



ISSN Print: 2394-7500
ISSN Online: 2394-5869
Impact Factor: 8.4
IJAR 2020; 6(11): 361-367
www.allresearchjournal.com
Received: 16-09-2020
Accepted: 19-10-2020

N'Negue ép Mezui-Mbeng MA
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

Ella Ndong JG
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

Nguema Edzang RW
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

Lendoye E
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

Ngou-Milama E
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

Corresponding Author:
N'Negue ép Mezui-Mbeng MA
Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé B.P. Libreville-Gabon

International Journal of Applied Research

Cinétique d'étude de l'activité antioxydante d'un extrait aqueux de calices séchés *d'Hibiscus Sabdariffa* par piégeage de l'ion radicalaire ABTS⁺

N'Negue ép Mezui-Mbeng MA, Ella Ndong JG, Nguema Edzang RW, Lendoye E and Ngou-Milama E

DOI: <https://doi.org/10.22271/allresearch.2020.v6.i11f.7915>

Abstract

The anti-radical and therefore antioxidant activities of different concentrations of dried calyxes of *Hibiscus sabdariffa* dried calyx "sorrel" and that of a reference antioxidant, "gallic acid", were determined by the scavenging effects on free radical cation of 2,2'-azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate] (ABTS⁺) according to the experimental method of Re et al. after a time reaction of 1, 6 10 and 12 minutes. The aim of this study was to determine the incubation time required for maximum antioxidant activity.

The obtained results shown that the of *Hibiscus sabdariffa* dried calyxes, as those of gallic acid have a maximum activity after 1 minute of incubation time. This activity would increase ranging 3 to 20% depending the tested concentrations after 1 to 6 minutes of incubation. And, between 1 to 5% after 10 to 12 minutes. The Sorrel dried calyxes keep their antioxidant activity despite the drying heating process (drying). The incubation times of 6 or 10 minutes appear to be the optimum reaction time to evaluate the antioxidant activity according to the ABTS method.

Keywords: Dried calyxes of *Hibiscus sabdariffa*; gallic acid; anti-radical activity; incubation time.

1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, la communauté scientifique a mis en évidence le rôle délétère du stress oxydatif induit par les espèces réactives oxygénées, encore appelées radicaux libres oxygénés (RLO).

En biologie humaine, les RLO sont à l'origine de différents états physiopathologiques tels que le vieillissement et le cancer ^[1, 2]. Dans l'industrie agro-alimentaire les RLO induisent la peroxydation des lipides des denrées alimentaires, responsables du goût rance des dits aliments ^[1, 2]. C'est ainsi que les antioxydants sont d'un grand intérêt pour les chercheurs, puisqu'ils protègent l'organisme humain et les produits alimentaires des désordres causés par la formation de RLO ^[1, 2]. Malgré une efficacité certaine, le coût élevé des antioxydants de synthèse, et leur toxicité potentielle est malheureusement à l'origine de l'intérêt porté aux antioxydants naturels présents dans les produits végétaux, notamment les plantes dont est extraite une très large variété d'antioxydants naturels ^[3].

Ces derniers sont des composés phénoliques et flavonoïques utilisés dans la plupart des cas comme additifs alimentaires afin de préserver la fraîcheur des aliments, d'en améliorer le goût et la texture, ou encore afin de garantir leur innocuité ^[4]. En santé humaine, les antioxydants naturels pourraient également protéger des dommages oxydatifs ^[4]. Aussi, une consommation d'extraits de végétaux riches en antioxydants naturels seraient bénéfiques pour l'Homme. Dans cette optique, l'évaluation de l'activité anti-radicalaire de dérivés de plantes fortement consommées par l'Homme serait d'un intérêt majeur dans la lutte contre les dommages causés par les RLO.

Hibiscus sabdariffa (*H. sabdariffa*), appelé communément « oseille », est une plante herbacée, vivace, localisée dans les zones tropicales et subtropicales (Image 1).



Image 1: *Hibiscus sabdariffa*, (a) plante entière ; (b) calices frais ; (c) calices séchés

Cette plante est consommée en Afrique sub-saharienne pour ses feuilles et pour ses calices qui sont de trois types: vert, rouge et rouge foncé [5]. Les extraits de calices rouges séchés, riches en acides organiques, sont généralement utilisés pour la préparation d'une boisson rafraîchissante et tonifiante [6]. Les anthocyanes (pigments naturels) présents dans les calices rouges confèrent à la boisson des propriétés antioxydantes, bien qu'elles soient 10 fois moins élevées que celles du vin rouge [6]. S'il est bien établi que l'extrait aqueux de calices frais d'*H. sabdariffa* présente une activité antioxydante [5], il n'en demeure pas moins que dans la littérature, on retrouve relativement peu d'informations consacrées à l'activité antioxydante des calices séchés d'*H. sabdariffa*.

