



Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.)

H. Talbi¹, A. Boumaza², K. El-mostafa³, J. Talbi⁴, A. Hilali^{1,5}.

¹Laboratoire Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques. Université Hassan I^{er}. Route de Casablanca Km 3,5 BP 539. Settat- Maroc. hayattalbi@yahoo.fr.

³Laboratoire de Biochimie et Neurosciences Faculté des Sciences et Techniques. Université Hassan I^{er}. Route de Casablanca Km 3,5 BP 539. Settat- Maroc.

²Département De Biologie Animale Faculté Des Sciences de la nature et de la vie Université Mentouri-Constantine.

⁴Laboratoire national de la Police scientifique, Casablanca-Maroc. talbija@gmail.com

⁵Institut Supérieur des Sciences de la Santé. Université Hassan I^{er}. Route de Casablanca Km 3,5 BP 539. Settat- Maroc. hilalia@hotmail.com.

Received 25 Sept 2014, Revised 13 Oct 2014, Accepted 13 Oct 2014

Auteur correspondant: E-mail: hayattalbi@yahoo.fr; Tel (00212) 0667896506

Abstract

Nigella sativa L., known by the common name "black cumin" is a medicinal plant from the Ranunculaceae family, widely used in traditional medicine across the Arab world and as a food condiment. In this work aqueous and methanolic extracts were prepared from the seeds of this plant. The quantitative estimation of total flavonoids and phenols by the colorimetric method showed that the extracts are rich in these compounds. Evaluation of antioxidant power was performed using the method of DPPH free radical trapping. The result indicated that the methanol extract showed more antioxidant power ($EC_{50} = 0.64 \pm 0.08$ mg / ml), than the ascorbic acid ($EC_{50} = 0.13879 \pm 0.00112$ mg / ml).

Keywords: *Nigella Sativa* L., flavonoids, antioxidant activity, polyphenols.

Résumé

Nigella Sativa L., connue sous le nom vernaculaire «cumin noir» est une plante médicinale de la famille des Ranunculaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle à l'échelle du monde Arabe et comme condiment alimentaire. Dans le présent travail deux extraits ont été préparés, à partir des graines de cette plante : l'un méthanolique et l'autre aqueux. L'estimation quantitative des flavonoïdes et des phénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que les extraits sont riches en ces composés. L'évaluation du pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH a indiqué que l'extrait méthanolique a montré une bonne efficacité antioxydante ($EC_{50} = 0,64 \pm 0.08$ mg/ml), supérieure a celle enregistrée de l'acide ascorbique ($EC_{50} = 0,13879 \pm 0,00112$ mg/ml).

Mots clés: *Nigella Sativa* L., flavonoïdes, activité antioxydante, Polyphénols.

1. Introduction

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées [1,2]. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une

importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [3]. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [4]. Ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [1]. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des différentes sources telles que les cultures agricoles et horticoles ou les plantes médicinales [5-7].

La *Nigella sativa* est une plante de grande notoriété, surtout à l'échelle du monde Arabe. Sa renommée en tant que plante médicinale et condimentaire dans les pays allant du Proche au Moyen Orient remonte à plusieurs siècles. Elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde [8, 9]. Au Maroc, elle est cultivée ou subspontanée dans les champs et les jardins du Rif et dans les oasis du sud. C'est une dicotylédone appartenant à la famille des Ranunculaceae, utilisée depuis des milliers d'années comme une épice pour la conservation des aliments, ainsi en tant qu'élément protecteur et curatif contre plusieurs troubles, et connue pour avoir de nombreuses propriétés médicamenteuses dans la médecine traditionnelle [10]. Cette plante a été largement étudiée et de nombreuses propriétés biologiques favorables ont été signalées comme antioxydant [11], antimutagène [12], hépatoprotecteurs [13], anti-corrosion [14] et les effets anti-inflammatoires [15].

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et la valorisation des substances bioactives telles que les substances naturelles douées d'activité antioxydante qui présentent un intérêt dans le domaine de la bio pharmacologie. L'objectif principal de ce travail est d'évaluer in vitro l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des graines de *Nigella Sativa* selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

2. Matériel utilisé

2.1. Les graines de *Nigella sativa* L.

Les graines constituent la partie utilisée de cette plante dans cette étude. Elles ont été cultivées dans la région d'Arfoud (Maroc). Les graines ont été broyées dans un mixeur pour l'obtention d'une poudre qui est par la suite conservée jusqu'au moment d'utilisation.

