nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre).

Les absorbances des substances secondaires de l'oxydation des deux huiles augmentent graduellement en fonction du nombre de friture. Les valeurs obtenues en présence de pomme de terre se situent entre celles des huiles témoins et celles des huiles enrichies (sans addition d'aliment). Donc la présence de pomme de terre influence l'apparition des produits secondaires de l'oxydation. Ce résultat va dans le même que les résultats d'analyse de l'indice de peroxydes.

L'étude faite par REHAB (2010), sur l'effet de l'extrait de pomposia sur la stabilité oxydative de l'huile de tournesol durant la friture à 180°C, a montré que l'addition de l'extrait à différente concentration cause un abaissement des quantités des substances réactives de TBA.

De plus, les études faites par FARAG *et al.* (2003), EL AMANY (2007) et REHAB (2010) ont montré que l'addition des extraits polyphénoliques aux huiles provoque une diminution significative de la formation des produits secondaires de l'oxydation durant la friture.

2.6. 3. Evolution de l'acidité :

Les valeurs de l'Ia des deux huiles obtenues lors de la friture sont représentées dans les figures 46 et 47.

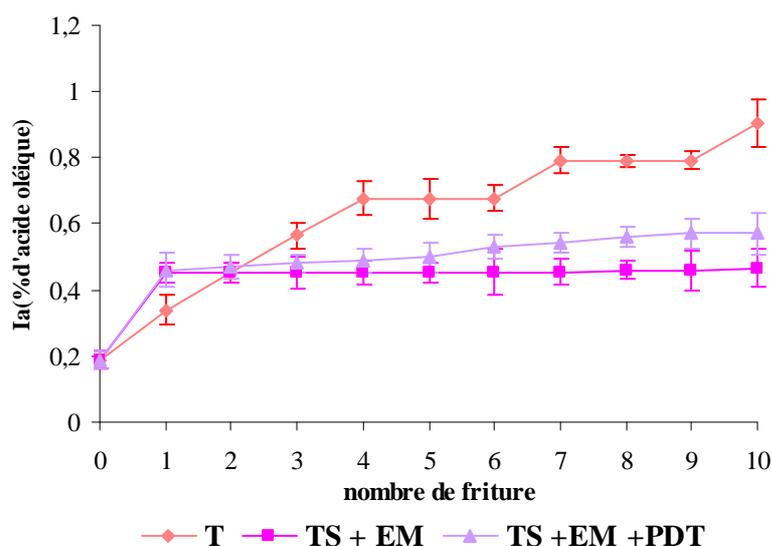


Figure 46 : Evolution de l'acidité de l'huile de tournesol en fonction de nombre de friture (T : témoin ; TS : huile de tournesol ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre)

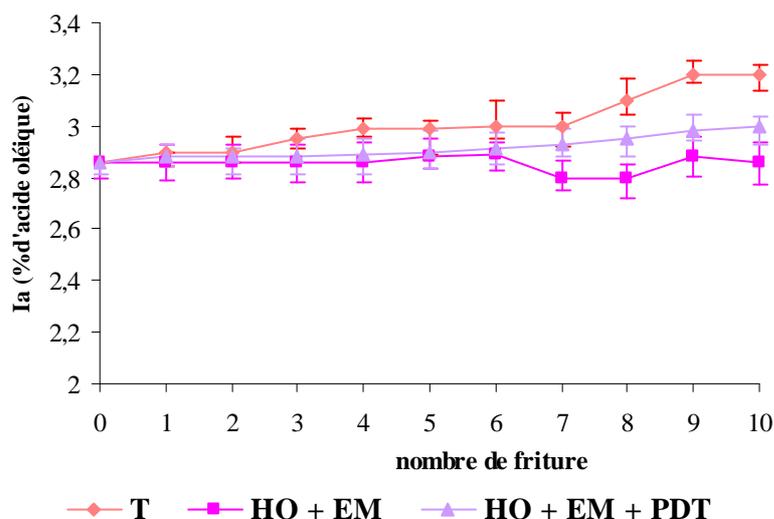


Figure 47 : Evolution de l'indice d'acide de l'huile d'olive en fonction du nombre de friture (T : témoin ; HO : huile d'olive ; EM : extrait de margines ; PDT : pomme de terre).

L'examen des deux figures indique que l'augmentation de l'acidification est beaucoup plus importante pour l'huile de tournesol que l'huile d'olive. Cette augmentation peut être liée à la présence d'acides gras libres issus de l'hydrolyse des triglycérides. Cette hydrolyse pourrait être due à l'effet hydrolytique de l'eau de constitution de l'aliment frit ou de celle libérée par certaines réactions chimiques comme la décomposition d'un dimère de peroxyde. Ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'acidité en présence de pomme de terre.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par REHAB (2010) en étudiant l'effet de l'ajout de l'extrait de pomposia sur la stabilité de l'huile de tournesol au cours de la friture. Les résultats de cette étude ont montré que l'acidité croît avec l'augmentation de la période de friture. L'addition de l'extrait de pomposia (1200ppm) à l'huile a diminué les valeurs de l'acidité durant la friture.

Les résultats obtenus par FARAG *et al.* (2003), EL ANANY (2007) et REHAB (2010) ont montré que les composés phénoliques des fruits et des feuilles possèdent des effets antihydrolytiques.

2.6.4. Evolution des polyphénols totaux:

Les résultats de dosage des PPT sont consignés dans le tableau XII.

Tableau XIV: Evolution des PPT après 10 cycles de friture.

	Concentration des PPT (mg/kg)			
	Avant chauffage	Après enrichissement	Après chauffage	Après friture
TS	nd	196 ± 0,4	148 ± 0,2	134,6 ± 0,1
HO	615 ± 0,3	795 ± 0,2	690 ± 0,6	532,4 ± 0,2

TS : huile de tournesol ; **HO** : huile d'olive

Les résultats font apparaître que la quantité en PPT, après chauffage à température simulant la friture ou après la friture, a diminué pour les deux huiles. On remarque que la friture provoque, aussi, une perte partielle des PPT originalement présents dans les deux huiles. Toutefois, le contenu phénolique de ces huiles, après 10 cycles de friture, reste plus élevé que le contenu des huiles fraîches avant enrichissement, ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par CHIOU *et al.* (2007), en étudiant l'effet de la supplémentation de l'extrait de feuilles d'olive à trois huiles (HO, TS et huile de palme).

Les composés phénoliques ont été corrélé avec la stabilité oxydative élevée de l'huile d'olive, leur résistance à l'oxydation qui est assurée majoritairement par l'hydroxytyrosol et l'acide cafféique, qui sont des composés *ortho*-diphénoliques (BALDIOLI *et al.*, 1996 ; CINQUANTA *et al.*, 1997).

PAPODOPOULOS et BOSKOU (1991) ont rapporté que les autres composés phénoliques (tyrosol, acides hydroxybenzoïques, acides *ortho* et *para*-coumariques) ont un faible effet antioxydant. Durant le stockage, la présence de ces composés dépend du processus hydrolytique et de l'oxydation de la fraction *ortho*-diphénolique (CINQUANTA *et al.*, 1997).

Plusieurs études faites sur la perte des CP durant la friture ont été rapporté par les données bibliographiques (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2002b ; GÓMEZ-ALONSO *et al.*, 2003 ; HENNA LU et TAN, 2009).

Les expériences faites par KALOGEROPOULOS *et al.* (2007b) ont montré des concentrations élevées en polyphénols dans l'huile absorbée par l'aliment frit, comparées à celles de bain de friture. Ces auteurs ont attribué cet effet à la « survie » des polyphénols lorsqu'ils sont absorbés par les aliments ou à la diffusion relative des phénols polaires vers les tissus riches en eau des aliments. La dernière observation a été aussi rapportée par l'étude faite par SACCHI *et al.* (2002) où une augmentation absolue de tyrosol et hydroxytyrosol dans une émulsion de type eau/huile, après la cuisson de poisson, a été observée. Ces mêmes chercheurs attribuent ce résultat à la migration de ces composés vers la phase aqueuse de l'émulsion. Les mêmes résultats ont été trouvés par BRENES *et al.* (2002) et RODIS *et al.* (2002) qui ont étudié la distribution des antioxydants des huiles d'olive entre la phase huileuse et aqueuse. De plus, selon CHIOU *et al.* (2007), le type de l'huile affecte probablement cette distribution.