Ce travail avait pour but d'évaluer l'activité antioxydante des calices séchés d'*H. sabdariffa* par piégeage du cation radicalaire de l'acide 2,2'-azinobis [3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique] (ABTS⁺) selon la méthode mise au point par Re *et al.* [7], avec l'acide gallique comme antioxydant de référence. D'autre part, nous avons tenté d'optimiser cette méthode en déterminant le temps de réaction nécessaire à l'obtention d'une activité anti-radicalaire maximale.

2. Matériaux et Méthodes

2.1 Matériaux

Les calices séchés d'*H. sabdariffa* ont été achetés sur le marché local de Libreville (Gabon). L'ABTS (acide 2,2'-azinobis[3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique]), l'acide gallique, le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) et le dihydrogénophosphate de sodium hydraté ont été commandés auprès de Sigma-Adrlilch (Saint-Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée a été distillée par l'équipement du laboratoire « Milli-Q Labo » (Millipore Japan, Tokyo, Japan). Tous ces produits sont de qualité pour analyses.

L'activité anti-radicalaire a été déterminée par spectrophotométrie UV: Spectrophotomètre V-200 (BOECO, Germany). La lecture de la densité optique a été faite à 734 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du cation radicalaire ABTS⁺.

2.2. Extraction du jus de calices séchés d'*H. sabdariffa* et préparation des solutions de travail

Nous avons introduit dans 200 mL d'eau distillée, 50 g de fleurs séchées d'*H. sabdariffa*. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 5 min. Nous avons obtenu une solution de couleur rouge. Une fraction de 50 mL de cette solution a été prélevée, diluée dans 150 mL d'eau distillée et chauffée de nouveau pendant 5 min. L'extrait ainsi obtenu a été filtré pour éliminer les résidus de calices en suspension. Cette deuxième solution a représenté la solution mère. À partir de

cette dernière, nous avons réalisé une succession de dilutions (1/400^{ème}, 1/800^{ème}, 1/1600^{ème}, 1/3200^{ème}, 1/6400^{ème}, 1/12800^{ème}, 1/25600^{ème}, 1/51200^{ème}) afin d'obtenir 8 solutions filles de concentrations respectives suivantes: 156 ; 78 ; 39 ; 19,5 ; 9,76 ; 4,88 ; 2,44 ; et 1,22 µg/mL.

2.3. Préparation des solutions d'acide gallique « antioxydant de référence »

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, utilisé comme composé anti-radicalaire de référence [8-11]. Dix solutions de travail, de concentrations décroissantes, allant de 0,94 à 0,094 µM ont été préparées par dilution de l'acide gallique dans de l'eau distillée.

2.4. Mesure de l'activité anti-radicalaire

Le principe du test de mesure de l'activité anti-radicalaire par la méthode ABTS est basé sur la diminution de l'absorbance à 734 nm du cation radicalaire ABTS⁺ (coloration bleu-vert) en présence d'un composé potentiellement anti-radicalaire qui réduit le radical cation [7]. La diminution de la forme radicalaire d'ABTS⁺ entraîne une décoloration de la solution.

L'ion radicalaire ABTS⁺ est obtenu en faisant réagir la molécule d'ABTS (7 mM) avec le persulfate de potassium (2,45 mM), dans de l'eau distillée pendant 16 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution d'ABTS⁺ obtenue est diluée avec du tampon phosphate de sodium (5 mM, pH = 7,4), afin d'obtenir une solution mère ayant une valeur initiale d'absorbance à 734 nm située entre 0,65 et 0,70. Le cation radicalaire (ABTS⁺) est stable pendant plus de 2 jours lorsqu'il est stocké à température ambiante et à l'abri de la lumière. Tous les dosages ont été réalisés trois fois et l'activité anti-radicalaire est calculée selon la formule ci-après [7, 12]:

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = 1 - \left[\frac{(A_r - A_b)}{(A_i - A_b)} \right] \times 100$$

Ar : absorbance restante d'ABTS⁺⁺
 A_i : absorbance initiale d'ABTS⁺⁺
 A_b : absorbance du blanc

En fait, évaluer la réduction du radical cation ABTS⁺ revient donc à déterminer l'activité anti-radicalaire et au total, les propriétés antioxydantes des extraits de calices séchés d'*H. sabdariffa* comparativement aux propriétés antioxydantes de l'acide gallique (éton). L'activité anti-

radicalaire a été déterminée par spectrophotométrie UV dans des cuves de 1cm de trajet optique (volume réactionnel de 2 mL). Les temps d'incubation ont été de 1, 6, 10 et 12 minutes à température ambiante. Ces temps ont été choisis car ils sont soit supérieurs, inférieurs ou égales aux temps d'incubation choisis par différents auteurs [7, 13, 14, 15].