2.2. Réactifs chimiques

Les réactifs utilisés sont: DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide ascorbique, l'acide gallique, $AlCl_3$ (trichlorure d'aluminium), la quercétine, ces produits Proviennent tous de Sigma, le solvant utilisé étant le méthanol.

3. Methods

3.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées et broyées sont mises à macérer dans un mélange méthanol/eau (7 :3 V/V) à un rapport de 1/10 (P/V), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-évapour (BÜCHI). Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

3.2. Préparation de l'extrait aqueux:

Une quantité de 5mg de la poudre des graines de *Nigella sativa* est mise à macérer dans 10 ml d'E.D à un rapport de 1/2 (P/V), pendant 10 min à température ambiante. L'extrait aqueux est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur grisâtre, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

3.3. Dosage des phénols Totaux:

1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

3.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium [16] est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Nigella sativa*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

3.5. Tests, in vitro, de l'activité antioxydante de l'extrait de la *Nigella sativa*., par l'effet scavenger du radical DPPH.

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri, A., et al (2005) [17]. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [18]. Brièvement, 100 µl des solutions d'extraits ont été ajoutés à 1300 µl DPPH (0.004% préparée dans du méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 µl de méthanol avec 1300µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 3fois. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = \frac{[(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100}{1}$$

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

4. Résultats et Discussion

4.1. Teneurs en phénols totaux.

La détermination de la teneur en phénols totaux dans les deux extraits de *Nigella Sativa* L. est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu [19] qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO₄²⁻) phosphomolybdique (MoO₄²⁻) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [20]. Les teneurs ont été rapportées en µg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait du matériel végétal. Les résultats montrent que la teneur moyenne en phénols totaux de l'extrait aqueux est de (163,33±10,26 µg/mg) alors que celle de l'extrait méthanolique est de (163,33±3,05 µg/mg) (Tableau 1). Les résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique sont représentés dans la Figure 1.

Tableau 1: Dosage des polyphénols totaux dans les extraits des graines de *Nigella sativa*.

Extraits	Teneur en phénols Totaux ^a
Méthanolique	163,33±3,05
Aqueux	163,32±10,26

^aµg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

Les valeurs des phénols totaux dans les deux extraits sont plus élevées que les teneurs trouvées par [21] ($27,07 \pm 0,58 \mu\text{g}/\text{mg}$) et par [22] ($23,81 \pm 2,67 \mu\text{g}/\text{mg}$) dans l'extrait aqueux de la nigelle. De même la valeur du dosage des polyphénols de l'extrait méthanolique sont beaucoup plus élevée que celle trouvée par [21] ($33,64 \pm 0,34 \mu\text{g EAG}/\text{mg}$). Cependant les valeurs notées dans la présente étude sont inférieures que les teneurs enregistrées par [22] ($191,06 \pm 23,34 \mu\text{g}/\text{mg}$) dans l'extrait du chloroforme de la *Nigelle Sativa L.*,

4.2. Teneurs en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) pour chaque extrait a été rapportée en μg équivalent de quercetine /mg d'extrait. Les résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique sont représentés dans la Figure 2.

