

Mesure de l'activité antiradicalaire du jus et des peaux d'oranges tunisiennes par le radical DPPH

Jamilla Kalthoum CHERIF^{a*}, Ines M'RABET^{b,c}, Mourad EL HABIRI^b, Rym ABIDI^c, Anne-Marie ALBRECHT-GARY^b

^a Institut préparatoire aux études d'ingénieurs de Tunis, 1008 Monfleury, Tunis, Tunisie

cherif-j2000@yahoo.fr

^b Faculté des sciences de Bizerte, Université du 7 novembre à Carthage, 7021 Jarzouna-Bizerte, Tunisie

^c École Chimie Polymère Matériaux, Laboratoire de physico-chimie bioinorganique, UMR 7509 CNRS, 25, rue Becquerel, 67200 Strasbourg, France

Measurement of the antiradical efficiency of Tunisian orange juice and skins using the DPPH radical.

Abstract — Introduction. Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) is a source of bioactive compounds: C and E vitamins, and flavonoids. To develop waste of orange skins, we measured juice and dry and fresh skin antiradical activity of five Tunisian orange tree varieties to assess their concentration in antioxidant potential usable in industry. **Materials and methods.** The antiradical capacity of juice and skin extracts was evaluated while following, according to time, the disappearance of the DPPH• stable radical by spectrophotometry of absorption visible-UV at 515 nm. The antiradical activity measured was expressed in effective concentration (CE₅₀). The determination of the vitamin C V₅₀ volume of an ascorbic acid solution with a known concentration and of a juice extract and dry and fresh orange skin V₅₀ volume made it possible to consider the molar and mass concentration of equivalent vitamin C in the extracts. **Results.** Orange juices contain approximately 400 mg·L⁻¹ of equivalent vitamin C. In the case of very fast reactions with radical DPPH•, the totality of the antiradical activity can be allotted to the vitamin C. In the case of slower reactions, in addition to the vitamin C, polyphenols (citroflavonoïdes) contribute to the total antioxidant activity. The fresh skin methanolic extracts contain more vitamin C than the dry skin extracts. **Conclusion.** Orange skins constitute immense sources of antioxidants which can find applications in various fields: agro-industrial, cosmetic and pharmaceutical, among others.

Tunisia / *Citrus sinensis* / fruits / orange juice / peel / waste utilization / natural antioxidants / ascorbic acid

Mesure de l'activité antiradicalaire du jus et des peaux d'oranges tunisiennes par le radical DPPH.

Résumé — Introduction. L'orange (*Citrus aurantium sinensis*) est une source de composés bioactifs : vitamines C et E, flavonoïdes (flavanes et flavanones glycosylés et polyméthoxylés). Pour valoriser les déchets des peaux d'orange, nous avons mesuré l'activité antiradicalaire du jus et des peaux sèches et fraîches de cinq variétés d'orangers de Tunisie afin d'évaluer leur concentration en composés antioxydants utilisables dans l'industrie. **Matériel et méthodes.** Le pouvoir antiradicalaire du jus et des extraits des peaux a été évalué en suivant, en fonction du temps, la disparition du radical stable DPPH• par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à 515 nm. L'activité antiradicalaire mesurée a été exprimée en concentration efficace (CE₅₀). La détermination du volume V₅₀ de vitamine C d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue et d'un volume V₅₀ des extraits de jus et des peaux sèches et fraîches d'orange a permis d'estimer la concentration molaire et massique de vitamine C équivalente dans les extraits. **Résultats.** Les jus d'orange contiennent environ 400 mg·L⁻¹ d'équivalent de vitamine C. Dans le cas de réactions très rapides avec le radical DPPH•, la totalité de l'activité antiradicalaire peut être attribuée à la vitamine C. Dans le cas de réactions plus lentes, en plus de la vitamine C, ce sont les polyphénols (citroflavonoïdes) qui contribuent à l'activité antioxydante totale. Les extraits méthanoliques des peaux fraîches (flavédo) contiennent plus de vitamine C que les extraits de peaux sèches. **Conclusion.** Les peaux d'oranges constituent d'immenses sources d'antioxydants qui peuvent trouver leur application dans différents domaines : agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et autres.

Tunisie / *Citrus sinensis* / fruits / jus d'orange / pelure / utilisation des déchets / antioxydant naturel / acide ascorbique

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 16 décembre 2004

Accepté le 29 octobre 2005

Fruits, 2006, vol. 61, p. 99–107

© 2006 Cirad/EDP Sciences

All rights reserved

DOI: 10.1051/fruits:2006008

www.edpsciences.org

RESUMEN ESPAÑOL, p. 107

1. Introduction

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence le lien entre un régime riche en fruits et légumes et une diminution du risque de maladies cardiovasculaires et de certaines formes de cancers [1–6]. Des études ont montré que ce sont les antioxydants présents dans ces fruits et légumes qui participent aux effets protecteurs [7, 8].