3. Résultats

3.1. Activité anti-radicalaire de l'acide gallique en fonction de la concentration

Le pourcentage (%) d'activité anti-radicalaire augmente de manière croissante en fonction de la concentration en acide gallique, quel que soit le temps d'incubation (Figure 1).

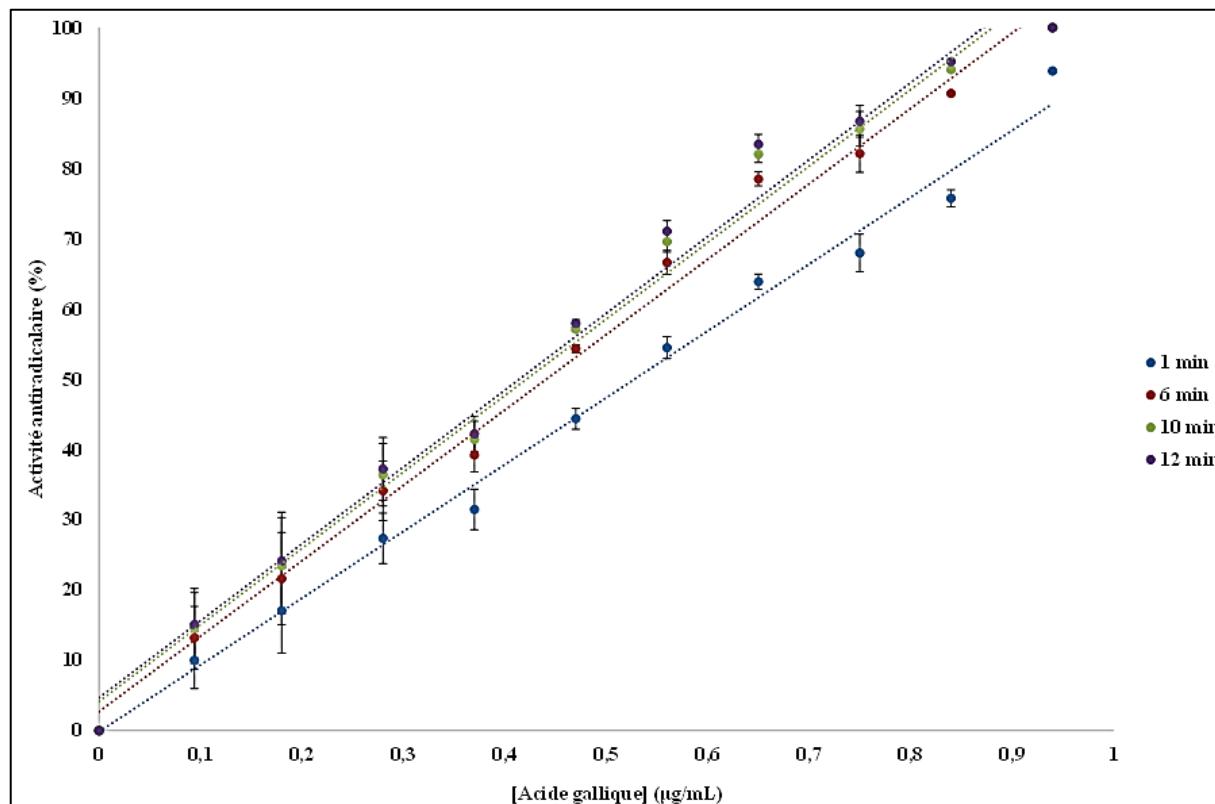


Fig 1: Activité anti-radicalaire en fonction de la concentration de l'acide gallique après 1, 6, 10 et 12 minutes d'incubation. La proportion ABTS⁺⁺ transformée en ABTS⁺ en présence d'acide gallique est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie. Les équations de droite sont les suivantes: $y(1\text{ min}) = 95,021x - 0,1548$ ($R^2 = 0,99$) ; $y(6\text{ min}) = 107,22x + 2,713$ ($R^2 = 0,99$) ; $y(10\text{ min}) = 108,78x + 4,155$ ($R^2 = 0,99$) ; $y(12\text{ min}) = 109,3x + 4,709$ ($R^2 = 0,985$) ; $n = 3$.

