

## Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie

Samah DJEDDI<sup>1,3\*</sup>, Elina YANNAKOPOULOU<sup>2</sup>, Kyriakos PAPADOPOULOS<sup>2</sup> et Helen SKAL TSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de pharmacognosie et chimie des produits naturels, Faculté de Pharmacie, Zografou, 15771 Université d'Athènes, Grèce

<sup>2</sup> Institute de chimie physique, N.C.S.R. «Demokritos», Ag Paraskevi, 15310 Athènes, Grèce

<sup>3</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP 12, 23000, Algérie

\* Correspondance, courriel : [samah.djeddi@univ-annaba.org](mailto:samah.djeddi@univ-annaba.org)

### Résumé

*Thymus numidicus* Poiret. (Lamiaceae) est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ses propriétés thérapeutiques. Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle ainsi que plusieurs extraits bruts (dichlorométhane, méthanol, méthanol-eau 5:1 v/v, et l'infusé) du *Thymus numidicus* Poiret. récolté à Annaba (Algérie). L'activité antioxydante a été estimée par deux méthodes photométriques, la méthode de DPPH et celle de réduction du peroxyde d'hydrogène. Les résultats ont révélé que les deux extraits méthanol et méthanol-eau 5:1 ont exercé une forte activité de piégeage des radicaux libres DPPH en comparaison avec le BHT ainsi qu'une haute capacité de blocage du peroxyde d'hydrogène en comparaison avec les contrôles positifs de l'acide gallique et l'acide caféique.

**Mots-clés :** *Thymus numidicus*, extraits bruts, activité antioxydante.

### Abstract

**Anti-radical activities of essential oil and crude extracts of *Thymus numidicus* Poiret., Algeria**

*Thymus numidicus* Poiret. (Lamiaceae) is a plant widely used in Algerian traditional medicine. The aim of this work was to assess the antioxidant activity of the volatile compounds as well as different crude extracts (dichloromethane, methanol, methanol-water 5:1 v/v, infusion) of the endemic *Thymus numidicus* Poiret. collected from Annaba city (Algeria). The antioxidant activity was estimated by two fluorimetric methods, the DPPH method and the hydrogen peroxide scavenging method. The results revealed that methanol and methanol water 5:1 v/v extracts exerted very high free radical scavenging activity compared to the well-known butylated hydroxytoluene (BHT) and high hydrogen peroxide blocking activity than positive controls gallic acid and caffeic acid.

**Keywords :** *Thymus numidicus*, crude extracts, antioxidant activity.

## 1. Introduction

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels [1]. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées [2,3], dont les polyphénols qui sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante grâce à leur rôle d'antioxydants naturels [4]. Pendant des siècles, les espèces du genre *Thymus* ont été utilisées couramment dans plusieurs pays comme épices [5], selon [6] les feuilles de *Thymus vulgaris* sont utilisées comme un thé et comme épices dans les recettes occidentales pour améliorer le goût des plats et comme aromatisant distinct [7]. Le genre *Thymus* L. est originaire de la région méditerranéenne [8], où 110 espèces ont été recensées [9]. Ce genre appartient à la famille des Lamiaceae, la sous-famille des Nepetoideae, la tribu des Menthae et la sous-tribu des Menthinae [10]. D'après Quezel et Santa (1963) onze espèces appartenant au genre *Thymus* sont répertoriées en Algérie, parmi elles *T. numidicus* Poiret (Zaâteur en arabe) qui est rencontré essentiellement à Constantine (Nord-est Algérien) et en Kabylie (Centre de l'Algérie), selon les mêmes auteurs cette espèce est endémique à l'Algérie et à la Tunisie. Dans la littérature, de nombreuses études ont été consacrées à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles provenant de différentes espèces du genre *Thymus* [11], cependant les recherches relatives à l'activité antioxydante de cette espèce sont encore peu nombreuses [12]. À notre connaissance, il n'existe pas à ce jour des recherches relatives aux propriétés antioxydantes des extraits de *T. numidicus* d'Algérie. C'est dans ce contexte que la présente étude a été menée et vise à déterminer en utilisant deux méthodes photométriques, le potentiel antioxydant de l'huile essentielle obtenue (HE), ainsi que les extraits bruts suivants: extrait de dichlorométhane (NUD), extrait de méthanol (NUM), extrait de méthanol-eau (5:1) (NUH) et l'extrait aqueux (INF).