La perte des antioxydants (polyphénols, tocophérols) lors du traitement thermique dépend du ratio surface/volume (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2002).

La friture peu profonde dans l'huile d'olive est une habitude dans les régions méditerranéennes. Cette pratique provoque une perte partielle des PPT originellement présents dans ces huiles.

2.6.5. Evolution de la capacité antioxydante :

Les pourcentages de neutralisation de radical DPPH après 10 cycles de friture sont indiqués dans le tableau XIII.

Tableau XV : Evolution de la capacité antioxydante après 10 cycles de friture.

	% d'inhibition de radical DPPH			
	Avant chauffage	Après enrichissement	Après chauffage	Après friture
TS	63,56 ± 0,9	90 ± 0,3	65 ± 0,3	60,3 ± 0,2
HO	65,75 ± 0,7	96 ± 0,4	78 ± 0,2	65,5 ± 0,1

TS : tournesol ; **HO** : huile d'olive.

L'activité antioxydante de l'extrait de margines, déterminée par le test de DPPH, diminue durant la friture. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par GÓMEZ-ALONSO *et al.* (2003).

La capacité antioxydante des deux huiles augmente après enrichissement, les pourcentages d'inhibition des huiles fraîches sont 63,56% et 65,75% de TS et HO, respectivement. Après enrichissement, les valeurs deviennent 90% pour TS et 96% pour l'HO. Cette augmentation peut être attribuée aux CP de l'extrait utilisé qui renferme des composés à effet antioxydant puissant. Après 10 cycles de friture, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH ont diminué de 60% et 65% pour TS et HO, respectivement.

La stabilité oxydative de HO est corrélée principalement avec la concentration de biophénols hydrophiles, les tocophérols et les chlorophylles. La présence de composés phénoliques peut expliquer la différence de l'activité antioxydante de HO, en la comparant à celle de l'huile de tournesol, qui renferme principalement les tocophérols.

BEŠTER *et al.* (2007) ont rapporté que le α -tocophérol devient actif quand la fraction phénolique polaire de l'HO est réduite et les produits primaires atteignent une concentration critique de 20 méq d'O₂/kg.

La diminution de la capacité antioxydante lors de la friture est parallèle à la diminution de la quantité des PPT dans l'huile.

Plusieurs facteurs tels que le contact avec l'air, la température, la durée de chauffage, le degré d'insaturation, le type de matériel utilisé pour la friture et la présence de pro oxydants ou d'antioxydants affectent la stabilité de l'huile.

Le type de l'huile et sa composition sont les facteurs majeurs qui affectent la stabilité de l'huile lors du traitement thermique ou lors de la friture. La composition en acides gras et le type et la concentration en antioxydants naturels (s'ils sont présents) déterminent la stabilité oxydative d'une huile donnée. Les acides gras polyinsaturés influent les différentes réactions chimiques. Les antioxydants naturels ont prouvés leurs rôles protecteurs contre les altérations des huiles.

Les changements chimiques dans le milieu de friture augmentent avec le temps de friture et la température appliquée. Les huiles avec des quantités élevées de vitamines E ou des PP montrent une grande résistance à l'oxydation.

Conclusion

Conclusion

Les lipides constituent un groupe plus hétérogène que les glucides et les protéines. Ils sont constitués essentiellement de triglycérides et des constituants mineurs (phosphatides, cérides, insaponifiables, chlorophylles).

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. L'oxydation des acides gras procède par un ensemble de réactions en chaîne auxquelles participent surtout les radicaux libres et elle se produit en trois étapes: initiation, propagation et terminaison. Ces réactions sont accélérées par plusieurs facteurs : la lumière (UV), la température, la nature des acides gras, la présence des métaux lourds (prooxydants).

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie agro-alimentaire car elle entraîne des altérations qualitatives ; d'ordre organoleptique (rancissement, changement de couleur, odeurs désagréables), d'ordre nutritionnel (perte en vitamines, acides gras essentiels), voir même une toxicité et perte de la qualité marchande.

Un des moyens les plus efficaces pour retarder l'oxydation des lipides et prolonger donc la durée de conservation des denrées alimentaires est l'incorporation des antioxydants.

Au vu des problèmes posés par la toxicité des antioxydants synthétiques, on s'oriente de plus en plus vers les antioxydants naturels, particulièrement les composés phénoliques qui suscitent actuellement un grand intérêt par leur impact sur la santé (régime méditerranéen, réduction du risque cardio-vasculaire, du risque de cancer,...etc).

Au cours de cette étude, les composés phénoliques extraits des olives vertes, des feuilles de la variété *Chamlal* et l'extrait de margines montrent un effet protecteur contre l'oxydation thermique de l'huile d'olive et de l'huile de tournesol. Les extraits de pulpe et de feuilles sont caractérisés par leur richesse en oleuropéine et l'extrait de margines renferme les dérivés de l'oleuropéine (tyrosol et hydroxytyrosol). L'extrait de margines est un inhibiteur puissant des radicaux générés lors de l'oxydation thermique des deux huiles, comme il a été observé lors de la mesure de l'indice de peroxyde (produits primaires) et l'absorbance à 530 nm (produits secondaires). En parallèle, il s'est produit des réductions des contenus phénoliques totaux à l'origine de leur participation à la protection des huiles. Par conséquence, la capacité antiradicalaire mesurée en utilisant le radical DPPH a diminué. Les résultats obtenus après chauffage de TS témoin (sans addition d'antioxydant) sont : $I_p = 18 \text{ mEq d O}_2/\text{kg}$, $DO_{(530 \text{ nm})} = 0,750$, pourcentage d'inhibition du radical DPPH égale à 33 %. Après l'addition de l'extrait de margines à 200 mg/kg, les valeurs obtenues sont : $I_p = 10 \text{ mEq d O}_2/\text{kg}$, $DO_{(530 \text{ nm})} = 0,210$, la quantité des polyphénols a diminué (147,7 mg/kg) et par conséquence, la capacité antiradicalaire est réduite (65,3%). Après chauffage de l'huile d'olive témoin, les valeurs de ces paramètres sont : $I_p = 34,8 \text{ mEq d O}_2/\text{kg}$, $DO_{(530 \text{ nm})} = 1,217$, concentration des polyphénols égale à 314 mg/kg et le pourcentage d'inhibition du DPPH est de 34,29%. Les valeurs obtenues après enrichissement de l'huile d'olive avec l'extrait de margines sont : $16,2 \text{ mEq d O}_2/\text{kg}$, $DO_{(530 \text{ nm})} = 0,630$. En même temps, il s'est produit des réductions de contenu phénolique (705,6mg/kg) et de la capacité antiradicalaire (78,45%).

La capacité antioxydante des extraits phénoliques diminue dans l'ordre suivant : extrait de margines > extrait de feuille \approx extrait de pulpe.

De plus, les résultats obtenus après enrichissement des deux huiles avec l'extrait de margines à 200 mg/kg en présence de pomme de terre, comme aliment de friture, se situent entre ceux obtenus à partir des huiles témoins et des huiles enrichies avec le même extrait mais en absence de pomme de terre.

L'acide cafféique par rapport à l'acide gallique, montre une meilleure capacité antioxydante. La vanilline est sans effet protecteur. L'activité antioxydante de l'oleuropéine se rapproche de celle des extraits de feuilles et de pulpe (rappelons que l'oleuropéine est le constituant majeur des polyphénols des feuilles et de la pulpe d'olive). Le pouvoir antioxydant des phénols individuels testés diminue dans l'ordre suivant : acide cafféique > oleuropéine > acide gallique > vanilline.

Le pouvoir antioxydant des extraits phénoliques et des phénols individuels diminue dans l'ordre suivant : extrait de margines > extrait de feuilles \approx extrait de pulpe \approx acide cafféique > oleuropéine > acide gallique > vanilline.

L'effet antioxydant des composés phénoliques dépend de leur structure, leur concentration et l'effet conjugué ou inhibiteur d'autres substances. De plus, la nature et la composition du substrat à protéger des altérations influent l'activité anti oxydante de ces molécules.