Les activités anti-radicalaires de 10% et de 94% ont été obtenues avec des concentrations de 0,094 et 0,94 µg/mL pour une minute d'incubation. Alors que les activités de 13% et 100% sont obtenues au bout de 6 minute d'incubation, puis celles de 14% et 100% pour 10 minutes d'incubation et enfin pour 12 minutes d'incubation nous avons obtenues 15% et 100%. Selon nos résultats ainsi obtenus, l'IC₅₀ de l'acide gallique, qui est la concentration nécessaire à la réduction de 50% de l'activité anti-radicalaire varie en fonction du temps d'incubation. En effet, elle est de 0,57 µg/mL pour 1 minute, de 0,47 µg/mL pour 6 minutes et de 0,44 µg/mL pour 10 et 12 minutes.

3.2. Activité anti-radicalaire de l'acide gallique en fonction du temps

Les résultats obtenus (Figure 2), ont montré qu'après 1 minute de réaction, on observe un maximum d'activité anti-radicalaire de l'acide gallique compris entre 85% et 95% en fonction de la concentration testée de cet antioxydant. Par la suite, on remarque une légère augmentation subséquente de l'activité anti-radicalaire de 3 à 15% entre 1 à 6 minutes et de 1 à 2% entre 6 à 10 minutes de réaction. L'activité anti-radicalaire de l'acide gallique ne variait plus entre 10 à 12 minutes.

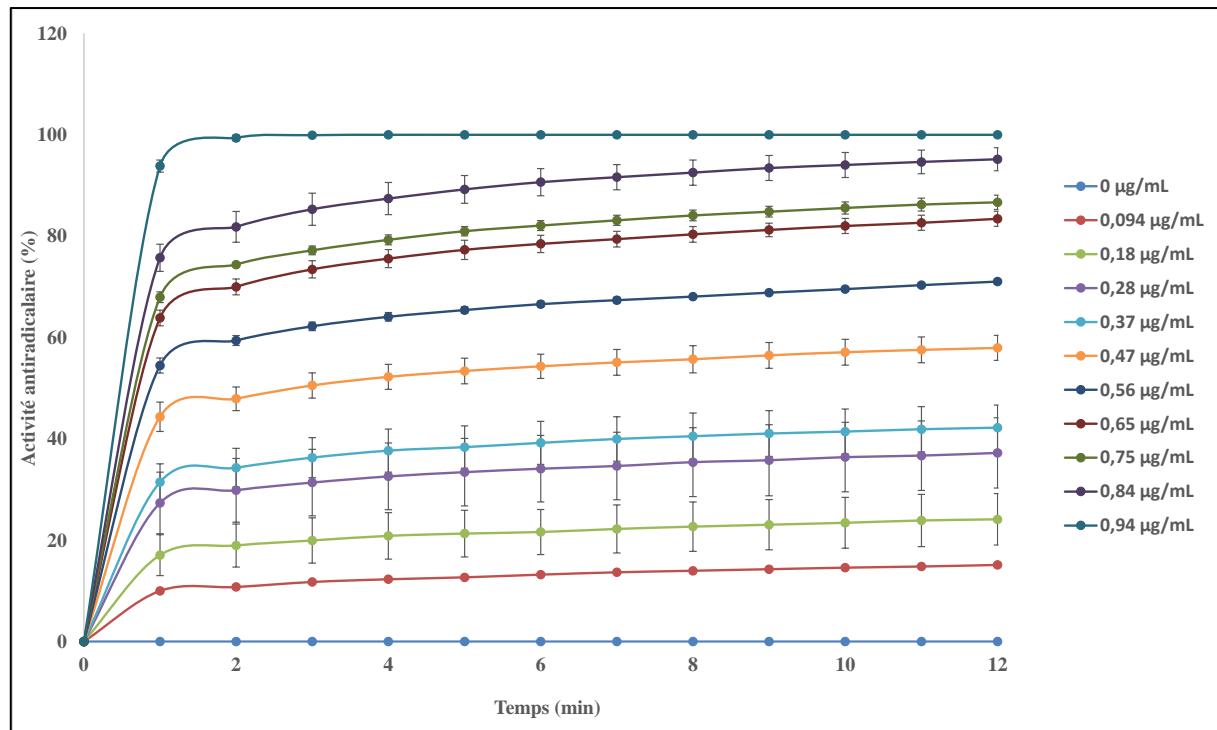


Fig 2: Activité anti-radicalaire en fonction du temps pour diverses concentrations d'acide gallique. La proportion ABTS⁺ transformée en ABTS⁺ est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie. n=3.