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Matériel végétal

La partie aérienne du matériel végétal a été récoltée à Annaba en Juin 2008 et identifiée au laboratoire de biologie végétale et environnement de l'université d'Annaba. La plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec à l'abri de la lumière, puis broyée finement.

### 2-2. Préparation des extraits

L'extraction a été réalisée selon la méthode d'épuisement successif par solvants organiques de polarité croissante décrite par [13], où 0,33 kg du matériel végétal a été épuisé successivement avec trois solvants à polarité croissante : dichlorométhane (500 mL), méthanol (500 mL), le mélange hydro-alcoolique méthanol-eau (5 :1, v/v) (500 mL). L'extraction a été effectuée à température ambiante durant 72 heures et répétée trois fois pour chaque solvant. Après filtration, le résidu a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'infusé a été préparé à partir d'un échantillon de 3g mélangé avec 300 ml d'eau distillée bouillante pendant 5min puis filtré à travers un papier Whatman n° 1.

### 2-3. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation de 100g de matière végétale pendant 2h en utilisant un appareil de type Clevenger selon les recommandations de la pharmacopée hellénique [14]. L'huile essentielle a été séchée avec le sulfate de sodium anhydre et stockée à l'obscurité à -4 °C.

## 2-4 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux de l'huile essentielle et des extraits étudiés a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Nikokavoura et *al.* [15]. 10 mL de l'extrait a été dilué avec 10mL de l'eau distillé puis mélangé avec 2ml du réactif de Folin-Ciocalteu (2 N) puis agité. 5mL de la solution de carbonate de sodium (7.5%) ont ensuite été ajouté puis le mélange a été agité vigoureusement. L'ensemble a été dilué avec 50 mL d'eau distillée, incubé à 45 °C dans un bain marie pendant 15 min et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm. Le taux de polyphénols totaux des échantillons étudiés, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-0.0020 mol. L<sup>-1</sup>), dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g d'extrait).

## 2-5. Evaluation du potentiel antioxydant

### 2-5-1. Test de DPPH

L'effet scavenger du radical libre DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) qui est utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse aux stress externes ou internes a été mesuré selon le protocole décrit par Bounatirou et *al.* [16]. Nous avons utilisé différentes concentrations (100, 250, 500, 750 et 1000 mg.L<sup>-1</sup>) des échantillons étudiés en même temps que l'antioxydant de synthèse BHT (Butylated hydroxytoluène). La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol, 100 µL de chaque extrait ainsi que le contrôle positif sont ajoutés à 2 mL de la solution de DPPH le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm. L'activité antioxydante a été estimée selon *l'équation (1)*:

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (1)$$

### 2-5-2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le potentiel de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été estimé en utilisant une méthode fluorimétrique rapporté par Nikokavoura et *al.* [15] 500µL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (0.01 M) a été ajoutée dans une cuve contenant 500 µL d'une solution méthanolique de lucigénine ( $1 \times 10^{-4}$  M), 500 µL de solution méthanolique de peroxyde d'hydrogène (0.1 M) et 1000 µL d'une solution méthanolique contenant l'huile essentielle et les extraits à tester à diverses concentrations. Après une heure, l'intensité de fluorescence a été mesurée à 425 nm nous avons fixé la longueur d'onde d'excitation à 390 nm. L'intensité de fluorescence de la solution à blanc ( $I_0$ ) est enregistrée par l'introduction de 1000 µL de méthanol à la place de la solution de l'échantillon à tester dans la cellule de réaction. Les concentrations finales des échantillons étudiés étaient (100, 250, 500, 750 et 1000 mg. L<sup>-1</sup>). L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été calculée à l'aide de *l'équation (2)*:

$$\% \text{ de l'activité antioxydante} = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \quad (2)$$

$I_0$  est l'intensité de fluorescence de la solution à blanc (sans l'échantillon testé)

$I$  l'intensité de fluorescence de l'échantillon contenant l'extrait.