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires [9–12]. Ils constituent un ensemble de molécules très répandues dans le règne végétal [13–15], en particulier chez les plantes supérieures où ils se retrouvent dans les racines, les feuilles, les fleurs et les fruits.

Depuis quelques années de nombreuses recherches ont été consacrées aux polyphénols et à leur rôle bénéfique pour la santé humaine. Les polyphénols sont des agents réducteurs [16–18] comme d'autres composés tels que la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes. Ces puissants antioxydants sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions extérieures (pollutions diverses, infections, etc.) [19–21]. Les polyphénols peuvent renforcer nos défenses naturelles contre le stress antioxydant en protégeant les constituants tissulaires [16, 22–25]. Ils peuvent également agir comme chélateurs d'ions métalliques pro-oxydants, comme le fer et le cuivre, et inhiber la production des radicaux libres [26–28].

Les polyphénols sont capables d'empêcher l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoproteins* ou LDL) [29] et pourraient de ce fait protéger l'organisme contre les infarctus du myocarde ou l'athérosclérose coronarienne qui sont associés aux taux élevés de cholestérol au niveau des LDL circulant dans le sang. Toutefois cette action démontrée par des tests *in vitro* ou *ex vivo* reste encore à être prouvée *in vivo* chez l'homme. Les polyphénols peuvent également jouer un rôle d'antimutagène, d'anti-inflammatoire, d'antimicrobien, d'antitumorale ou d'antivirale [7, 22, 30–34].

L'orange constitue une source de régime alimentaire riche en composés bioactifs. En

plus de la vitamine C et E et des caroténoïdes, l'orange contient des composés polyphénoliques [35, 36] qui regroupent les flavonoïdes et plus précisément des flavanones et des flavones glycosylées et polyméthoxylées. Malterud et ses collaborateurs ont pu isoler neuf flavanones des peaux d'oranges, l'héspéridine étant la flavanone majoritaire [37].

La production annuelle d'oranges en Tunisie a varié de $(210 \text{ à } 240) \times 10^3$ t entre 1995 et 2003. Près de la moitié de cette production a concerné la variété Maltaise [38]. L'industrie de l'orange tunisienne étant orientée vers la production de jus et de nectar d'oranges, de très gros tonnages de déchets sont produits.

Afin d'évaluer la possibilité de recycler les déchets issus de l'industrie de l'orange tunisienne, nous avons mesuré l'activité antiradicalaire des fruits de cinq variétés d'oranges par une méthode spectrophotométrique impliquant le radical DPPH[•] en milieu méthanolique [39, 40]. Puis nous avons évalué les teneurs en vitamine C des fruits des variétés étudiées.

2. Matériel et méthodes

2.1. Solvants et réactifs

Au cours de nos expérimentations, l'eau permutée et le méthanol ont été utilisés comme solvants d'extraction.

L'eau permutée a été préparée à partir d'eau osmosée, filtrée et purifiée sur deux types de colonnes : deux colonnes échangeuses d'ions (Bioblock Scientific R3-83002 et M3-83006) et une colonne à base de charbon actif (Bioblock Scientific ORC-83005).

Le méthanol de qualité spectroscopique (Merck, SeccoSolv[®], p.a.) a été longuement dégazé avec de l'argon par passage préalable de ce gaz sur une cartouche Oxiclear (Labclear, DGP-250-R1) afin d'éliminer toute trace d'oxygène. Le radical DPPH[•] (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,3 g·mol⁻¹, Sigma, France, 90 %) et l'acide L(+) ascorbique (C₆H₈O₆, M = 176,13 g·mol⁻¹, Merck, Allemagne) ont été utilisés sans purification ultérieure.

Tableau I.

Pourcentage en matière sèche des peaux d'oranges des différentes variétés d'orangers, étudiées pour mesurer leur activité radicalaire par le radical DPPH (Tunisie, valeur moyenne pour dix oranges).