3.3. Activité anti-radicalaire des calices séchés d'*H. sabdariffa* en fonction de la concentration

L'activité anti-radicalaire du jus de calices séchés d'oseille a été évaluée sur différentes concentrations de la solution mère (1,22 ; 2,44 ; 4,88 ; 9,76 ; 19,5 ; 39 ; 78 et 156 µg/mL), après 1 minute, 6 minutes, 10 minutes et 12 minutes d'incubation. Nous avons observé une activité anti-radicalaire croissante avec la concentration de calices séchés d'oseille, ceci quel que soit le temps d'incubation considéré (Figure 3). Les activités anti-radicalaires de 3,28%, de 10,48%, de 32,77%, de 62,9% et de 99,19% ont été

obtenues avec des concentrations de 1,22 ; 9,76 ; 39 ; 78 et 156 µg/mL respectivement, pour 1min d'incubation. Ces activités étaient de 5,83 ; 14,29 ; 42,85 ; 79,84 et 100% pour 6 min d'incubation ; de 7,23 ; 16,28 ; 47,11 ; 86,03 et 100% pour 10 min d'incubation et de 8,17 ; 17,08 ; 48,89 ; 88,32 et 100% pour 12 minutes d'incubation. Selon nos résultats, l'IC₅₀ des calices séchés d'*H. sabdariffa* varie légèrement en fonction du temps d'incubation. En effet, nous avons trouvé des IC₅₀ de 62 µg/mL pour 1 min, de 42 µg/mL pour 6 min et de 39 µg/mL pour 10 et 12 min d'incubation.

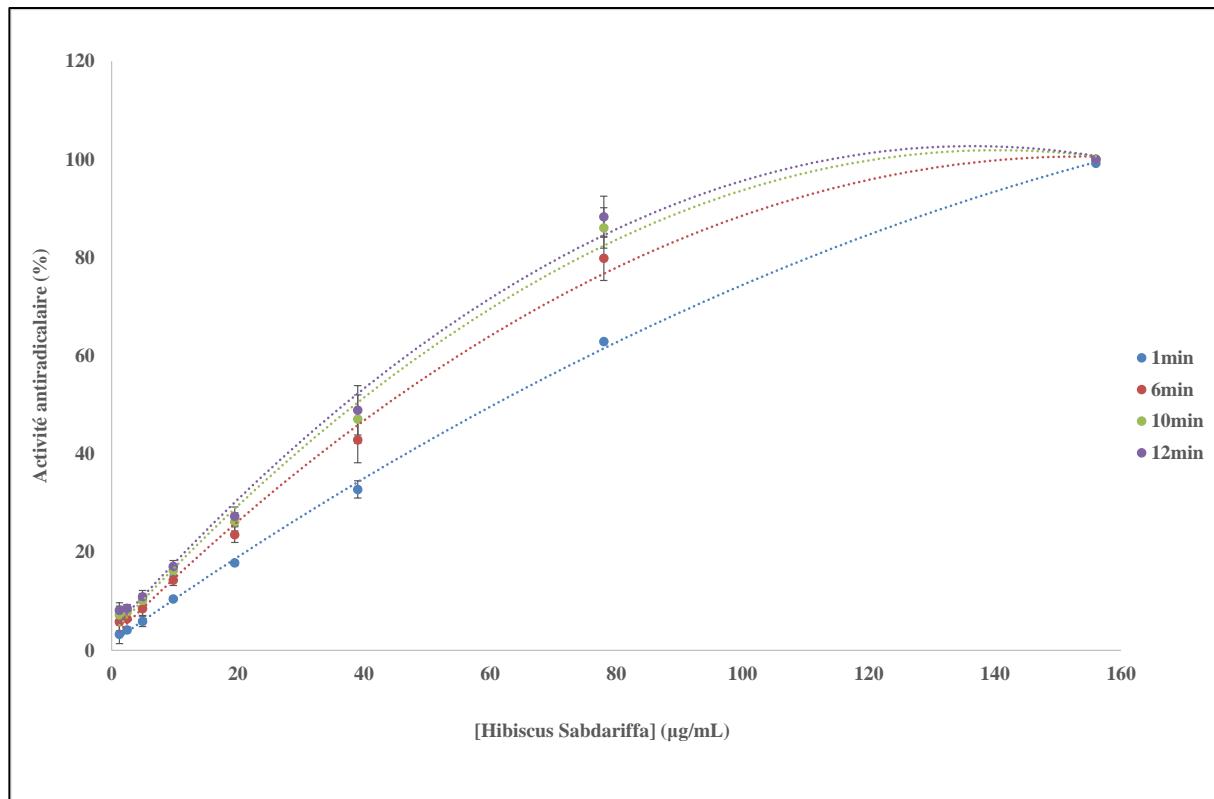


Fig 3: Activité anti-radicalaire en fonction de la concentration de jus de calices séchés d'*H. sabdariffa* après 1, 6, 10 et 12 minutes d'incubation. La proportion ABTS⁺ transformée en ABTS⁺ est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie. Les équations des polynômes sont les suivantes: $y(1\text{min}) = -0,0018x^2 + 0,909x + 1,566$ ($R^2 = 0,999$) ; $y(6\text{min}) = -0,0041x^2 + 1,276x + 2,405$ ($R^2 = 0,997$) ; $y(10\text{min}) = -0,005x^2 + 1,403x + 3,393$ ($R^2 = 0,996$) ; $y(12\text{min}) = -0,0053x^2 + 1,447x + 3,942$ ($R^2 = 0,996$) ; $n = 3$.