Les mesures de la fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre JASCO FP-777. Pas moins de trois mesures ont été prises pour chaque solution d'essai. La solution mère de lucigénine (0.01 M) a été préparée en pesant la quantité appropriée et diluer dans 10 mL d'eau. On a préparé la solution mère d'hydroxyde de sodium (1 M) dans de l'eau désionisée.

### 3. Résultats et discussion

#### 3-1. Rendement des extractions

A partir de la quantité initiale de l'échantillon utilisé pour l'extraction, nous avons obtenus les rendements suivants: extrait de dichlorométhane (NUD) = 16.41g, extrait méthanolique (NUM) = 20.11g, extrait méthanol-eau (NUH) = 15.26g et l'infusé (INF) = 1.2g

#### 3-2. Rendement de l'huile essentielle

Le rendement obtenu en huile essentielle était de 1.02%, la composition de cette huile a été identifié par GC-MS où le carvacole a été identifié comme le composé majoritaire.

#### 3-3. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'huile essentielle et des différents extraits étudiés de *T. numidicus* a été déterminée en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu. Les résultats représentés dans le **Tableau 1** indiquent que l'huile essentielle (HE) était l'échantillon le plus riche en polyphénols avec 965.60 mg GAEs/gram d'extrait suivie de l'extrait du méthanol-eau (NUH) et l'extrait de méthanol (NUM) avec des teneur de 513.40 60 mg GAEs/gram d'extrait et de 377.40 mg GAEs/gram d'extrait, respectivement.

**Tableau 1 :** Teneur des polyphénols totaux contenus dans 1 gram d'extrait exprimé en mg GAEs

Extraits	Polyphénols totaux (mg GAEs/gram extrait)
NUD	321.98
NUM	377.40
NUH	513.40
INF	53.04
HE	965.60

Les antioxydants naturels font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé [17]. Un grand nombre de travaux réalisés sur l'activité antiradicalaire d'extraits de plantes ont montré que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène [18].

### 3-4. Evaluation du potentiel antioxydant

#### 3-4-1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents échantillons testés de *T. numidicus* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par un passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Les résultats obtenus révèlent que les différents extraits possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante (**Tableau 2**). Parmi les cinq extraits testés, l'extrait NUH a été enregistré comme le plus actif avec une activité antioxydante égale à  $92,10 \pm 0,55\%$  ce dernier est suivi par l'extrait NUM avec activité égale à  $88,40 \pm 1,82\%$ , les mêmes résultats ont été obtenus lors de l'étude de l'activité anti-radicalaire de *T. pulegioides*, où il a été clair que les extraits obtenus avec des solvants polaires tel le méthanol ou l'éthanol ont été enregistré comme les plus actifs avec un potentiel de réduction qui dépasse les 80% [19]. Parallèlement le contrôle positif BHT a montré un potentiel légèrement plus faible ( $76.13 \pm 3.68\%$ ) que les deux extraits polaires.

L'extrait NUD a présenté une activité anti-radicalaire moyenne ( $44,23 \pm 0,66\%$ ), cependant les résultats obtenus par Ismaili et al. [5] ont montré que l'extrait de dichlorométhane de *T. satureioides* n'a présenté aucune activité antioxydante. Un faible potentiel antioxydant a été enregistré pour l'huile essentielle étudiée avec  $22,06 \pm 3,07\%$ , ce résultat est en accord avec plusieurs études similaires menées sur plusieurs espèces : *T. lotocephalus* ( $32,08 \pm 1,56\%$ ) [20], *T. capitatus* ( $21,1 \pm 2,7\%$ ) [16] et *T. algeriensis* ( $6,3 \pm 0,3\%$ ) [21]. Il est connu que l'huile essentielle des espèces appartenant au genre *Thymus* sont riches en monoterpènes phénoliques tels que le thymol et le carvacrol [22] et la présence du carvacrol à un grand pourcentage dans la composition de l'huile essentielle conduit à une inhibition modérée du radical libre DPPH. Cependant, il faut noter que le résultat obtenu par Hazzit et al. [12] lors de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de *T. numidicus* récoltée au centre algérien (Azzazga) possédait un fort potentiel antioxydant ( $82,4 \pm 1,9\%$ ) ceci est du à sa richesse en  $\alpha$ -terpinéol.