Variété	Masse du fruit (g)	Masse de peaux fraîches (g)	Masse de peaux par rapport à la masse d'un fruit (%)	% matière sèche dans les peaux fraîches	% matière sèche dans les peaux sèches
Chemi	206,5	69,62	33,71	27,0	83,0
Maltaise 1	188,5	70,63	37,47	25,4	81,0
Maltaise 2	181,5	67,5	37,19	27,0	83,0
Orange douce	177,0	83,0	46,89	26,0	80,8
Thomson	223,5	98,0	43,84	26,0	73,0

2.2. Matériel végétal et échantillonnage

Nos travaux ont porté sur l'étude des propriétés du jus des fruits de cinq variétés d'orangers [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] couramment exploitées en Tunisie :

- deux variétés de Maltaise : Maltaise 1, orange destinée à la fabrication du jus, et Maltaise 2, orange de bouche,
- trois autres variétés rencontrées en vergers tunisiens : Chemi, orange douce et Thomson.

Les fruits ont été cueillis à maturation. Pour effectuer nos mesures, dix oranges de chacune des variétés étudiées, de masses comprises entre (110 et 220) g (*tableau I*), ont été lavées à l'eau permutée, sectionnées en deux et rapidement pressées à la main. Le jus d'orange frais (400 mL pour chaque variété) a été stocké à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

2.3. Préparation des extraits de jus

Au moment des dosages, le jus d'orange a été centrifugé deux fois de suite à la vitesse de $1500\text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse Beckman Microfuge ETM. La solution limpide obtenue a été utilisée sans purification ultérieure.

2.4. Préparation des extraits des peaux sèches et fraîches d'orange

La procédure utilisée pour extraire les composés phénoliques des peaux fraîches et sèches des oranges a été empruntée à la littérature [41]. Les peaux, dont l'albédo, ont

été séparées des oranges fraîches. La moitié des peaux fraîches (environ 400 g) a été séchée en étuve à $30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 3 jours jusqu'à obtention de 25 % du poids des peaux de départ. Ces peaux séchées et les peaux conservées fraîches ont été broyées finement à l'aide d'un mixeur électrique (Mixeur Minipimer professionnel MR 5550 M CA, Braun).

Pour préparer les extraits analysés, 50 mL d'eau à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mL d'eau à $+90\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 60 mL de méthanol ont été ajoutés successivement à une prise d'essai de 5 g de peaux sèches (environ 20 % d'eau) ou de peaux fraîches (environ 75 % d'eau et de volatils) de chacune des variétés d'orangers testées. Après agitation vigoureuse de quelques minutes, les mélanges ont été laissés au repos pendant 3 jours à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avant chaque analyse, les solutions ont été centrifugées deux fois de suite à la vitesse de $1500\text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 min. La solution surnageante limpide a été utilisée telle quelle sans purification ultérieure.

2.5. Préparation des solutions d'acide ascorbique et de DPPH

Une solution d'acide ascorbique de concentration voisine de $8\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ainsi qu'une solution de DPPH de concentration de l'ordre de $10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été préparées dans du méthanol préalablement dégazé par de l'argon. La solution du DPPH a été conservée à l'abri de la lumière et à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentration analytique a été déterminée par spectrophotométrie ($\epsilon^{515} = 12\ 500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, *figure 1*) [39].

Figure 1.
Spectres d'absorption d'une solution de DPPH• à $9,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans le méthanol, $[(25,0 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}]$.

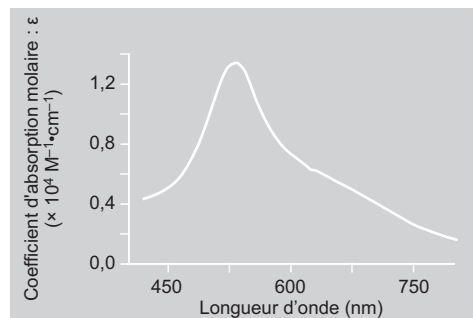
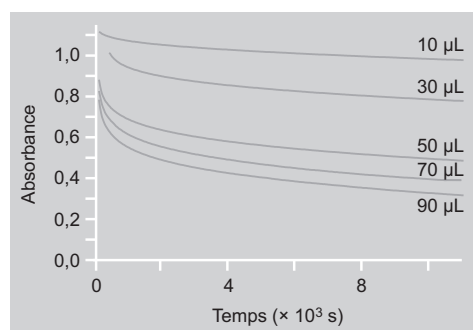


Figure 2.
Mesure de l'absorbance à 515 nm du radical DPPH• à $9,93 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, en fonction du temps, pour des volumes d'extraits de peaux séchées d'oranges de variété Maltaise [solvant : méthanol ; $(25,0 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$].



2.6. Mesure du pH

Le pH a été mesuré au moyen d'une micro-électrode de verre combinée (Metrohm 6.0234.500, Long Life) et d'un millivoltmètre (Tacussel ISIS 2000). L'électrode de référence Ag/AgCl a été remplie par une solution de NaCl 0,1 M (Fluka, p.a.).