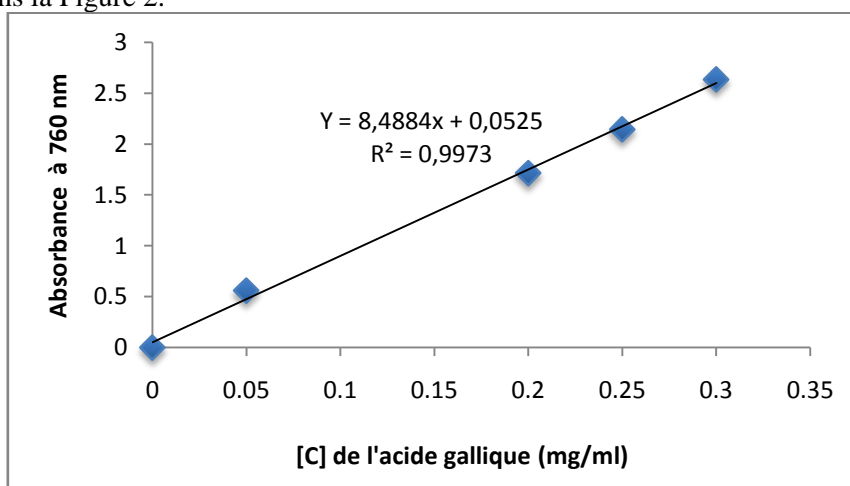


Figure 1: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

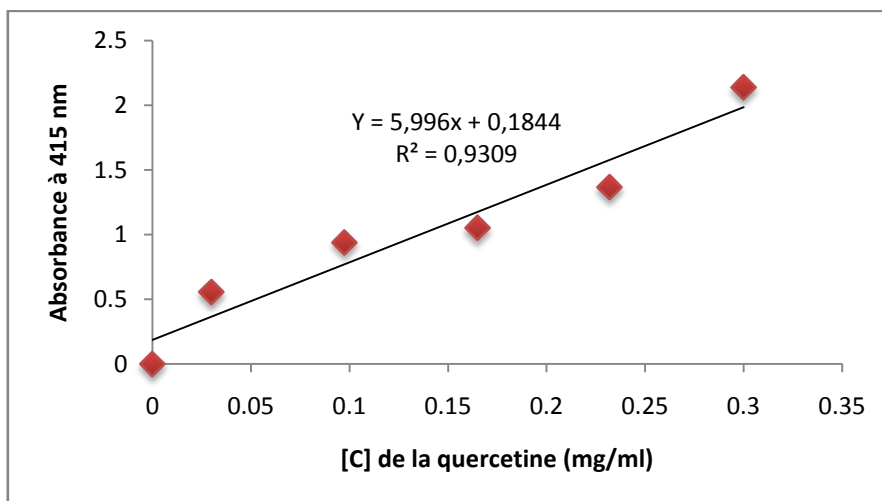


Figure 2: La courbe d'étalonnage de la quercetine .

Les résultats de dosage des flavonnoïdes révèlent pour les deux extraits méthanolique et aqueux les valeurs suivants $266 \pm 43,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ et $169,26 \pm 5,78 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Tableau 2). A partir de ces données, on peut déduire que les flavonoïdes représentent la fraction majoritaire par rapport aux phénols totaux dans les deux extrait méthanolique et aqueux. Ceci concorde avec les résultats trouvés par [21] et [22], qui ont trouvé également que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes sont plus élevées dans l'extrait méthanolique que l'extrait aqueux. De même, le taux des flavonoïdes dans les deux études est relativement comparable pour les extraits (l'extrait méthanolique, l'extrait Hexanique et l'extrait aqueux).

Tableau 2: Dosage des flavonoïdes dans les extraits des graines de *Nigella sativa*.

Extraits	Teneur en flavonoïdes ^b
Méthanolique	266±43,4
Aqueux	169,26±5,78

^bµg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

4.3. Activité antioxydante

Test de piégeage du radical libre DPPH : L'activité antioxydante de l'extraits méthanoliques aqueux de *Nigella Sativa L.* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm (Figure 3). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires [23].