**Tableau 2 :** *Activité de piégeage des radicaux libres (%) des extraits de T. numidicus et du BHT*

Concentrations (mg L <sup>-1</sup> )	BHT	NUD	NUM	NUH	INF	HE
100	16.70 ± 5.28	1,06 ± 0,66	9,43 ± 0,55	29,26 ± 0,11	02,40 ± 1,40	1,16 ± 1,34
250	32.46 ± 7.69	7,86 ± 0,37	26,16 ± 0,60	53,06 ± 3,20	04,13 ± 0,15	5,86 ± 0,85
500	62.83 ± 5.51	21,16 ± 1,89	50,46 ± 0,51	89,16 ± 1,37	07,73 ± 0,15	11,00 ± 0,91
750	64.73 ± 0.68	33,86 ± 1,70	73,70 ± 0,10	91,90 ± 0,88	10,40 ± 0,17	14,20 ± 1,81
1000	76.13 ± 3.68	44,23 ± 0,66	88,40 ± 1,82	92,10 ± 0,55	15,53 ± 0,35	22,06 ± 3,07

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± écart type.

À des fins comparatives, nous avons évalué un autre paramètre le IC<sub>50</sub> qui exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% (plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande). Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire. L'antioxydant de synthèse (BHT) a montré une activité antiradicalaire moyennement puissante avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 514.52 mg.L<sup>-1</sup>, cette valeur est supérieure à celles enregistrées par les extraits NUH et NUM (217.03 mg.L<sup>-1</sup>, 499.37 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement) qui ont montré une puissante activité inhibitrice (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Valeurs des  $IC_{50}$  des extraits de *T. numidicus* et du BHT**

	<b>BHT</b>	<b>NUD</b>	<b>NUM</b>	<b>NUH</b>	<b>INF</b>	<b>HE</b>
$IC_{50}$ (mg L <sup>-1</sup> )	514.52	1096.94	499.37	217.03	3219.57	2260.54

Les résultats obtenus lors de la présente étude confirme l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire, en effet les extraits NUH et NUM ont montré des teneurs élevées en polyphénols totaux et ont été également enregistrés comme les extraits qui possèdent la plus grande activité réductrice de DPPH, les mêmes résultats ont été mis en évidence dans un grand nombre des travaux similaires [23-26]

### 3-4-2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Contrairement aux résultats obtenus lors de l'évaluation du potentiel scavenger du radical libre DPPH, l'activité de blocage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui a été estimée par la méthode spectrofluorimétrique en utilisant la lucigénine, a révélé que tous les extraits testés présentaient une forte activité antioxydante avec des valeurs égales ou supérieures à celles des contrôles positifs utilisés : NUH =  $99,860 \pm 0,080\%$ , NUM =  $96,530 \pm 0,550\%$ , et NUD =  $93,560 \pm 0,390\%$ , ce pendant l'huile essentielle (HE) n'a présenté aucune activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène et cela est en accord avec les résultats obtenus précédemment (*Tableau 4 et 5*). Lors de ce test le BHT n'a montré aucune activité de blocage du peroxyde d'hydrogène ( $13,636 \pm 3,920\%$ ) alors que les antioxydants naturels l'acide gallique et l'acide caféique ont présenté de très fortes valeurs inhibitrices ( $98,72 \pm 0,21\%$  et  $96,55 \pm 0,92\%$ , respectivement). Les activités antioxydantes évaluées pour chaque extrait ont été corrélées à la teneur des composés polyphénoliques totaux correspondant mesuré par l'essai Follin-Ciocalteu. Nous avons constaté que les extraits NUH et NUM possédaient les plus fortes teneurs en polyphénols totaux, en effet scavenger de DPPH et de piégeage du peroxyde d'hydrogène. L'huile essentielle testée a présenté des effets antioxydants faibles malgré que nous avons enregistré les plus hautes teneurs en polyphénols ( $965.60$  mg GAEs/gram d'extrait), qui selon nous est attribué la forte proportion relative des monoterpènes contenus dans la composition de cette huile [27].