Dans l'avenir, plusieurs voies de recherche s'ouvrent pour mieux appréhender les mécanismes anti-oxydatifs :

- tester l'effet antioxydant de ces extraits phénoliques sous différentes conditions : exposition à la lumière, un long stockage, et d'autres températures même à froid et la combinaison de plusieurs de ces conditions ;
- quantifier les polyphénols contenus dans l'aliment frit avant et après traitement thermique ;
- caractériser c'est-à-dire identifier les divers composés phénoliques des extraits obtenus à partir des olives, de feuilles et de margines par des techniques chromatographiques ou électrophorétiques;
- valoriser les composés phénoliques des margines, considérées comme source importante d'antioxydants naturels, et diminuer un peu soit peu de leur effet polluant sur l'environnement ;
- valoriser aussi les phénols de feuilles et des fruits déclassés riches en oleuropéine et autres phénols;
- proposer des méthodes d'extraction et de préservation des extraits phénoliques;
- dans le cas d'un usage à des fins alimentaires, des études toxicologiques poussées devraient être entreprises dans la mesure où le label « produit naturel » n'est pas suffisant pour garantir la totale innocuité de ces composés car extraits obtenus par des solvants qui peuvent être toxiques comme le méthanol.

Références bibliographiques

ABEROUMAND A. & DEOKULE S.S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, **7(4)**, 582-585.

ABIDI S.L. & RENNICK K.L. (2003). Determination of nonvolatile components in polar fractions of rice bran oils. *Journal American of Oil Chemists Society*, **80**, 1057-1062.

AFANAS'EV I.B., DOROZHKO A.I., BRODSKII A.V., KOSTYUK V.A. & POTAPOVITCHI A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **38**, 1763-1769.

AIT BADDI C., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C. & HAFIDI M. (2008). Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardious Materials*, 1-5.

AKASBI M., SHOEMAN D.W. & SAARI-CSALLANY A. (1993). High-performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *Journal of American Oil*.

AKINMOLADUM A.C., IBUKUN E.O. & DAN-OLOGE I.A. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific Research and Essay*, **2(6)**, 191-194.

ALAIS C., LINDIN G. & MICLO L. (2003). Biochimie alimentaire. Ed. DUNOD.

ALLAM S.S.M. & EL-SAYED F.E. (2004). Fortification of fried potato chips with antioxidant vitamins to enhance their nutritional value and storage ability. *Grasas y Aceites*, **55(4)**, 434-443.

ALLOUCHE N., FEKI I. & SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 267-273.

ALMELA L., BAYÇIN D., SÁNCHEZ-MUÑOZ B., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J.A., ROCA M.J. & RABE V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, **1120**, 221-229.

ALTIOK E., BAYÇIN D., BAYRAKTAR O. & ÜLKÜ S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, **62**, 342-348.

ALUYOR E.O. & ORI-JESU M. (2008). The use of antioxidants in vegetable oils. *African Journal of Biotechnology*, **7(25)**, 4836-4842.

ALZAAWELY A.A., XUAN T.D., KOYAMA H. & TAWATA S. (2007). Antioxidant activity and contents of oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M.Sm. *Food Chemistry*, **104**, 1648-1653.

AMAROWICZ R., PEGG R.B., RAHIMI-MOGHADDAM P., BARL B. & WEIL G. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, **84**, 551-562.

AMIOT M.J., FLEURIET A. & MACHEIX J.J. (1986). Importance and evaluation of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 823-826.

ANDREASEN M.F., LANDBO A.K., CHRISTENSEN L.P., HANSEN A. & MEYER A.S. (2001). Antioxydant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4090-4096.

ANDRIKOPOULOS N.K., DEDOUSSIS G.V.Z., FALIERA A., KALOGEROPOULOS N. & HATZINIKOLA H.S. (2002b). Deterioration of natural antioxydant spices of vegetable edible oils during the domestic deep-frying and pan-frying of potatoes. *Journal of Food Science and Nutrition*, **53**, 351-363.

ANONYME 1 (2007): www.eastman.com.

ANONYME 2 (2006): www.foodstandards.gov.au.

ANTOLOVICH M., PRENZLER P.D., ROBARDS K. & RYAN D.(2000). Sample preparation in the determination of compounds in fruits. *Analyst*, **125**, 989-1009.

ANTOLOVICH M., BEDGOOD D.R., BISHOP A.G., JARDINE D., PRENZLER P.D. & ROBARDS K. (2004).LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 962-971.

APARICO R., RODA L., ALBI M.A. &GUTIERREZ F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4150-4155.

ARUOMA O.I., DEIANA M., JENNER A., HALLIWELL B., HARPARKASH K. & BANNI S. (1998). Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 5181-5187.

ASSIMOPOULOU A.N., BOSKOU D. & PAPAGEORGIU V.P. (2004). Antioxydant activities of alkannin, shikannin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates. *Food Chemistry*, **87(3)**, 433-438.

AUGUSTIN M.A. & BERRY S.K. (1983). Efficacy of the antioxidants BHA and BHT in palm olein during heating and frying. *Journal American of Oil Chemists Society*, **60(8)**, 1520-1523.

BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. & SAMMAN S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191-203.

BALDIOLI M., SERVILI M., PERETTI G. & MONTEDERO G.F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **73(11)**, 1589-1593.

BARRERA-ARELLANO D., RUIZ-MÉNDEZ V., RUIZ G.M. & DOBARGANES C. (1999). Loss of tocopherols and formation of degradation compounds in triacylglycerol model systems heated at high temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 1923-1928.

BECHEER G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake¹. *Journal of Nutrition*, 3248-3254.

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUÑO A. & DEL RIO J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extract from *Olea europaea*. leaves. *Food Chemistry*, **68**, 457-462.

BENDINI A., CERRETANI L., VECCHI S., CARRASCO-PANCORBO A. & LERCKER G. (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4880-4887.

BENDINI A., CERRETANA L., CARRASCO-PANCORBO A., GOMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A. & LECKER G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oil :a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. *Molecules*, **12**,1679-1719.

BERSET C. (2006). Antioxydants phénoliques structures, propriétés, sources végétales ; In : « les polyphénols en agroalimentaire ». Technique & documentation. Lavoisier.

BEŠTER E., BUTINAR B., BUČAR-MIKLAČIČ M. & GOLOB T. (2007). Chemical changes in extra virgin olive oil from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry*, 1-19.

BIANCO A., BUIARELLI F., CARTONI G., COCCIOLI F., JASIONOWSKA R. & MARGHERITA P. (2003). Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry of biophenols compounds in olives and vegetation waters, part 1. *Journal of Separation Science*, **26**, 409-416.

BLEKAS G., TSIMIDOU M. & BOSKOU D. (1995). Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chemistry*, **52(3)**, 289-294.

BOGANI P., GALLI C., VILLA M. & VISIOLI F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, **190**, 181-186.

BONDIA-PONS I., AURA A.M., VUORELA S., KOLEHMAINEN M., MYKKÄNEN H. & POUTANEN K. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science*, 1-14.

BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. & ANDRIKOPOULOS N.K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, **94**, 558-564.

BOUAZIZ M., GRAYER R.J., SIMMONDS M.S.J., DAMAK M. & SAYADI S. (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(2)**, 236-241.

BOUAZIZ M. & SAYADI S. (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 497-504.

BOUDHRIOUA N., BAHLOUL N., BEN SLIMEN I. & KECHAOU N. (2008). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and products*, 1-8.

BOUDET A.M. (2007): Evolution and current of status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, **68**, 2722-2735.

BRAVO L., ABYA R., EASTWOOD M.A. & SAURA-CALIXTO F. (1994). Degradation of polyphenols(catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic and faecal output fermentation. *British Journal of Nutrition*, **71**,933-946.

BRENES M., REJAND L., GARCIA P., SANGEZ H.A. & GARRIDO A. (1997). Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing. *In: Characterization of phenolic extract from olives (Olea europaea cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. Food Chemistry*, **105** (2007), 761-770.

BRENES M., GARCIA A., DOBARGANES M.C., VELASCO J. & ROMERO C. (2002). Influence of thermal treatments simulating cooking processes on polyphenols content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5962-5967.

BRIANTE R., FEBBRARIO F. & NUCCI R. (2003). Antioxidant properties of low molecular weight phenolics present in mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**,6975-6981.