3.4. Activité anti-radicalaire des calices séchés d'*H. sabdariffa* en fonction du temps

D'après les résultats, le jus de calices séchés d'oseille, montre déjà une forte activité anti-radicalaire, après 1 minute d'incubation. Une augmentation plus ou moins légère (en fonction de la concentration) de l'activité anti-radicalaire est ensuite observée de 1 minute jusqu'à 6 voire

10 minutes de réaction. Au-delà, l'activité anti-radicalaire restait quasi constante (Figure 4). En effet, nous avons observé une augmentation de l'activité anti-radicalaire de 2,5 à 17% entre 1 à 6 minutes et de 1,5 à 5% entre 6 à 10 minutes de réaction en fonction de la concentration des calices séchés d'oseille. L'activité anti-radicalaire des calices ne variait plus entre 10 à 12 minutes.

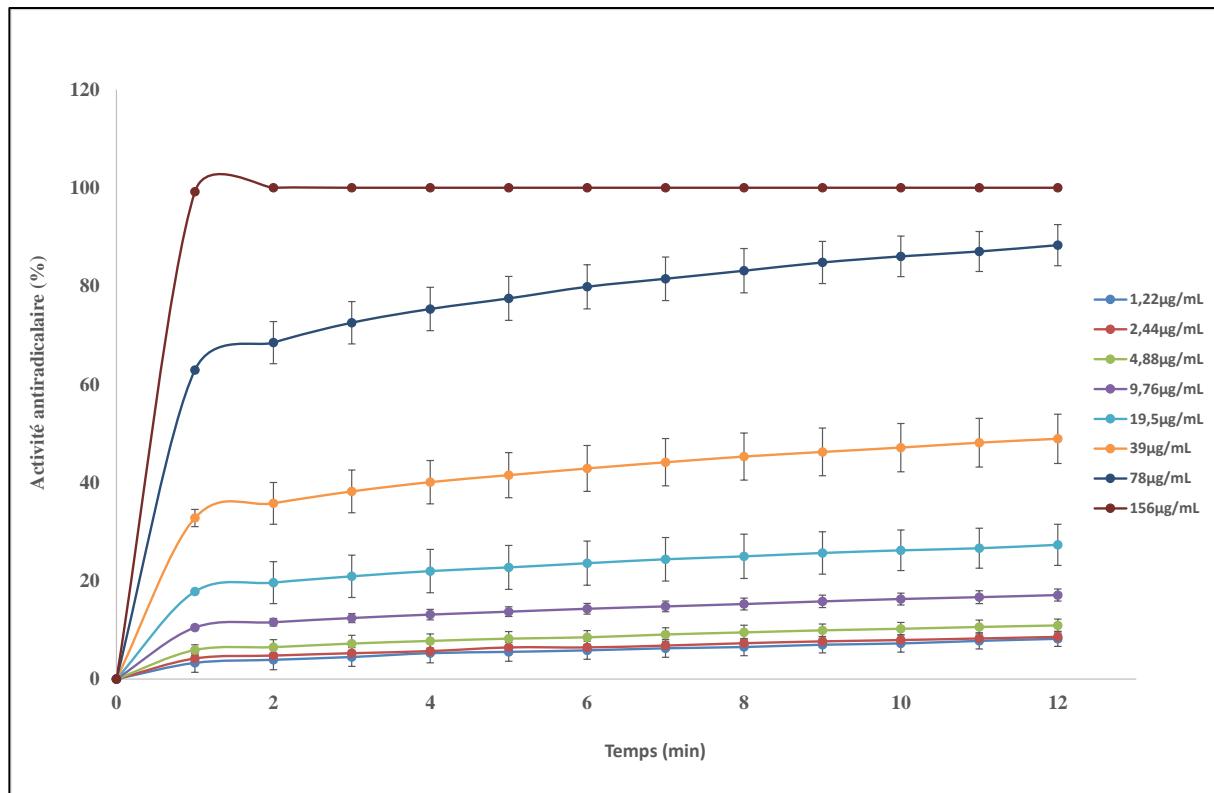


Fig 4: Activité anti-radicalaire en fonction du temps d'incubation pour diverses concentrations de jus de calices séchés d'*H. sabdariffa*. La proportion ABTS⁺⁺ transformée en ABTS⁺ est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie ; n=3.