**Tableau 4 : Effet antioxydant du peroxyde d'hydrogène de quelques contrôles positifs par la méthode fluorimétrique**

<b>Dilutions (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>(%) Antioxydant du BHA</b>	<b>(%) Antioxydant de l'acide gallique</b>	<b>(%) Antioxydant de l'acide caféique</b>
100	-	$88,90 \pm 1,02$	$28,03 \pm 1,85$
250	-	$88,27 \pm 1,10$	$27,17 \pm 3,83$
500	-	$89,85 \pm 1,90$	$44,56 \pm 4,64$
750	-	$91,91 \pm 0,47$	$53,25 \pm 6,00$
1000	$13,63 \pm 3,92$	$98,72 \pm 0,21$	$96,55 \pm 0,92$

- : Non testé

**Tableau 5 :** Effet antioxydant du peroxyde d'hydrogène des extraits de *T. numidicus* par la méthode fluorimétrique

Dilutions (mg L <sup>-1</sup> )	Antioxydant effect (%) NUD	Antioxydant effect (%) NUM	Antioxydant effect (%) NUH	Antioxydant effect (%) INF	Antioxydant effect (%) HE
100	51,29 ± 1,37	59,39 ± 1,09	53,85 ± 3,57	11,220 ± 7,07	36,06 ± 0,32
250	62,47 ± 1,90	71,19 ± 3,18	80,76 ± 2,75	27,200 ± 2,33	37,61 ± 0,86
500	70,75 ± 5,62	85,16 ± 7,05	92,39 ± 0,53	44,100 ± 2,10	46,48 ± 1,86
750	84,24 ± 1,20	90,97 ± 1,00	98,81 ± 0,26	63,090 ± 6,12	62,42 ± 1,42
1000	93,56 ± 0,39	96,53 ± 0,55	99,86 ± 0,08	70,995 ± 0,92	67,84 ± 3,52

#### 4. Conclusion

La présente étude a porté sur l'étude de l'espèce *T. numidicus* qui appartient à la famille de lamiacées, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels. Les résultats obtenus lors de la présente étude ont permis de mettre en évidence par des tests validés les activités anti-radicalaires de différents extraits. Il a été montré que les extraits méthanolique et méthanol-eau ont une très grande activité de piégeage des radicaux libres du DPPH et du peroxyde d'hydrogène. Du fait du potentiel thérapeutique de *T. numidicus*, on pourrait envisager de développer des phytomédicaments standardisés dont la production à partir de la poudre de la plante ne nécessite pas d'équipements particuliers. Des études complémentaires seront nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un phytomédicament. Cette étude pourrait éventuellement être complétée par un bio-guidage de nos extraits. Cela va consister à fractionner les extraits et à purifier les fractions les plus actives et à déterminer la structure chimique du composé responsable de l'effet antioxydant.

#### Références

- [1] - N. BOUGANDOURA, N. BENDIMERAD, *Nat. & Tech.*, (2012) 14-19.
- [2] - M. SUHAJ, *J. Food Comp. Anal.*, 19 (2006) 531–537.
- [3] - M. B. TADHANI, V.H. PATEL and R. SUBHASH, *J. Food Comp. Anal.*, 20 (2007) 323-329.
- [4] - A. J. DUGAS, J. CASTANEDA-ACOSTA, G.C BONIN, K.H PRICE. N.H FISCHES and G.W WINSTON, *J. Nat. prod.* 63 (2000) 31-327.
- [5] - H. ISMAILI, L. MILELLA, S. FKIH-TETOUANI, A. ILIDRISSI, A. CAMPORESE, S. SOSA, G. ALTINIER, R. DELLA LOGGIA and R. AQUINO, *J. Ethnopharm.*, 91 (2004) 31–3.
- [6] - H. CHUN, W. J. JUN, D.H. SHIN, B. S. HONG, H. Y. CHO, H. C. YANG, 2001. *Chem. Pharm. Bull.*, 49 (6) (2001) 762-764.
- [7] - E. STAHL-BISKUP, "Thyme". In: "*Hand Book of Harbs and species*", Ed. CRC press, England (2004).
- [8] - H. WANG, G. J. PROVAN, K. HELLIWELL, *Food Chem.* 87 (2004) 307-311.
- [9] - R. MORALES, *Lagascalía*. 19 (1-2) (1997) 249-261.
- [10] - R. M. HARLEY, S. ATKINS, A.L. BUDANTSEV, P.D. CANTINO, B.J. CONN, R. GRAYER, M.M HARLEY, R. De KOK, T. KRESTOVSKAJA, R. MORALES, A.J. PATON, O. RYDING, T. UPSON, "*Labiatae*" In: "*Kadereif*", Ed. Springer-Verlag, Berlin (2004).