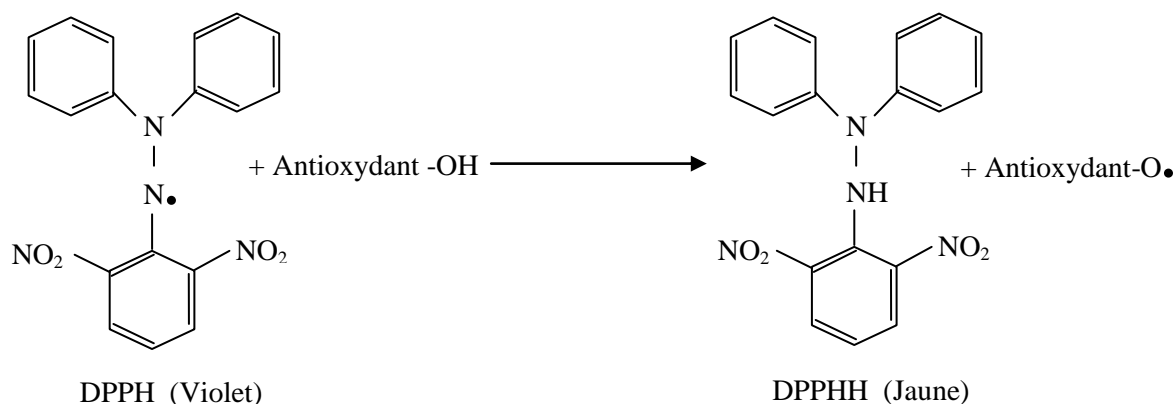


Figure 3. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Les résultats présentés dans la Figure 4 de l'activité antiradicalaire de l'extraits méthanolique des graines de *Nigella Sativa L.*, montrent un IC50% (Concentration inhibant 50% de la réaction) = 0,64 ± 0.08mg/ml, qui est plus élevée que celle enregistrée pour l'acide ascorbique qui est de: IC50% = 0,13879 ± 0,00112 mg/ml (Figure 5).

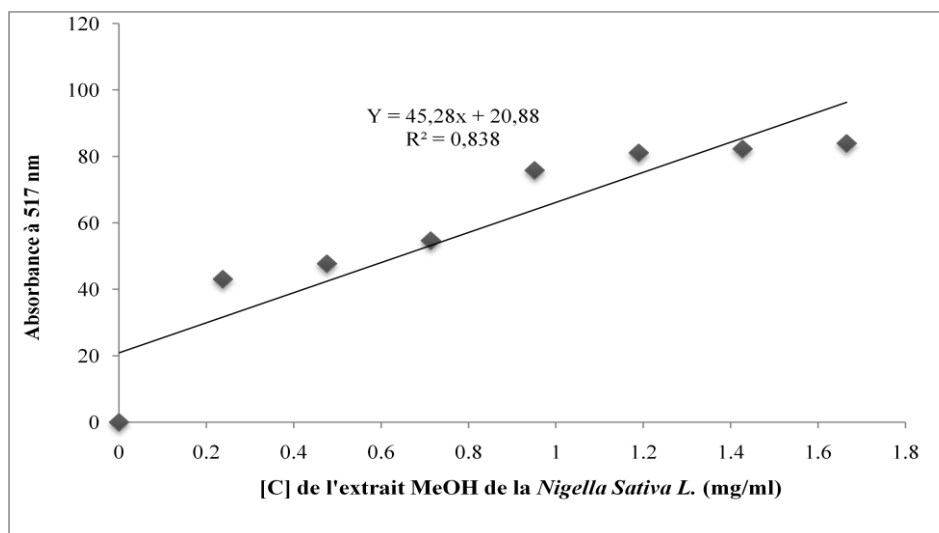


Figure 4: Pouvoir reducteur de l'extrait Methanolique des graines de la *Nigella Satival L.*

Selon les résultats trouvés, l'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, leur EC50 est de 160 mg/ml ce qui est largement supérieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 34,69 mg/ml. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, la tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène [24]. Les polyphénols contenus dans les extraits de *Nigella Sativa L.* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits d'autant plus que l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique trouvé est toujours supérieure que celle de l'extrait aqueux [25]. Ceci est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *Nigella Sativa L.* qui ont mis en évidence une forte activité antioxydante de l'extrait alcoolique, de l'huile, de l'huile essentielle et de la Thymoquinone TQ extraits des graines de la Nigelle. Les mêmes études montrent que la *Nigella Sativa L.*, est une espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante, anticancéreuse et antimicrobienne [25].