2.7. Mesure de l'activité antioxydante

Le pouvoir antiradicalaire des jus d'orange ou des extraits de peaux fraîches ou sèches a été évalué en suivant la disparition, en fonction du temps, du radical DPPH• par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à 515 nm. Le nombre de radicaux libres réduits par une molécule d'antioxydant a été calculé après établissement de l'état stationnaire de la réaction.

Afin de déterminer la concentration analytique de la solution de DPPH, 2 mL ont été introduits dans une cellule en quartz (Hellma) de trajet optique 1 cm, thermostatée à $(25,0 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$ (thermostat Haake FJ). Un spectre d'absorption UV-visible a été enregistré de

(400 à 800) nm au moyen d'un spectrophotomètre Kontron (Uvikon 941) (figure 1).

D'après la loi de Beer-Lambert :

$$(\text{DPPH})_t = (A_t^{515} / l \times \epsilon^{515}) \text{ (équation 1),}$$

où $(\text{DPPH})_t$ est la concentration molaire du radical DPPH• dans le méthanol à un instant t ; ϵ^{515} est le coefficient d'absorption molaire à 515 nm et égal à $12\,500 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; l est le trajet optique mesuré en cm et A_t^{515} est l'absorbance de la solution de DPPH• à 515 nm.

À l'aide d'une microburette à piston (Eppendorf), nous avons ajouté 2 mL de DPPH à différents volumes d'échantillon : échantillons de (2 à 20) µL pour les jus et de (10 à 100) µL pour les extraits des peaux d'orange. Le mélange a été rapidement agité avant mesure du déclin de l'absorbance à 515 nm en fonction du temps, jusqu'à obtention d'un état stationnaire.

Pour mettre en évidence la contribution des divers composés phénoliques dans l'activité antioxydante des extraits, nous avons mesuré, par spectrophotométrie UV-visible, la diminution de l'absorbance en fonction du temps du radical DPPH• réagissant avec différents volumes d'extraits de peaux dans une gamme comprise entre (10 et 90) µL, jusqu'à obtention d'un état stationnaire. Cet état stationnaire a été atteint au bout d'environ 9000 s (figure 2). Toutes les séries d'expériences ont été reproduites trois fois et les résultats sont donnés avec un intervalle de confiance de 95 % (3σ).

2.8. Calcul de l'activité antioxydante

En présence d'un antioxydant, le DPPH• se transforme plus au moins rapidement en diphénylpicrylhydrazine (DPPH_2), faiblement colorée en jaune par captation d'un hydrogène de l'antioxydant (figure 3).

La concentration efficace CE_{50} correspond à la concentration en antioxydant pour laquelle la diminution d'absorbance à l'état stationnaire atteint 50 % de l'absorbance initiale d'une solution de DPPH• de même concentration mais sans antioxydant [39]. La valeur de CE_{50} , exprimée en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, a été déterminée graphiquement à partir de plusieurs mesures expérimentales du pourcentage de DPPH• restant, pour diverses

concentrations en antioxydant une fois l'état stationnaire atteint.

Le pourcentage de DPPH[•] restant après la réaction radicalaire conduite avec un volume V d'antioxydant a été déterminé par l'expression suivante [39] :

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = [(A_{\infty} / A_{\infty}^0) \times 100] \text{ (équation 2).}$$

A_{∞}^0 est l'absorbance d'une solution témoin de DPPH[•] et A est l'absorbance finale d'une solution de DPPH[•] en présence d'un volume V d'antioxydant.

La concentration efficace ou concentration analytique d'antioxydant CE est défini par :

$$\text{CE} = [(\text{AH})_0 \times (V / V_{\text{tot}})] \text{ (équation 3).}$$

$(\text{AH})_0$ est la concentration initiale en antioxydant ; V_{tot} est le volume total tel que $V_{\text{tot}} = V_1 + V$; V_1 est le volume de la solution de DPPH[•] et V est le volume de la solution de l'antioxydant ajouté (V très inférieur à V_1 car $V \approx 10^{-1} V_1$).

Nous avons calculé, pour la vitamine C, le pourcentage de DPPH restant ainsi que la concentration efficace. Le pourcentage du DPPH et la CE ont été calculés d'après les équations 2 et 3 (figure 4).