BRIANTE R., LA CARA F., FEBBRAIO F., PATUMI M. & NUCCI R. (2002). Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, **93**, 109-119.

BRUNTON J. (2001). Plantes toxiques, Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique & documentation, 2ème Ed. Lavoisier.

CAPANNES C., PALCHETTI I., MASCINI M. & PARENTI A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, **71**, 553-562.

CARRASCO-PANCORBO A., CERRETANI L., BENDINI A., SEGURA-CARRETERO A. GALLINA-TOSCHI T., & FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Science*, **28**, 837-858.

CARRASCO-PANCORBO A., CERRETANI L., BENDINI A., SEGURA-CARRETERO A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006). Evaluation of individual antioxidant activity of single phenolic compounds on virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28-39.

CERRETANI L., BIASINI G., BONOLI-CARBOGNIN M. & BENDINI A. (2007). Harmony of virgin olive oil and food pairing: a methodological proposal. *Journal of Sensory Studies*, **22**, 403-416.

CHEIKHOUSMAN R., ZUDE M., BOUVERSSE D.J.R., LEGER C.L., RUTLEDGE D.N. & BIRLOUEZ-ARAGON I. (2005). Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382(6)**, 1438-1443.

CHE MAN Y.B. & JASWIR I. (1999). Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined bleached and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *Journal American Oil Chemistry Society*, **76**, 331-339.

CHEN Y.Z., CHAN P.T., MA H.M., FUNG K.P. & WANG J. (1996). Antioxidant effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **73**, 375-380.

CHEUNG L.M., CHEUNG P.C.K. & OOI V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, **81**, 249-255.

CHEW Y.L., GOH J.K. & LIM Y.Y. (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, **116**, 13-18.

CHEYNIER V. & SARNI-MANCHADO P. (2006). Structures phénoliques et gout ; In : « polyphénols en agroalimentaire ». Technique & documentation. Lavoisier.

CHIMI H., CILLARD J. & RAHMANI M. (1991). Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural O.C.S.*, **68 (5)**, 307-312.

CHIOU A., SALTA F.N., KALOGEROPOULOS A., NTALLA I. & ANDRIKOPOULOS N.K. (2007). Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of French fries in oils enriched with olive leaf extract. *Journal of Food Science*, **72(8)**, 574-584.

CHIRA K., SUH J.H., SAUCIER C. & TEISSEDRE J.P. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**, 75-82.

CICERALE S., LUCAS L. & KEAST R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 458-579.

CILLARD J., CILLARD P. & CORMIER M. (1980). Effect of experimental factors on the prooxydant behavior of α -tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **57**, 255-261.

CILLARD J. & CILLARD P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **13(1)**, 24-29.

CINQUANTA L., ESTI M. & LA NOTTE E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **74**, 1259-1264.

CLIFFORD M.N. (2000). Chlorogenic acid and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of Science Food*, **80**, 1033-1043.

COOK N.C. & SAMMAN S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional biochemistry*, **7**, 66-76.

CORTESI N., AZZOLINI M., ROVILLINI P. & FEDELI E. (1995). I componenti minori polari degli oli vergini di oliva: ipotesi di struttura mediana LC-MS. *RIVISTA Italiana di Sostanze Gras*, **43**, 1802-1807.

CRAPISTE G.H., BREVEDAN M.I.V. & CARELLI A.A. (1999). Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the American oils Chemists Society*, **76(12)**, 1437-1443.

DAMAK N., BOUAZIZ M., SAYADI M., SAYADI S. & DAMAK M. (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1560-1566.

DE LA PUERTA R., RUIZ-GUTIERREZ V. & HOULT J.R. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol*, **57**, 445-449.

DE LEONARDIS A., ARETINI A., ALFANO G., MACCIOLA V. & RANALLI G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, **266**, 653-659.

DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. & SACCHI R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858-867.

DE MEDINA F.S. & ZARZUELO A. (2008). Polyphenols and immunity. *Proceedings of Nutrition Society*, **67**.

DEMIRCHKI M., SOTIROPOULOU S. & TSIMIDOU M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y Aceites*, **52 (3-4)**, 207-213.

- DE NINO A., LOMPARDO N., PERRI E., PROCOPIO A., RAFFAELLI A. & SINDONA G. (1997).** Direct identification of phenolic-glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 533-541.
- DERBEL S. & GHEDIRA K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, **1**, 28-34.
- DIMITRIOS B. (2006).** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 505-512.
- DUTHIE G.G. (1999).** Parsley, polyphenols and nutritional antioxidant. *British Journal of Nutrition*, **81**, 425-426.
- DUTHIE G.G., DUTHIE S.J. & KYLE J.A.M. (2000).** Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, **13**, 79-106.
- DUTHIE G.G., GARDNER P.T. & KYLE J.A.M. (2003).** Plant polyphenols : are they the new magic bullet ? *Proceeding of the Nutrition Society*, **62**, 599-603.
- EL ANANY A.M. (2007).** Influence of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on the stability of sunflower oil during deep-frying process. *Electronic Journal of Food and Chemistry*, **2**(1), 14-19.
- ERBAY Z. & ICIER F. (2009).** Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, **91**, 533-541.
- ESPIN J.C., SOLER-RIVAS C. & WICHERS H.J. (2000).** Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2n2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 648-656.
- FALLEH H., KSOURI R., CHAIEB K., KARRAY-BOURAOUI N., TRABELSI N., BOULAABA M. & ABDELLY C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *C.R. Biologies*, **331**, 372-379.
- FARAG R.S., EL BAROTY G.S. & BASUNY A.M. (2003).** The influence of phenolic extract obtained from the olive plants (cv's Picual and Kronakii) on the stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, **38**, 81-87.
- FAZEL M., SAHARI M. & BARZEGAR M. (2008).** Determination of Main Tea Seed antioxidants and their effects on Common Kilka oil. *International Food Research Journal*, **15** (2), 209-217.
- FEKI M., ALLOUCHE N., BOUAZIZ M., GARGOUBI A. & SAYADI S. (2005).** Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology*.

FERGUSON L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.

FERREIRA I.C.F.R., BARROSL L., SOARES M.E., BASTOS M.L. & PEREIRA J.A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea Europaea L.* leaves sprayed with copper formulation. *Food Chemistry*, **103**, 188-195.

FINOTTI E. & DI MAJO D. (2003). Influence of solvents on the antioxidants property of flavonoïds. *Nahrung/Food*, **47**, 186-187.

FITO M., DE LA TORRE R., FARRÉ-ALBALADEJO M., KHYMENETZ O., MARRUGAT J. & COVAS M.I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolics compounds in humans. *Ann Ist Super Sanita*, **43(4)**, 375-381.

FRANKEL E.N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**, 495-511.

FRENOT M. & VIERLING E. (1997). Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. Ed : Doin.

FRITSCH C.W., HOFLAND C.N. & VICKERS Z.M. (1997). Shelf life of sunflower kernels. *Journal of Food Science*, **62(2)**, 425-428.

GALLI C. & VISIOLI F. (1999). Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids*, **34**, 23-26.

GALLINA-TOSCHI T. (2005). Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques. *Journal Sep. Science.*, **28**, 859-870.

GARIBOLDI P., JOMMI G. & VEROTTA L. (1986). Secoiridoides from *Olea Europaea*. *Phytochemistry*, **25(4)**, 865-896.

GERTZ C., KLOSTERMANN S. & KOCHHAR S.P. (2000). Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *European Journal of Lipids Science Technology*, **102**, 543-551.

GIESE J. (1996). Antioxidants. Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, **50**, 73-81.

GÓMEZ-ALONSO S., FREGAPANE G., SALVADOR M.D. & GORDON M.H. (2003). Changes en phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 667-672.

GÓMEZ-ALONSO S., MANCEBO-COMPOS V., SALVADOR M.D. & FREGAPANE G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months of storage at room temperature. *Food Chemistry*, **100**, 36-42 .

GONÇALVES C., LOPES M., FERREIRA J.P. & BELO I. (2009). Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, **100**, 3759-3763.

GORDON M.H. & KOURKIMSKA L. (1995). Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. *Food Chemistry*, **52**, 175-177.