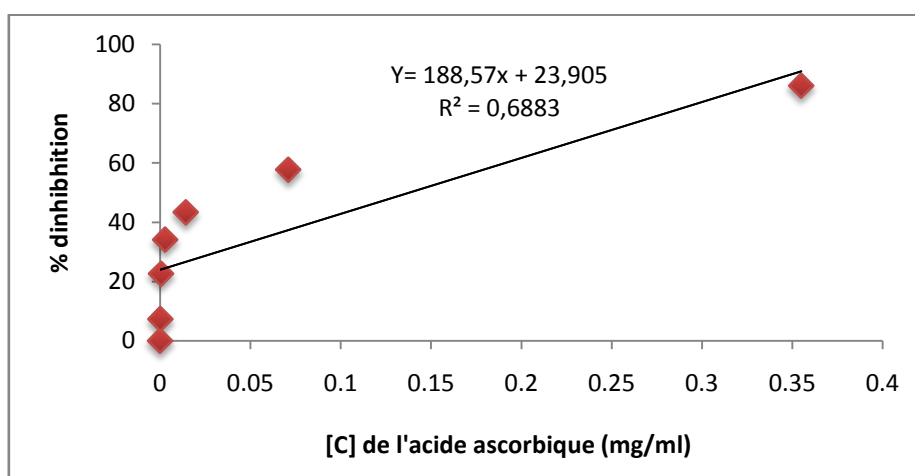


Figure 5: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Conclusion

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Nigella Sativa L.*, selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante modérée. Cet extrait pourrait donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques. Il convient d'attirer l'attention sur le fait que ces résultats sont obtenus in vitro seulement. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils permettent ainsi de rechercher directement l'activité antioxydante ou prooxydante des composés ou des extraits in vivo pour corréliser les résultats observés dans les deux cas.

References

1. Suhaj, M., Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Compos. and Analys.* 19 (2006) 531-537.
2. Tadhani, M.B., Patel, V.H., et Subhash, R., In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. and Analys.* 20 (2007) 323-329.
3. Koechlin-Ramonatxo C., Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way of nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. et Métab.* 20 (2006) 165-177.
4. Vârban D.I., Duda M., Vârban R., et Muntean S., Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis L.* *Culture.Bulletin UASVM Agriculture.* 66(2) (2009) 225- 229.
5. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. and Food Chemist.* 53 (2005) 1841-1856.

6. Marc Fr., Davin A., Deglène-Benbrahim L., et Ferrand C., Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: médecine sciences.* 20(4) (2004) 458-463.
7. Sanchez-Moreno C., Methods used to evaluate the free scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. and Technol. Inter.* 8(3) (2002) 121-137.
8. Antuono, F., Hamaza, K., Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta medica.* 27 (2002) 142 -149.
9. Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal El-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H., Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chem. toxicol.* 26 (2003) 87-98.
10. Chopra R, Nayar S, Chopra I, In: *Glossary of Indian medicinal plants.* New Delhi, India: CSIR (1956) 175.
11. Suboh, S.M., Bilito, Y.Y., Aburjai, T.A., Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother. Res.* 18 (2004) 280–284.
12. Bourgou S., Ksouri R., Bellila, A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B., Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies* 331(2008) 48.
13. Kanter, M., Coskun, O., Budancamanak, M., Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J. Gastroenterol.* 11, (2005) 6684–6688.
14. Emad M., Al-Rasheedi M., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (1) (2015) 201-206.
15. Khadera, M., Bresgena, N., Eckla, P.M., Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 127 (2010) P: 319–324.
16. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch.* 46 (1996) 1086-1089.
17. Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemist.* 89 (2005) 411-420.
18. Sanchez-Moreno, C., Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Inter. J. Food Sci. and Technol.* 8 (2002) 121-137.
19. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemist.* 102 (2007) 771-776.
20. Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M., Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. and Food Chemist.* 53 (2005) 1370-1373.
21. Meziti, A., Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude in vitro et in vivo. *Mémoire de magistère.* Université el-haj lakhdar batna. Département des Sciences Biologiques. (2009) P, 41-49.
22. Boudiaf, K., Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. *Thèse de magistère.* Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie (2006).
23. Majhenic L., kergel M.S., et Knez Z., Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemist.* 104 (2007) 1258–1268.
24. De Pooter H.L. et Schamp N., Comparaison de la volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : *Progress in essential oil research.* Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. (1986) 139-150p.
25. Fabienne, O.L., La Nigelle, une épice d'intérêt médicinal. *Thèse.* (2013) P, 44-45.

(2015) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>