Nous avons également déterminé la puissance antiradicalaire PAR (en moles de DPPH[•] par moles d'antioxydant) de la vitamine C, mesurée par :

$$\text{PAR} = [(\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{tot}} / \text{CE}_{50}] \text{ (équation 4).}$$

Dans des conditions expérimentales identiques de concentration en radical DPPH[•], nous avons mesuré un V_{50} de vitamine C d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue [$(\text{Vit C})_0 \approx 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$] et un V_{50} d'un extrait de jus (figure 5) ou de peau de fruit de concentration en vitamine C inconnue. La détermination de ces deux données et le calcul du nombre de moles n_{50} d'une solution de vitamine C de concentration connue nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH[•] nous a permis d'estimer la concentration molaire et massique de vitamine C équivalente dans les échantillons selon les équations 5 à 7 :

$$n_{50} = V_{50} (\text{vit C}) \times (\text{vit C})_0 \text{ (équation 5),}$$

$(\text{vit C})_{\text{équiv molaire}}$ dans le jus de fruit = n_{50} / V_{50} du jus (équation 6),

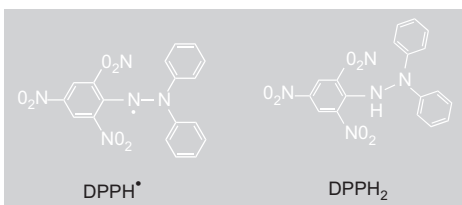


Figure 3. Structures chimiques du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) et de sa forme réduite, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH₂).

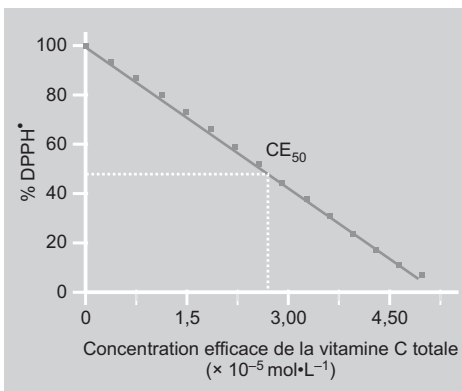


Figure 4. Pourcentage de DPPH[•] consommé en fonction de la concentration efficace CE de la vitamine C [solvant : méthanol ; $(\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{tot}} = 1,04 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $(25,0 \pm 0,2) \text{ }^{\circ}\text{C}$].

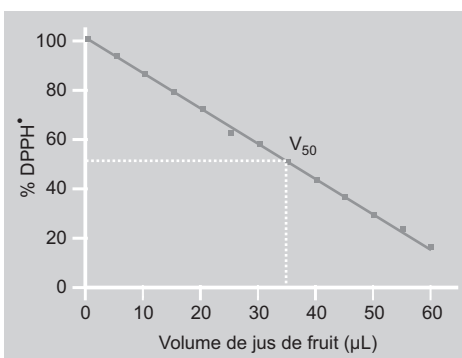


Figure 5. Pourcentage de DPPH[•] consommé en fonction du volume de jus d'orange ajouté. Extrait préparé à partir de la variété Orange douce [solvant : méthanol ; $(\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{tot}} = 9,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $(25,0 \pm 0,2) \text{ }^{\circ}\text{C}$].

$(\text{vit C})_{\text{équiv massique}}$ dans le jus de fruit = $(\text{vit C})_{\text{équiv molaire}} \times M_{\text{vitam C}}$ (équation 7),

où $M_{\text{vitam C}}$ est la masse molaire de la vitamine C.

$(\text{vit C})_0$ est la concentration initiale d'une solution de vitamine C de concentration connue [$(\text{vit C})_0 \approx 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$] ; $V_{50} (\text{vit C})$ est le volume en μL de cette solution de vitamine C nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH[•] ; n_{50} est le nombre de moles de la solution de vitamine C de concentration $(\text{vit C})_0$ nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH[•] ; V_{50} du jus est le volume (μL) d'un extrait d'oranges (jus, extrait de peaux fraîches ou sèches) de concentration inconnue nécessaire pour réduire 50 % des

Tableau II.

pH mesuré dans les différents jus d'oranges extraits des fruits de cinq variétés tunisiennes étudiées pour mesurer leur activité radicalaire par le radical DPPH.

Variété	pH
Chemi	3,54
Maltaise 1	3,36
Maltaise 2	3,32
Orange douce	4,20
Thomson	4,10

Tableau III.

Teneur en vitamine C en équivalent molaire ou massique dans différents extraits de jus provenant de cinq variétés tunisiennes étudiées pour mesurer leur activité radicalaire par le radical DPPH.