GORDON M.H. & KOURKIMSKA L. (2006). The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **68(3)**, 374-353.

GUIRAUD J.P. (2005). Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod, 143.

GUITFUNGER T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **58**, 966-971.

GÜLÇİN I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, 213-220.

HABAUZIT V. & HORCAJADA M.N. (2008). Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochemistry Review*, **7**, 313-344.

HAGERMAN A.E., RIEDL K.M., JONES G.A., SOVIK K.N., RITCHARD N.T., HARTZFELD P.W. & RICCHET T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolic (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1887-1892.

HALLIWELL B. (1995). Antioxydant characterisation, methodology and mechanism. *Biochemistry and Pharmacology*, **49**, 1341-1349.

HALLIWELL B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, **73**, 341-347.

HARBONE J.B. (1990). Constraints on evolution of biochemical pathways. *Biological Journal of the Linnan Society*, **39**, 135-151.

HASLAM E.(2007). Vegetable tannins –Lessons of phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**, 2713-2721.

HE Z. & XIA W. (2007). Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry*, 1-5.

HEIMLER D., PIERONI A., TATTINI M. & CIMATO A. (1992). Determination of flavonoids, flavonoids glycosides and biflavonoids in *Olea Europaea* L. leaves. *Chromatographia*, **33**, 369-373.

HELME J.P., CHAZON J.B. & PERRIN J.L. (1990). Les antioxydants, *In* : « Actifs et additifs en cosmétologie ». Technique & documentation.

HENNEBELLE T., SAHPEZ S. & BAILLEUL F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 3-6.

HIDALGO F.J., LEON M.M. & ZAMORA R. (2006). Antioxidative activity of amino phospholipids /amino acid mixtures in edible oils as determined by Rancimat method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 5461-5467.

HODZIC Z., PASALIC H., SRABOVIC M., SALETOVIC M. & POLJAKOVIC M. (2009). The influence of total phenolics content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *European Journal of Scientific Research*, **28(3)**, 471-477.

HOULOULA D.P., OREOPOULOU V. & TZIA T. (2004). Antioxidant efficiency of oregano in frying and storage of fried products. *European Journal of Lipids Science Technology*, **106**, 746-751.

HUBBARD G.P., WOLFFRAM S., VOVEGROVE J.A. & GIBBINS J.M. (2003). The role of polyphenolic compounds in diet as inhibitors of platelet function. *Proceeding of the Nutrition Society*, **62**, 469-478.

IQBAL S. & BHANGER M.I. (2007). Stabilisation of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, **100**, 246-254.

JACOBSEN C., SCHWARZ K., STÖCKMANN H., MEYER A.S. & ADLER-NISSEN J. (1999). Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3601-3610.

JAPON-LUJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M. & LUQUE DE CASTRO M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 76-82.

JAPON-LUJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M. & LUQUE DE CASTRO M.D. (2006). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Anal. Bioanal. Chemistry*, **385**, 753-759.

JEAN-MARC A. & MEREILLE H. (2003). Qualité des huiles et acides gras de palme et des mélanges d'huiles acides caractérisations chimiques et biochimiques. *Cinquièmes Journées de la recherche avicole*, Tours.

KALANTZAKIS G., BLEKAS G., PEGKLIDOU K. & BOSKOU D. (2006). Stability and radical scavenging of heated olive oil and other vegetables oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108**, 329-335.

KALMAL-ELDIN A. & ANDERSON R. (1997). A multivariate study on the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **74**, 375-380.

KALOGEROPOULOS N., MYLONA A., CHIOU A., IOANNOU M.S. & ANDRIKOPOULOS N.K. (2007b). Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *Food Science and Technology*, **40**, 1008-1017.

KALOGIANNI E.P., KARASTOGIANNIDOU C. & KARAPANTSIOS T.D. (2009). Effect of the presence and absence of potatoes under repeated frying conditions on the composition of palm oil. *Journal American Oil Chemists Society*, **86**, 561-571.

KAMAL-ELDIN A. (2005). Minor components of fats and oils. *Appelqvist, Lipids*, **6**, 319-359.

KAMAL-ELDIN A. & APPELQVIST L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **19**, 671-701.

KAMPA M., ALEXAKI V.I., NOTAS G., NIFLI A.P., NISTIKAKI A., HATZOGLOU A., BAKOGEURGOU E. & KOUIMTZOGLOU E (2003). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells : potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, **6(2)**, 63-74.

KARAKAYA S. & EL S.N. (2006). Total phenols and antioxidant activities of some herbal teas and in vitro bioavailability of black tea polyphenols. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, **23(1)**, 1-8.

KARADENİZ F., BURDURLU H.S., KOCA N. & SOYERY. (2005). Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. *Turkey Journal of Agricultural*, **29**, 297-303.

KARPIŃSKA M., BOROWSKI J. & DANOWSKA-OZIEWICZ M. (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*, **72**, 5-9.

KATALINIC V., MILOS M., KUSILIC T. & JUKIC M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550-557.

KAYA A., TEKIN A.R. & ÖNER M.D. (1993). Oxidative stability of sunflower and olive oils: comparison between a modified active oxygen method and long term storage. *Lebensm. Wiss. u. Technology*, **26**, 464-468.

KHALIL A. (2002). Mécanismes moléculaires de l'effet protecteur de la vitamine E dans l'athérosclérose. *Canadian Journal of Physiologic Pharmacol*, **80**, 662-669.

KHAN M.A. & SHAHIDI F. (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry*, **75**, 431-437.

KIRALAN M., BAYRAK A. & ÖZKAYA M.T. (2009). Oxidative stability of virgin olive oils from some important cultivars in East Mediterranean area in Turkey. *Journal American of oils and Chemistry Society*, **86**, 247-252.

KOLESNIKO M.P. & GINS V. (2001). Phenolic substances in medicinal plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **37(4)**, 392-399.

KUSILIC T., RADONIC K., KATALINIC V. & MILOS M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, **85**, 633-640.

LAGYERRE M., LÓPEZ-GIRALDO L.J., LECOMTE J., PINA M. & VILLENEUVE P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL*, **14 (5)**, 278-292.

LANFER-MARQUEZ U.M., BARROS R.M.C. & SINNECKER P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, **38**, 885-891.

LATTANIZIO V., KROOM P.A., QUIDEAU S. & TREUTTER D. (2008). Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. *In: Recent advances in polyphenol research*, volume 1, Ed. Wiley Blackwell.

LEE J., LEE Y. & CHOE E. (2007). Temperature dependence of the autoxidation and antioxidants of soybean, sunflower and olive oil. *European Food Research Technology*, **226**, 239-246.

LEE J., LEE S., LEE H., PARK K. & CHOE E. (2002). Spinach (*Spinacia oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep fat-fried products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5664-5669.

LÉGER C.L. (2006). Anti-oxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions. *OCL*, **13 (1)**, 59-69.

LESAGE-MEESEN L., NAVARRO D., MAUNIER S., SIGOILLOT J.C., LORQUIN J. & DELATTRE M. (2001). Simple phenolic content in olive residues as a fraction of extraction systems. *Food Chemistry*, **75**, 501-507.

LE TUTOUR B. & GUEDON D. (1992). Antioxidant activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, **31**, 1173-1178.

LIMIROLI R., CONSONNI R., RANALLI A., BIANCHI C. & ZETTA I. (1996). ¹H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2040-2048.

LITRIDOU M., LINSSEN J., SCHOLS H., BERGMANS M., POSTHUMUS M., TSIMIDOU M. & BOSKOU D. (1997). Phenolic compounds in virgin olive oil: fractionation by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *Journal of Science and Food Agricultural*, **74**, 169-174.

LOLOS M., OREOPOULOU V. & TZIA C. (1999). Oxidative stability of potato chips: effect of frying oil type, temperature and antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 1524-1528.

LOPEZ J., JARDIN I., SALIDO G.M. & ROSADO J.A. (2008). Cinnamtannin B-1 as an antioxidant and platelet aggregation inhibitor. *Life Sciences*, **82**, 977-982.

LU Y. & YEAP FOO L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **25**, 197-202.

LUACES P., PÉREZ A.G., GARCIA J.M. & SANZ C. (2005). Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of olive oil. *Food Chemistry*, **90**, 168-174.