4. Discussion

Dans notre étude, nous avons dans un premier temps évalué l'activité anti-radicalaire d'un extrait aqueux des calices séchés d'*H. sabdariffa* par piégeage de l'ion radicalaire ABTS^{•+} selon la méthode de Re *et al.* [7] avec l'acide gallique comme antioxydant de référence. Cette méthode très sensible est largement utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante d'extraits de plante, de composés hydrophiles et lipophiles, de fruits rouges etc. [13, 14]. Cependant, le temps d'incubation pour une activité optimale semble varier d'un auteur à un autre [7, 13, 14, 15]. Aussi, nous avons dans un second temps, déterminé la durée d'incubation optimale pour une réaction complète entre un antioxydant et l'ABTS^{•+}.

Concernant l'activité anti-radicalaire de l'acide gallique, nos résultats ont montré que cette activité augmente de manière croissante en fonction de la concentration d'acide gallique, quel que soit le temps d'incubation (Figures 1 et 2). De plus, nous avons trouvé une IC₅₀ de 0,57 µg/mL pour 1 min d'incubation, de 0,47 µg/mL pour 6 min d'incubation et de 0,44 µg/mL pour 10 et 12 minutes d'incubation. L'IC₅₀ semble donc légèrement varier en fonction du temps d'incubation, soit d'environ 10% de variation entre 1 et 6 minutes et de seulement 3% de 6 à 10 minutes. L'IC₅₀ reste constant entre 10 et 12 minutes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sadat *et al.* [15], et de N'Negue *et al.* [16], qui ont isolé et identifié les peptides d'α-lactalbumine bovine ayant une activité antioxydante par la méthode ABTS avec l'acide gallique comme antioxydant de référence. En effet, ces auteurs ont trouvé une IC₅₀ de 0,47 µg/mL (ou 2,5 µM) d'acide gallique pour un temps d'incubation de 10 minutes. Nous avons obtenu dans cette étude une valeur similaire de l'IC₅₀ de l'acide gallique (0,47 µg/mL) pour un temps d'incubation de 6 minutes. Il y'a très peu de différences après les temps d'incubations de 6 et 10 minutes. Le temps

d'incubation de 6 minutes serait donc suffisant pour observer l'effet anti-radicalaire par la méthode dite ABTS. D'ailleurs, Re *et al.* [7] ont montré que la réaction entre l'ABTS et certains antioxydants autres que l'acide gallique (Troxol, vitamine C, α-tocophérol, Kaempférol et l'acide urique), était complète après 1 minute de réaction ; tandis qu'avec d'autres composés tels que la cyanidine et le glutathion, la réaction se poursuivait jusqu'à 4 minutes [7].

D'autre part, Re *et al.* [7], en mettant en évidence l'effet croissant de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration en antioxydant Troxol, ont trouvé une IC₅₀ de 12 µM. Selon Sadat *et al.* [15], le Troxol possède une IC₅₀ de 5,6 µM contre 2,5 µM (ou 0,47 µg/mL) pour l'acide gallique. Comparativement à nos résultats, nous pouvons dire que dans nos conditions d'études, l'acide gallique serait un antioxydant plus efficace que le Troxol.

S'agissant de l'activité anti-radicalaire des calices séchés d'*H. sabdariffa*, nous avons observé une activité croissante avec les concentrations des solutions de calices séchés d'oseille, ceci quel que soit le temps d'incubation considéré (Figure 3). Cette activité anti-radicalaire atteignait les 100% (99,19%) pour une concentration en calices séchés de 156 µg/mL dès 1 minute d'incubation. Cependant, pour des concentrations en dessous de 156 µg/mL testées, l'activité anti radicalaire augmente non seulement en fonction de la concentration, mais aussi en fonction du temps d'incubation. C'est ainsi que pour une concentration en calices séchés de 39 µg/mL, l'activité anti-radicalaire passe de 32,77% à 43% lorsqu'on passe de 1 minute à 6 minutes d'incubation. Elle est de 47% et 48,8% pour les temps de réactions de 10 et 12 minutes. Selon nos résultats, l'IC₅₀ des calices séchés d'*H. sabdariffa* comme celle de l'acide gallique varie légèrement avec le temps d'incubation. En effet, nous avons trouvé des IC₅₀ de 62 µg/mL pour 1 minute, de 42 µg/mL pour 6 minutes et de 39 µg/mL pour 10 et 12 minutes d'incubation.