Variété	[Vitamine C] _{équival molaire} × 10 ⁻³ (mol·L ⁻¹) 3 σ	[Vitamine C] _{équival massique} (mg·L ⁻¹) 3 σ
Chemi	2,70	476 ± 96
Maltaise 1	2,65	466 ± 34
Maltaise 2	2,22	390 ± 10
Orange douce	1,51	267 ± 112
Thomson	2,71	478 ± 160

Tableau IV.

Teneur en vitamine C (en équivalent massique) dans différents extraits de peaux fraîches et sèches provenant de cinq variétés tunisiennes étudiées pour mesurer leur activité radicalaire par le radical DPPH.

Variété	Peaux fraîches	Peaux sèches
	[mg·100 g ⁻¹ matière sèche (3 σ)]	
Chemi	209 ± 9	195 ± 55
Maltaise 1	240 ± 55	204 ± 34
Maltaise 2	191 ± 29	170 ± 34
Orange douce	236 ± 46	223 ± 15
Thomson	161 ± 24	146 ± 101

radicaux DPPH[•] ; (vit C)_{équival molaire} est la concentration en vitamine C équivalente (en mol·L⁻¹) dans les extraits d'oranges ; (vit C)_{équival massique} est la concentration en

vitamine C équivalente (mg·L⁻¹) dans les extraits d'oranges.

2.9. Traitement des données

Pour déterminer la concentration efficace à 50 % pour la vitamine C, les données ont été traitées par une méthode des moindres carrés linéaires (MicrocalTM OriginTM version 5.0) [42].

3. Résultats et discussion

Pour les différentes solutions d'acide ascorbique testées, nous avons vérifié que la puissance antiradicalaire PAR était égale à 3,8 ± 0,7 moles de DPPH[•] par moles d'antioxydant. Cette valeur nous a permis de comparer l'efficacité des divers substrats analysés.

La vitamine C est majoritairement présente sous forme d'acide ascorbique dans les différents extraits d'oranges pour lesquels le pH mesuré a varié de 3,32 à 4,20 selon la variété (*tableau II*). Dans cette zone de pH acide, les antioxydants (vitamine C et citroflavonoïdes) sont présents sous forme protonée.

Pour les différentes variétés d'orange étudiées, les teneurs équivalentes de vitamine C des jus ont été comprises entre (267 et 478) mg·L⁻¹ (*tableau III*). Dans le domaine d'incertitude donné, les taux de vitamine C des oranges douces et Thomson se recouvrent, néanmoins les oranges douces présentent les plus faibles teneurs en vitamine C (267 ± 112) mg·L⁻¹ et le pH le plus élevé (pH = 4,20).

Les extraits méthanoliques des peaux sèches ont révélé des concentrations en acide ascorbique plus faibles que ceux des peaux fraîches (*tableau IV*). Pour les peaux sèches, les concentrations en vitamines C ont varié de (170 à 223) mg pour 100 g de matière sèche, les oranges Maltaise 2 ayant les concentrations les plus faibles et les oranges douces, les plus fortes. Les peaux fraîches ont présenté des concentrations en vitamine C variant de 191 mg·100 g⁻¹ de matière sèche pour les oranges de la variété Maltaise 2 à 236 mg·100 g⁻¹ de matière

sèche pour les oranges douces. Ces résultats suggèrent que les peaux perdraient une certaine quantité de vitamine C sous l'effet du séchage. Cela est en accord avec les résultats obtenus par Higashi-Okai et ses collaborateurs [41].

Nous avons cherché également à évaluer la contribution des citroflavonoïdes dans l'activité antiradicalaire des extraits de peaux séchées de la variété Maltaise vis-à-vis du radical DPPH[•]. Supposant que la vitamine C réagit avec le radical DPPH[•] en moins de 30 s, nous pouvons penser que les cinétiques lentes de réactions radicalaires pourraient impliquer d'autres substrats d'origine polyphénolique. L'analyse de l'évolution dans le temps de l'absorbance d'un mélange de DPPH[•] avec un extrait de peaux sèches de la variété Maltaise (*figure 2*) nous conduit à remarquer que l'état stationnaire n'est atteint qu'au bout de plusieurs heures, tandis que la réaction est très rapide avec les jus d'orange.

Le traitement graphique issu des équations 5 à 7 nous a permis de déterminer des volumes efficaces à 50 % pour les réactions rapides et lentes de réaction entre les radicaux DPPH[•] et les extraits méthanoliques de peaux sèches de la variété maltaise (*figure 6*).

Nous obtenons ainsi des valeurs de V_{50} de l'ordre de 125 μL et 40 μL qui correspondent respectivement aux réactions radicalaires qui impliquent la vitamine C (réactions rapides) et les dérivés polyphénoliques (réactions lentes).