LUKEŠOVÁ D., DOSTĀLOVÁ J., EL-MONEIM MAHMOUD E. & SVĀROVSKÁ M. (2009). Oxidation changes of vegetable oils during microwave heating. *Czech Journal of Food Science*, **27**, 178-181.

MACHEIK J.J., FREURIET A. & JAY6ALLEMANO C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Presses polytechniques et universitaires. Romandes.

MACHEIK J.J., FREURIET A. & SARNI-MANCHADO (2006). composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôles ; *In* : « les polyphénols en agroalimentaire ». Technique & documentation. Lavoisier.

MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., RÈMÈSY C. & JIMENEZ L. (2004). Polyphenols: Food Sources and biavailability^{1,2}. *American Society for Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.

MANNINO S., BURATTI S., COSIO M. S. & PELLEGRINI N. (1999). Evaluation of the 'antioxidant power' of olive oils based on a FIA system with amperometric detection. *Analyst*, **124**, 1115-1118.

MARC F., DAVIN A., DEGLÈNE-BENBRAHIM L., FERRAND C., BACCAUNAUD M. & FRITSCH P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, **20** (4), 458-463.

MARTIN S. & ANDRIANTSITOHAINA R. (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51**, 304-315.

MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., RUIZ D.R.Y. & ALCAIDE E.M. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheeps of two-stage olive cakes and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, **107**, 61-74.

MASSON L., ROBERT P., DOBARGANES M.C., URRÁ C., ROMERO N., ORTIZ J., GOICOECHEA E., PÉREZ P., SALAME M. & TORRES R. (2002). Stability of potato chips fried in vegetable oils with different degree of unsaturation effect of ascorbyl palmitate during storage. *Grasas y Aceites*, **53(2)**, 190-198.

MC CLEMENTS D.J. & DECKER E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-emulsions : impact of molecular environment on chemical reactions in heterogenous food systems. *Journal of Food Science*, **65(8)**, 1270-1282.

MC DONALD S., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M. & ROBARDS K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, **73**, 73-84.

MEDINA L.S.A. (2007). Phenolic compounds: their role during olive oil extraction and in flaxseed-transfer and antioxidant function. 159-179.

MÉNDEZ A.I. & FALQUÉ E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra virgin olive oil. *Food Control*, **18**, 521-529.

MERRIEN A. (1992). Tournesol. In: manuel des corps gras. Edition: Tec& Doc, Lavoisier, Paris.116-122.

MEYER A.S., DONOVAN J.L., PEARSON D.A., WATERHOUSE A.L. & FRANKEL E.N. (1998b). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1783-1787.

MICHAÏLOF C., MANESIOTIS P. & PANAYIOTOU C. (2008). Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters. *Journal of Chromatography A*, **1182**, 25-33.

MINIOTI K.S. & GEORGIU C.A. (2010). Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas y Aceites*, **61(1)**, 45-51.

MOHAMED A.A. (2007). Influence of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on the stability of sunflower oil during deep-fat frying process. *Electronic Journal of Food and Plants Chemistry*, **2(1)**, 14-19.

MONPON B., LEMAIRE B., MANGAL P. & SURBLED M. (1996). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. In : polyphénols 1996. Les colloques n° 87, INRA.

MONTEDERO G., SERVILLI M., BALDIOLI M. & MINIATI E. (1992). Simple and hydrolysable phenolic compounds in virgin olive oil, 2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1577-1580.

- MORELLO J.R., VUORELA S., ROMERO M.P., MOTILVA M.J. & HEINONEN M. (2005).** Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the *arbequina* cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2002-2008.
- MOON J.K. & SHIBAMATO T. (2009).** Antioxidant assays for plant and food compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57 (5)**, 1655-1666.
- MOURE A., CRUZ J.M., FRANCO D., DOMÍNGUEZ J.M., SINERO J., DOMÍNGUEZ H., NUÑEZ M.J. & PARAJOÁ J.C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **72**, 145-171.
- MOYER R.A., HUMMER K.E., FINN C.F., FREI B. & WROLSTAD R.E. (2002).** Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits : Vaccinium, Rubus and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 519-525.
- MUCHUWETI M., ZENDA G., NDHLALA A.R. & KASIYAMHURU A. (2005).** Sugars, organic acid and phenolic compounds of *Ziziphus mauritiana* fruit. *European Food Research Technology*, **221**, 570-574.
- MYLONAKI S., KLIASSOS E., MAKRIS D.P., KEFALAS P. (2008).** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chemistry*, **392**, 977-985.
- NACZK M. & SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95-111.
- NAVAS J.A., TRES A., BOU R., CODONY R. & GUARDIOLA F. (2007).** Optimization of analytical methods for the assessment of the quality of fats and oils used in continuous deep fat frying. *Grasas & Aceites*, **58(2)**, 154-162.
- NAZ S., SHEIKH H., SIDDIQI R. & SAYEED S.A. (2004).** Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chemistry*, **88**, 253-259.
- NISSIOTI M. & TASIOLA-MARGARI M.; (2002).** Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, **77**, 371-376.
- NORMAND L., ESKIN N.A.M. & PRZYLSKI R. (2006).** Comparison of the frying stability of regular and high oleic acid sunflower oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **83(4)**, 331-334.
- OBEID H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D. & ROBARDS K. (2005a).** Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9911-9920.

OBEID H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D. & ROBARDS K. (2005b). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823-837.

OBEID H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D., ROBARDS K. & STOCKMANN R. (2007). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823-837.

OBEID H.K., KARUSO P., PRENZLER P.D. & ROBARDS K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 2848-2853.

OBEID H.K., BEDGOOD D.R., PRENZER P.D., ROBARDS K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1238-1248.

OLIVERAS-LÓPEZ M.J., INNOCENTI M., GIACCHERINI C., IERI F., ROMANI A. & MULINACCI N. (2007). Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *TALANTA*, **73**, 726-732.

OUARZKI H. (2007). Etude du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques des olives vertes de la variété *Chamlal* et de deux acides phénoliques: acide gallique et acide cinnamique sur deux huiles végétales (l'huile d'olive et huile de tournesol). Mémoire d'Ingénieur d'Etat en biologie, option : C.Q.A.

OVASKAINEN M.L., TÖRRÖNEN R., KOPONEN J.M., SINKKO H., HELLSTRÖ J., REINIVUO H. & MATTILA P. (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in finnish adults. *The Journal of Nutrition*, 562-566.

OWEN R.W., MIER W., GIACOZA A., HULL W.E., SPIEGELHALDER B. & BARTSCH H. (2000). Identification of lignanes as majors components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical chemistry*, **46**, 976-988.

OWEN R.W., HAUBNER R., WÜRTELE G., HULL W.E., SPEIEGELHALDER & BARTSCH H. (2004).Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, **13(4)**, 319-326.

OZDEMIR Y., SAYM E.O., KURULTAY S. (2009).Health benefits of olive polyphenols.^{3^{ed}} international Congres on Food and Nutrition.

PANAGIOTOPOULOU P.M. & TSIMIDOU M. (2002). Solid phase extraction : applications to the chromatographic analysis of vegetable oils and fats. *Grasas y Aceites*, **53(1)**, 84-95.

PAPODOPOULOS G. & BOSKOU D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal American pf Oil Chemists Society*, **68**, 669-671.

PAPOTI V.T. & TSIMIDOU M.Z. (2009). Looking through the qualities of fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry*, **112**, 246-252.

PATTON S. & KURTZ G. W. (1951). 2-thiobarbituric acid as reagent for detecting milk fat oxidation. *Dairy Science*, **34**, 669-674.

PENG Z.F., STRACK D., BAUMERT A., SUBRAMANIAM R., GOH N.K., CHIA T.F., TAN S.N. & CHIA L.S. (2002). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*.

PEREIRA A.P., FERREIRA I.C.F.R., MARCELINO F., VALENTAO P., ANDRADE P.B., SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A. & PEREIRA J.A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea Europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) leaves. *Molecules*, **12**, 1153-1162.

PERRIN J.L. (1992). Analyse des corps gras, détermination de l'altération. In : Manuel des corps gras, KARLESKIND A. Ed. Lavoisier tec et doc.