- [11] - E. STAHL-BISKUP and F. SÁEZ, " *Thyme: The Genus Thymus*", Ed. Taylor and Francis, London, Swofford (2002).
- [12] - M. HAZZIT, A. BAALIOUAMER, M. L. FALEIRO and M. G. A. MIGUEL, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 6314-6321.
- [13] - S. DALL'ACQUA, I. CASTAGLIUOLO, P. BRUN, F. DITADI, G. PALÙ and G. INNOCENTI, *Carbo. Res.* (2010) 711-720
- [14] - *Hellenic Pharmacopoeia*, 5<sup>th</sup> ed., National Organization for Medicines of Greece, Chapter 28.12, Athens (2002).
- [15] - A. NIKOKAVOURA, D. CHRISTODOULEAS, E. YANNAKOPOULOU, K. PAPADOPOULOS and A.C. CALOKERINOS, *Talanta*, 84 (2011). 874–880.
- [16] - S. BOUNATIROU, S. SMITI, M.G. MIGUEL, L. FALEIRO, M.N. REJEB, M. NEFFATI, M.M. COSTA, A.C. FIGUEIREDO, J.G. BARROSO, L.G. PEDRO, *Food Chem.* 105 (2007) 146–155.
- [17] - J. KOUAMÉ, C. GNOULA, E. PALÉ, H. BASSOLÉ, I.P. GUISSOUI, J. SIMPORÉ and J.B. NIKIÉMA, *Scie et Tech.*, 32 (2009) 9-23.
- [18] - A. MANSOURI, G. ENNBAREK, E. KOKKALOU, P. KEFALAS, *Food Chem.*, 89 (2005) 411-420.
- [19] - K. LOZ̃IENÉ, P.R. VENSKUTONIS, A. IPAILIENÉ, J. LABOKAS, *Food Chem.*, 103 (2007) 546–559.
- [20] - P. COSTAA, S. GONC, C. GROSSOB, P.B. ANDRADEB, P. VALENTÃO B, M.G. BERNARDO-GILC, A. ROMANOA, *Indust. Crops and Prod.*, 36 (2012) 246-256.
- [21] - M. HAZZIT, A. BAALIOUAMER, A.R. VERÍSSIMO, M.L. FALEIRO, M.G. MIGUEL, *Food Chem.*, 116 (2009) 714-721.
- [22] - F. PANK, A. PFEFFERKORN and H.KRUGER, *Zeitschrift fur Arznei Gewurzpflanz*, 9(2) (2004) 72–79.
- [23] - H. LI, X. WANG, P. LI, Y. LI, H. WANG, *J. Food and Drug Anal.*, 16 (6) (2008) 67-73.
- [24] - G. ANGELOV, L. BOYADZHIEV and S. GEORGIEVA, *Materi. Metho. and Tech.*, 3(1) (2008)143-150.
- [25] - D.P. MAKRIS, G. BOSKOU and N.K. ANDRIKOPOULOS, *Biores. Tech.*, 98 (2007) 2963-2967.
- [26] - B. BOZAN, G. TOSUN, D. OZCAN, *Food chem.*, 209 (2008) 426-430.
- [27] - H. EDZIRI, M. MASTOURI, I. CHERAIF and M. AOUINI, *Nat. Prod. Res.* 24 (2010). 789-796.