Ces résultats suggèrent que la vitamine C contenue dans les peaux d'oranges constituerait le principal antioxydant pour des réactions rapides, tandis que, pour les réactions plus lentes, des polyphénols présents en plus de la vitamine C interviendraient dans l'activité antiradicalaire.

4. Conclusion

Les jus d'orange, acides, se sont révélés contenir de la vitamine C dans des proportions de l'ordre de 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Les peaux d'oranges, quant à elles, renferment, dans leurs parties colorées apparentes (flavedo), de plus faibles quantités de vitamine C, ainsi

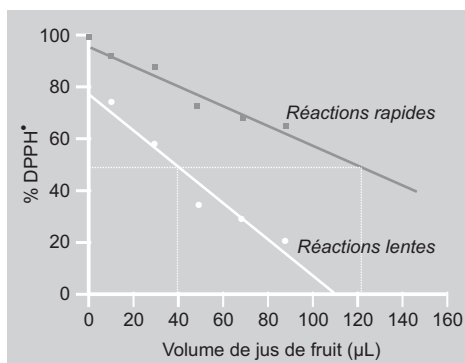


Figure 6. Pourcentage de DPPH[•] consommé en fonction du volume de jus d'orange ajouté. Extrait préparé à partir de la variété Maltaise [solvant : méthanol ; $(\text{DPPH}^{\bullet})_{\text{tot}} = 9,93 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $(25,0 \pm 0,2) \text{ }^{\circ}\text{C}$].

que d'autres antioxydants, des polyphénols, en particulier. Ces antioxydants se caractérisent par des vitesses de réaction radicalaire très différentes en présence du radical DPPH[•]. En effet, la totalité de l'activité antiradicalaire serait due à la vitamine C dans le cas de réactions très rapides, tandis que, dans les réactions à cinétiques lentes, ce serait les polyphénols qui contribueraient en grande partie à l'activité antioxydante totale. Ces résultats, qui sont en accord avec de nombreuses études issues de la littérature [41], montrent la forte potentialité industrielle du recyclage de déchets d'oranges en tant qu'antioxydants alimentaires.

Références

- [1] Steinmetz K.A., Potter J.D., Vegetables, fruit and cancer prevention: a review, *J. Am. Diet. Assoc.* 53 (1996) 536–543.
- [2] Liu S., Lee I.M., Ajani U., Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: the physicians' health study, *Int. J. Epidemiol.* 30 (2001) 130–135.
- [3] Joshipura K.J., Hu F.B., Manson J.E., The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease, *Ann. Intern. Med.* 134 (2001) 1106–1114.
- [4] Gerber M., Boutron-Ruault M.C., Hercberg S., Riboli E., Scalbert A., Siess M.H., Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables, *Bull. Cancer* 89 (2002) 293–312.
- [5] Sasazuki S., Case-control study of nonfatal myocardial infarction in relation to selected foods in Japanese men and women, *Jpn. Circ. J.* 65 (2001) 200–206.
- [6] Bazzano L.A., He J., Ogden L.G., Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular

- disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 93–99.
- [7] Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan J.B., Kromhout D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet* 342 (1993) 1007–1011.
- [8] Gee J.M., Johnson I.T., Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1245–1255.
- [9] Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3954–3962.
- [10] Scalbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.* 130 (2000) 2073S–2085S.
- [11] Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C., Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 276–282.
- [12] Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K., Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 571–581.
- [13] Mompon B., Lemaire B., Mengal P., Surbled M., Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle, in : Vercauteren J., Chêze C., Triaud J. (Eds.), *Polyphénols* 96, Inra, Paris, France, 1998, pp. 31–43.
- [14] Bravo L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 56 (1998) 317–333.
- [15] Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55 (2000) 481–504.
- [16] Acworth I.N., Bailey B., The handbook of oxidative metabolism, Ed. ESA Inc, Chelmsford, 1995, 37 p.
- [17] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956.
- [18] Silva F.A.M., Borges F., Guimaraes C., Lima J.L.F.C., Matos C., Reis S., Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure radical scavenging activity, and physicochemical parameters, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2122–2126.
- [19] Lachance P.A., Nakat Z., Jeong W.S., Antioxidants: an integrative approach, *Nutrition* 17 (2001) 835–838.
- [20] Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition* 18 (2002) 872–879.
- [21] Wilson A., Salamati L., Les radicaux libres : une question d'équilibre, Univ. Versailles/Saint-Quentin-en-Yvelines, Rapp. DESS IST, Versailles, France, 2002–2003, 37 p.
- [22] Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C., Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Arch. Biomed. Biophys.* 322 (2) (1995) 339–346.
- [23] Halliwell B., Antioxidants in human health and disease, *Ann. Rev. Nutr.* 16 (1996) 33–50.
- [24] Deng W., Fang X., Wu J., Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron, *Radiat. Phys. Chem.* 50 (1997) 271–276.
- [25] Croft K.D., The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids, *Ann. NY Acad. Sci.* 854 (1998) 435–442.
- [26] Geisser P., Iron therapy with special emphasis on oxidative stress, Ed. Vifor (Int.) Inc., Switzerland, 1998, 142 p.
- [27] Pierre J.L., Fontecave M., Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry, *Biometals* 12 (1999) 195–199.
- [28] Fernandez M.T., Mira M.L., Florencio M.H., Jennings K.R., Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study, *J. Inorg. Biochem.* 92 (2002) 105–111.
- [29] Cook N.C., Samman S., Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutr. Biochem.* 7 (1996) 66–76.
- [30] Hertog M.G., Hollman P.C.H., Katan M.B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 2379–2383.
- [31] Halliwell B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344 (1994) 721–724.