PESCHEL W., SÁNCHEZ-RABANEDA F., DIEKMANN W., PLESCHER A., GARTZIA I., JIMÉNEZ D., LAMUELA-RAVENTÓS R., BUXADERAS S. & CODINA C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, **97**, 137-150.

PETRONI A., BLASEVICH M., SALAMI M., PAPINI N., MONTEDERO G.F. & GALLI C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb research*, **78**, 151-160.

PETTI S. & SCULLY C. (2009). Polyphenols, oral health and disease : A review. *Journal of Dentistry*, **37**, 413-423.

PIETTA P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042.

PIETTA P., MINOGGIO M. & BRAMATI L. (2003). Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, **28**, 257-312.

POIANA M.A., ALEXA E., MOIGRADEAN D. & POPA M. (2009). The influence of the storage conditions on the oxidative stability and antioxidant properties of sunflower and pumpkin oil. *44th Croatia & 4th International Symposium on Agriculture*, 449-453.

POISSON J.P. & NACRE M. (2003). Corps gras alimentaire : aspects chimiques, biochimiques et nutritionnels. In : Lipides et corps gras alimentaires. Ed. Tec & Doc.

POKORNÝ J. (2003). Problèmes de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. In : Lipides et corps gras alimentaires, Ed. Tec & Doc.

PRATT D.E. (1980). Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. *New Plenum Press*, 282-292.

QUIELES J.L., HUERTAS J.R., BATTINO M., RAMÍREZ-TORTOSA M.C., CASSINELLO M., MATAIX J., LOPEZ-FRIAS M. & MAÑAS M. (2002). The intake of fried virgin olive oil or sunflower oils in differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. *British Journal of Nutrition*, **88**, 57-65.

RAHIM M. (2007). Méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. *Les technologies de laboratoire*, **2**, 18-21.

RAJESHWAR Y., KUMAR G.P.S., GUPTA M. & MAZUMBER U.K. (2005). Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (FABACEAE) seeds. *European Bulletin of Drug Research*, **13(1)**, 31-39.

RAMEZANI P. & PEYVAST G. (2002). Natural antioxidants from Iranian olive oil processing waste water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

RANALLI A., DE MATTIA G. & FERRANTE M.L. (1997). Comparative evaluation of the olive oil gives by a new processing system. *International Journal of Food Science and Technology*, **32**, 289-297.

RANALLI A., DE MATTIA G. & FERRANTE M.L. (1998). The characteristics of percolation olive oils produced with a new processing enzyme aid. *International Journal of Food Science and Technology*, **33**, 247-258.

RANALLI A., FERRANTE M.L., DE MATTIA G. & COSTANTINI N. (1999). Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 417-424.

RANDHIR R., VATTEM D. & SHETTY K. (2005). Antioxidant enzyme response studies in H₂O₂-stressed porcine muscle tissue following treatment with oregano phenolic extracts. *Process Biochemistry*, **40**, 2123-2134.

RASTRELLI L., PASSI S., IPPOLIO F., VACCA G. & SIMONE F. (2002). Rate of degradation of α -tocopherol, squalene, phenolics and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(20)**, 5566-5570.

RATTY A.K. & DAS N.P. (1988). Effects of flavonoids on non enzymic lipid peroxidation : structure activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **39**, 69-79.

REDDY V., UROOJ A. & KUMAR A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*, **90**, 317-321.

REHAB F.M.A. (2010). Effect of Pomposia(*Syzygium cumini*) fruit juice on the stability of fried sunflower oil. *Journal of Food Technology*, **8(2)**, 30-38.

REHAB F.M.A. (2010). Improvement the stability of fried sunflower oil by using different levels of Pomposia (*Syzygium cumini*). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **9(2)**, 396-403.

RIBUREAU GAYON P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. DUNOD, Paris.

RICE-EVANS C.A., MILLER J. & PAGANGA G. (1996). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**, 152-159.

RICES-EVAN C.A., MILLER N.J. & PAGANGA G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20 (7)**, 933-956.

ROBARDS K. & ANTOLOVICH M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*, **122**, 11-34.

ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKER G., SWATSITANG P. & GLOVER W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**, 401-436.

ROBARDS K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**, 657-691.

ROCHA-GUZMÁN N.J., HERZOG A., GONZÁLEZ6LAREDO R.F., IBARRA-PÉREZ F.J., ZAMBRANO-GALVÁN G. & GALLEGOS-INFANTE J.A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, **103**, 521-527.

RODIS P.S., KARATHANO V.T. & MANTZAVINOU A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.

RODRÍGUEZ G., RODRÍGUEZ R., JIMÉNEZ A., GUILLÉN R. & FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J. (2007). Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, an in vitro digestibility of alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 136-142.

RODRÍGUEZ VAQUERO M.J., ALBERTO M.R. & MANCA De NADRA M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, **18**, 93-101.

RODRÍGUEZ G., LAMA A., TRUJILLO M., ESPARTERO J.L. & FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea Europaea* fruit-mill waste: 3, 4-Dihydroxyphenylglycol. *Food Science and Technology*, **42**, 483-490.

ROMANI A., MUINACCI N., PINELLI P., VINCIERI F.F. & CIMATO A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea Europaea L.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 964-967.

ROMANI A., PENILLI P., MULINACCI N., GALARDI C., VINCIERI F.F., LIBERATORE L. & CICHELLI A. (2001). HPLC and HRGC analyse of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia*, **53**, 279-284.

RYAN D. & ROBARDS K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123**, 31-44.

RYAN D., LAWRENCE H., PRENZLER P., ANTOLOVICH M. & ROBARDS K. (2001). Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analytica Chimica Acta*, **21449**, 1-11.

RYAN D., ROBARDS K., PRENZLER P., JARDINE D., HERLT T. & ANTOLOVICH M. (1999). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*, **855**, 529-537.

RYAN D., ANTOLOVICH M., PRENZLER P., ROBARDS K. & LAVEE S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea Europaea L.* *Scientia Horticulture*, **92**, 147-176.

RYAN D., ANTOLOVICH M., HERLT T., LAVEE S. & ROBARDS K. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6716-6724.

SACCHI R., PADUANO A., FIORE F., DELLA MEDAGLIA D., AMBROSINO M.L. & MEDINA I. (2002). Partition behavior of olive oil phenolic compounds in oil-brine mixtures during thermal processing of fish canning. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2830-2835.

SALTA F.N., MYLONA A., CHIOU A., BOSKOU G. & ANDRIKOPOULOS N.K. (2009). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, **13**, 413-421.

SANCHEZ-MUNIZ F.J. (2006). Oils and fats: changes due to the culinary and industrial process. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research*, **76(4)**, 230-237.

SANTANGELO C., VARI R., SCAZZOCCHIO B., DI BENDETTO R., FILESI C. & MASELLA R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*, **43(4)**, 394-405.

SATUE M.T., HUANG S.W. & FRANKEL E.N. (1995). Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached and deodorized olive oil. *JACOS*, **72(10)**, 1131-1137.

- SAYADI S., BOUAZIZ M., HAMMAMI H., BOUALLAGUI Z. & JEMAÏ H. (2008).** Production of antioxidants from olive processing by-products. *EJEAFChe*, **7(8)**, 3231-3236.
- SAVARESE M., DE MARO E. & SACCHI R. (2007).** Characterisation of phenolic extracts from olive (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, 761-770.
- SCACCINI C., NARDINI M., GENTILI V., DI FELICE M. & TOMASSI G. (1992).** Effet of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasm and lipoprotein fractions. *Atherosclerosis*, **33**, 627-633.
- SCALBERT A., JOHNSON I.T. & SALTMARSH M. (2005).** Polyphenols : antioxidant and beyond (1-3). *American Journal of Clinical nutrition*, **81**, 2155-2175.
- SCHEFFLER A., RAUWALD H.W., KAMPA B., MANN U., MOHR F.W. & DHEIN S. (2008).** *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, **120**, 233-240.
- SCHMIDT S. & POKORONY J. (2005).** Potentiel application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids- a review. *Journal of Food Science*, **23**, 93-102.
- SCOTT G. (1965).** Atmospheric oxidation and antioxidants. *African Journal of Biotechnology*.
- SEEL C.J., DOGARGANES M.C. & BARRERA-ARELLANO D.(2005).** The influence of batural tocophéroles during thermal oxidation of refined and partially hydrogenated soybean oils. *Grasas y Aceites*, **56(1)**, 46-52.
- SEERAM N.P. & NAIR M.G. (2002).** Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity related studies of the dietary constituents anthocyanins,anthocyanidins and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5308-5312.
- SENEVIRATNE K.N., HAPUARACHCHI C.D. & EKANAYAKE S. (2009).** Comparaison of the phenolic depend and antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry*, **114**, 1444-1449.
- SERVILLE Y. (1980).** Manuel d'alimentation humaine T2.
- SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MINIATI E., MACCHIONI A. & MONTEDERO G. (1999).** High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and ID- and 2D-nuclear magnetic resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**, 873-882.
- SERVILI M. & MONTEDERO G. (2002).** Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 602-613.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEDERO G. & MOROZZI M. (2004).** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophylic phenolics :

agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 113-127.