L'IC₅₀ des calices diminuerait d'environ 20% entre 1 et 6 minutes et de seulement 3% de 6 à 10 minutes. L'IC₅₀ reste constant entre 10 et 12 minutes. Comme avec l'acide gallique, les résultats obtenus avec les calices séchés ont montré une très faible variation d'activité antiradicalaire lorsqu'on passe d'un temps de réaction 6 minutes à celui de 10 voire 12 minutes. Une variation (d'environ 3 à 20% en fonction de la concentration testée) s'observe cependant, lorsqu'on passe de 1 minute à 6 minutes d'incubation. Re *et al.*^[7] ont montré que des composés antioxydants tels que la cyanidine «anthocyane» réagissent avec l'ABTS jusqu'à 4 minutes, nos résultats ont montré que la réaction entre la solution de calices séchés d'oseille (riche en anthocyane) et l'ABTS se poursuivait jusqu'à 6 voire 10 minutes (Figure 4). D'après nos résultats, la réaction entre les calices séchés d'oseille et l'ABTS (comme celle avec l'acide gallique) était donc quasi complète après 6 minutes et complète après 10 minutes. Cela renforce l'idée selon laquelle un temps de réaction de 6 minutes serait largement suffisant pour observer l'effet anti-radicalaire par piégeage du cation radicalaire ABTS⁺.

Les résultats obtenus ont confirmé que les calices séchés d'oseille possédaient bien une activité anti-radicalaire. 88% et 100% d'activité anti radicalaire ont été enregistré pour des concentrations de jus de calices de 78 et 156 µg/mL, ce qui est équivalent à l'activité anti-radicalaire obtenue par 0,94 µg/mL d'acide gallique. La composition chimique des calices séchés d'oseille expliquerait ce résultat. En effet, les calices sont riches en composés antioxydants tels que la vitamine C, et surtout en anthocyane^[5, 17]. Cette richesse en composés antioxydants pourrait être à l'origine de l'activité antioxydante de nos extraits aqueux de calices séchés d'*H. sabdariffa*. Selon certains auteurs, les anthocyane d'*H. sabdariffa* sont instables et facilement dégradés pendant les traitements thermiques ou durant leur stockage à température ambiante^[5]. Nous pouvons donc dire que le traitement thermique lors du séchage des calices d'*H. sabdariffa* ne semble pas altérer les propriétés antioxydantes d'*H. sabdariffa*.

5. Conclusion

L'extrait aqueux de calices séchés d'*H. sabdariffa* serait bien doté d'une activité anti-radicalaire. Le traitement thermique de ces calices d'*H. sabdariffa* ne semble pas altérer les propriétés antioxydantes de la plante. D'autre part, pour une évaluation optimale de l'activité antioxydante par piégeage du cation radicalaire ABTS⁺ (méthode ABTS), un temps d'incubation de 6 ou 10 minutes est nécessaire.

6. Références

1. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev* 1994;52:253-265.
2. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric. Food Chem* 2005;53:841-1853.
3. Ma Y, Ke CY, Zi X, Zhao F, Yaun L, Zhu YL, *et al.* Introduction of the mitochondria mediated apoptosis in human esophageal cancer cells by DS2, a newly synthetic diterpenoid analog is regulated by Bax and caused by generation of reactive oxygen species. *Oncotarget* 2016;7:86211-86224.
4. Dominguez M, Nieto A, Marin JC, Keck AS, Jeffrey E, Céspedes CL, *et al.* Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and penstemon gentianoides (scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem* 2005;53:5889-5895.
5. Cissé M, Dornier M, Sakho M, Ndiaye A, Reynes M, Sock O, *et al.* Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations, *Fruits* 2009;64:179-193.
6. Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res Int* 2002;35:351-356.
7. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med* 1999;26:1231-1237.
8. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, *et al.* Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT). *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015;101(7953):295-312.
9. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015;5 (97):55-74.
10. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology* 2015;71:40-56.
11. Oroian M, Escriva I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 2015;74:10-36.
12. Long LH, Thiam Kwee DC, Halliwell B. The antioxidant Activities of seasonings used in Asian Cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed Using the ABTS Assay, *Free Rad Res* 2000;32:181-186.
13. Cano A, Alcaraz O, Acosta M, Arnao MB, Cakir-Kiefer C. On line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS assay. *Redox Report* 2002;7:103-109.
14. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FPS, Catanante G, Mart JL, *et al.* Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *J Braz. Chem. Soc.* 2019;30:1108-1114.
15. Sadat L, Cakir-Kiefer C, N'negue MA, Gaillard JL, Girardet JM, Miclo L Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine γ -lactalbumin. *International Dairy journal* 2011;21:214-221.
16. N'negue MA, Miclo L, Girardet JM, Campagna S, Mollé D, Gaillard JL, *et al.* Proteolysis of bovine α -lactalbumin by thermolysin during thermal denaturation. *International Dairy Journal* 2006;11:1157-1167.
17. Khadrhi A, El Mokni R, Smiti S. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummosa*. *Revue Soc. Sci. Nat. de Tunisie* 2012-2013;39:44-52.