- [32] Mitscher L.M., Telikepalli H., McGhee E., Shankel D.M., Natural antimutagenic agents, *Mutat. Res.* 350 (1996) 142–143.
- [33] Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B., Bartsch H., The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1235–1247.
- [34] Sala A., Recio M.D., Giner R.M., Manes S., Tournier H., Schinella G., Rios J.L., Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 365–371.
- [35] Benavente-García O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., Del Rio J.A., Uses and properties of citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4505–4515.
- [36] Sánchez-Moreno C., Plaza L., De Ancos B., Pilar Cano M., Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices, *J. Sci. Food Agric.* 83 (2003) 430–439.
- [37] Malterud K.E., Rydland K.M., Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5576–5580.
- [38] Anon., Rapport annuel de la banque centrale de Tunisie (2003), Tunis, Tunisie, 2004, 260 p.
- [39] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28 (1995) 25–30.
- [40] Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F., A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998) 270–276.
- [41] Higashi-Okai K., Kamimoto K., Yoshioka A., Okai Y., Potent suppressive activity of fresh and dried peels from satsuma mandarin *Citrus unshiu* (Marcov.) on hydroperoxide generation from oxidized linoleic acid, *Phytother. Res.* 16 (2002) 781–784.
- [42] Anon., Microcal TM Origin™, version 5.0, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA, 1991–1997.

Medida de la actividad antirradical del jugo y de las pieles de naranja tunecinas por el radical DPPH.

Resumen — Introducción. La naranja (*Citrus aurantium sinensis*) es una fuente de compuestos bioactivos: vitaminas C y E, flavonoides (flavonas y flavanonas glicosiladas y polimetoxiladas). Para valorizar los desechos de las pieles de naranja, hemos medido la actividad antirradical del jugo y de las pieles secas y frescas de cinco variedades de naranjos de Túnez con el fin de evaluar su concentración en compuestos antioxidantes utilizables en la industria.

Material y métodos. La propiedad antirradical del jugo y de los extractos de las pieles se evaluó siguiendo, en función del tiempo, la desaparición del radical estable DPPH• mediante espectrofotometría de absorción UV-visible a 515 nm. La actividad antirradical medida se experimentó en concentración eficiente (CE₅₀). La determinación del volumen V₅₀ de vitamina C de una solución de ácido ascórbico de concentración conocida y de un volumen V₅₀ de los extractos de jugo y de pieles secas y frescas de naranja, permitió estimar la concentración de moles y de masa de vitamina C equivalente en los extractos. **Resultados.** Los jugos de naranja contienen aproximadamente 400 mg·L⁻¹ de equivalente de vitamina C. En el caso de reacciones muy rápidas con el radical DPPH, la totalidad de la actividad antirradical puede atribuirse a la vitamina C. En el caso de reacciones más lentas, además de la vitamina C, los polifenoles (citroflavonoides) son los que contribuyen a la actividad antioxidante total. Los extractos metilados de las pieles frescas (flavedo) contienen más vitamina C que los extractos de pieles secas. **Conclusión.** Las pieles de naranja constituyen unas fuentes de antioxidantes inmensas que pueden encontrar su aplicación en diferentes ámbitos: agroalimentario, cosmético, parafarmacéutico y otros.

Túnez / *Citrus sinensis* / frutas / zumo de naranja / piel (vegetal) / aprovechamiento de desechos / antioxidantes naturales / ácido ascórbico