SHAHIDI F. (2007). Nutraceuticals and unctinal foods in health promotion and disease risk reduction. *International Union of Food Science and Technology Newsletter*, 1-16.

SHAHIDI F. (2008). Antioxidants: extraction, identification, application and efficacy measurement. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7(8)**, 3325-3330.

SHAHIDI F., MCDONALD J., CHANDRASEKARA A. & ZHONG Y. (2008). phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: chemistry and health effects. *Journal of Clinical nutrition*, **17 (S1)**, 380-382.

SHERWIN E.R. (1978). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**, 809-814.

SHUITI H. (2004). Effect of drying temperature on oleuropein content of olive (*Olea Europaea L.*) leaves. *Food Preservation Science*, **30(4)**, 191-193.

SHYAMALA B.N., GUBTA S., JYOTHI LASHMI A. & PRAKASH J. (2005). Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oil. *Innvo Food Science Emerg Technol*, **6**, 239-245.

SHYU S.L., HAU L.B. & HWANG L.S. (1998). Effect of vacuum frying on oxidative stability of oils. *Journal American of Oil Chemists Society*, **75 (10)**, 1393-1398.

SIDWELL C.G., SALWIN H., BENCA M. & MITCHELL J.H. (1954). The use of thiobarbituric acid as measure of fat oxidation. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, **31**, 603-606.

SILVA S., GOMES L., LEITÃO F., COELHO A.V. & VILAS BOAS L. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea Europaea L.* fruits and leaves. *Food Science Tect Int*, **12(5)**, 385-396.

SINEIRO J., FRANCO D., RUBILAR M., SANCHEZ M., JEREZ M., PINELO M., COSTOYA N. & NÚÑEZ M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7(8)**, 3210-3216.

SINGLETON V.R., ORTHIFER R. & LAMUELA-RAVENTOS R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.

SOBHI B., ISAM S., AHMAD Y., JACOB H. & SALEEBA A. (2004). Reducing the environmental impact of olive mill wastewater in Jordan, Palestine and Israel. *Process Biochemical*, **39**, 947-951.

SOLER-RIVAS C., ESPIN J.C. & WICHERS H. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013-1023.

TABERA J., GUINDA A., RUIZ-RODRIGUEZ J., SENORANS J. F., IBANEZ E., ALBI T. & REGLERO G. (2004). Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 4774-4779.

TAYLOR F.A. & CHOM M.A. (2006). Phenolics in Foods. *The Journal of NAET Energetics and Complementary Medicine*, **2(4)**, 565-568.

TAWAHA K., ALALI F.Q., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M. & EL-ELIMAT T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, **104**, 1372-1378.

TEISSEDRE P.L. (2008). Les effets du vin sur la santé. *Biofuture*, **294**, 45-48.

THAIPONG K., BOONPRAKOB U., CROSBY CISNEROS-ZEVALLOS L. & BYRNE D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 669-675.

TREMOLIERE J., SEVILLE Y., JACQUOT R. & DUPIN H. (1984). Manuel de l'alimentation humaine. Ed.E .S.F.

TRIAN L.L. & WHITE P.J. (1994). Antipolymerization activity of oat extracts in soybean and cottonseed oils under frying conditions. *Journal American of Oil Chemistry Society*, **71**, 1087-1094.

TRIPOLI E, GIAMMANCO M., TABACCHI G., DI MAJO D., GIAMMANCO S. & LA GUARDIA M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, **18**, 98-112.

TSIMIDOU M., PAPADOPOULOS G. & BOSKOU D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. (Part 1). *Food Chemistry*, **45**, 141-144.

TSIMIDOU M., GEORGIU A., KOIDIS A. & BOSKOU D. (2005). Loss stability of "veiled " (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*, **93**, 377-383.

TURCOTTE P. & SAHEB S. (1978). Activité antimicrobienne d'antioxydants phénoliques. *Canadian Journal of Microbiology*, **24(11)**, 1306-1320.

VAN ACKER S.A.B.E., VAN DEN BERG D.J., TROMP M.N.J.L., GRIFFIOEND.H., VAN BENNEKOM W.P. & VAN DER VIJGH W.J.F. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoides. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 331-342.

VAZQUER RONCERO A. (1978). Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Rev.Fr.Corps Gras*, **25**, 25-31.

VEKIARI S.A. & KOUTSAFTAKIS A. (2002). The effect of different processing stages of olive fruit on the extract olive oil polyphenol content. *Grasas Aceites*, **53(3)**, 304-308.

VISIOLI F., BELLOMO G., MONTEDERO G. & GALLI C. (1995). Low-density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **117**, 25-32.

VISIOLI F., BELLOMO G. & GALLI C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Research Commun*, **247**, 60-64.

VISIOLI F. & GALLI C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Science*, **55**, 1965-1971.

VISIOLI F. & GALLI C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new finding. *Nutrition Reviews*, **56(5)**, 142-147.

VISIOLI F., PETRONI A., & GALLI C. (1994). Phenolic compounds extracted from olive oil prevent oxidation of low density lipoproteins and inhibition platelet function and platelet and leukocyte eicosanoid production in vitro. In : « oxidative processes and antioxidants ». *Raven Press*, 199-206.

VISIOLI F., GALLI C., BORNET F., MATTEI A., PATELLI R., GALLI G. & CARUSO D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, **468**, 159-160.

VISSERS M.N., ZOCK P.L. & KATAN M.B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 955-965.

WANG Q., REKIKA D., CHARLES M.T., WANG X., TSAO R., YANG R., HAO Y.J., GAUTHIER G., GOSSELIN A. & KHANIZADEH S. (2009). Phenolic compositions and antioxidant activities of new developed day-neutral strawberry lines. *Agriculture and Agri-Food Canada*,

WARNER K. & MOSER J. (2009). Frying stability of purified mid-oleic sunflower oil triacylglycerols with added pure tocopherols and tocopherol mixtures. *Journal American of Oil Chemists Society*, **86**, 1199-1207.

WEIL J.P. (2005). Biochimie générale. Edition : Masson, pp : 273.

WISEMAN S.A., MATHOT J.N., DE FOUW N.J. & TIJBURG L.B. (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoprotein to oxidation on rabbits. *Atherosclerosis*, **120**, 15-23.

WOLF J.P. (1994). Analyse et dosage des lipides. In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA. MULTON J.L. Ed. Lavoisier tec et doc.

YAMAKI S. (1984). Isolation of vacuoles from immature apple fruit flesh and compartmentation of sugars, organic acids, phenolic compounds and amino acids. *Plant and Cell Physiology*, **25**, 151-166.

YANISHLIEVA V.N., MARINOVA EM, MARIKOV I.N. & GORDON M.H. (2002). Effect of ethanol extract from summer savory *Saturefae hortensis* L. on the stability of sunflower oil at frying temperature. *Journal of Science and Food Agriculture*, **74**, 524-530.

YANGUI T., RHOUMA A., GARGOURI K., TRIKI M.A. & BOUZID J. (2008). Efficacy of olive mill waste water and its derivatives in suppression of crown gall disease of bitter almond. *European Journal of Plant Pathology*, **122**, 495-504.

YOSHIDA H., TATSUMI M. & KAJIMOTO G. (1992). Influence of fatty acids on the tocopherol stability in vegetable oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 119-125.

ZANDI P. & GORDON M.H. (1999). Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. *Food Chemistry*, **64**, 285-288.