



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Intitulé :

**Influence des paramètres d'extraction sur la composition phénoliques
et l'activité biologique des extraits d'une plante médicinale du genre
d'*Hibiscus*.**

Présenté par :

GHEBOULI Asma & HANNICHE Nour El Houda

Soutenu le 10 /06 / 2025, Devant le Jury:

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	M ^{me} MEZITI Asma	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	M ^{me} BOUMERFEG Sabah	Pr	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur	M ^{me} GUERGOUR Hassina	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2024/2025

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*À la mémoire de mes **chers parents**, que Dieu a rappelés à Lui, mais qui vivent encore à travers chaque valeur qu'ils m'ont transmise.*

Ce mémoire vous est dédié, avec tout mon amour, mon respect et ma reconnaissance.

Qu'Allah vous accorde Sa miséricorde et vous ouvre les portes du Paradis.

*À mes sœurs **Amina, Mounira, Samira**, et à mes frères **Zaki** et **Hakim**,
Vous faites partie de ceux que j'aime le plus au monde, en souhaitant que notre vie soit pleine de joie, de bonheur et de succès.*

*À toute ma famille paternelle **Hanniche** et ma famille maternelle **Khadara**.*

*Une dédicace particulière à mon binôme, **Asma** :*

Merci de m'avoir aidée lorsque j'avais besoin d'aide. Vous avez toujours été un cadeau dans ma vie. Je vous remercie grandement pour l'aide que vous m'avez apportée pour finir ce travail pénible. Avec vous, tout semble plus facile.

*Je le dédie spécialement à mes sœurs d'éducation, **Chaïma, Racha** et **Hadjer**,
qui ont toujours été présentes dans ma vie avec leurs encouragements et leur aide dans les moments de faiblesse.*

*À toutes mes amies : **Rima, Nada, Khawla**.*

Houda

Dédicaces

Avant tout ,je dédie à Dieu, de tout puissant pour m'avoir donner la force et la patience de terminer mon travail.

À ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour m'a rendu ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement a mon très cher père Rachid qu'il me soutient et m'encourage, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma très chère mère Ghania qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A mes chères sœurs pour leur dévouement , leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études , m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité , leurs conseils et leurs amour :
Nadjet , Aya ,et ma petite princesse Bouchra.*

A ma chère amie Lina .

À ma chère binôme Nour El Houda, qui a eu la patience de me supporter durant la préparation de ce mémoire, et qui m'a soutenue et encouragée pendant tous les moments difficiles que nous avons vécus.

En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, de bonheur, de santé et de prospérité.

À mes chers amis avec qui nous avons étudié ensemble, et ceux que j'ai rencontrés durant tout mon parcours scolaire.

Remerciements

Ńous remercions Allah de nous avoir guidés sur le droit chemin, de nous avoir accordé la santé, le courage et Son soutien durant les périodes les plus difficiles.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à **Madame le Professeur BOUMERFEG Sabah**, qui a bien voulu diriger ce travail de recherche. Nous lui présentons nos vifs remerciements pour sa disponibilité et ses conseils pertinents, qui ont contribué de manière significative l'enrichissement et à l'aboutissement de ce mémoire.

Nous tenons à remercier très chaleureusement les membres du jury Dr **MEZITI Asma** et Dr **GUERGOUR Hassina** d'avoir consacré leur temps à la lecture de ce manuscrit, et d'accepter de juger et d'évaluer ce travail

Nous souhaitons adresser une mention particulière à **Mme CHADI Sara**, pour ses conseils avisés, son soutien, sa présence et ses encouragements constants, qui nous ont permis de mener à bien ce travail..

Nous remercions chaleureusement **Dr BOUGUERRA Asma** pour son soutien précieux, son accompagnement et sa patience tout au long de la réalisation d'une partie essentielle de notre travail pratique.

Nous tenons à remercier sincèrement Mme **GHERZOULI Hiba** et Mme **CHEBIRI Fatima** pour leur aide précieuse. Nous leur exprimons nos plus profondes reconnaissances.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire pédagogique université Bordj Bou Arreridj, Il n'aurait pu être mené à bien sans l'aide, la patience et le soutien de nombreuses personnes particulièrement auxquelles nous adressons tous nos remerciements.

Un grand merci également à toute l'équipe pédagogique de l'université de Bordj Bou Arreridj et les intervenants professionnels responsables de notre formation.

Nos sincères remerciements vont à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué par leurs conseils et leurs compétences à la réalisation de ce mémoire

Sommaire

- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des abréviations
- Résumés

I Introduction	01
I.1 Les métabolites secondaires	04
I.1.1 Les polyphénols	04
I.1.2 Classification des polyphénols	05
I.2. Stress oxydatif	06
I.2.1 Les radicaux libres	06
I.2.2 Les sources des radicaux libres	06
I.2.3 Rôle physiologique des radicaux libres.....	07
I.2.4 Rôle pathologique des radicaux libres	07
I.3 Les antioxydants	08
I.3.1 Les antioxydants enzymatiques	08
I.3.2 Les antioxydants non enzymatiques	08
I.4 Nomenclature de plante	09
I.4.1 Position taxonomique.....	09
I.4.2 Repartitions géographique.....	10
I.4.3 Ecologie.....	11
I.4.4 Utilisation traditionnelle.....	11
I.4.4.1 Utilisation médicale.....	12
I.4.4.2 Utilisation alimentaire et culinaire	12
I.4.5 Composition chimique	13
I.4.6 Composition nutritionnelle.....	14
I. 4.7 Activités biologique.....	15
II. Matériel et méthodes	18
II.1 Matériel	18
II.1.1 Matériel végétal	18
II.1.2 Souches bactériennes	18
II.1.3 Matériel non biologique	18
II.2 Méthodes	
II.2.1 Préparation de la plante	19
II.2.2 Extraction	20

II.2.3 Analyses phytochimiques	20
II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux	20
II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes	21
II.2.4 Effet scavenger du radical DPPH	21
II.2.6 Activité antibactérienne	22
II.2.6.1 Méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits)	23
II.3 Analyse statistique	23
III. Résultats et discussion	24
III.1 Extraction des composés phénoliques	25
III.2.1 Dosage des polyphénols	26
III.2.2 Dosage des flavonoïdes	28
III.3 Evaluation de l'activité antioxydante	30
III.3.1 Test DPPH	30
III.4 Activité antibactérienne	32
Conclusion et perspectives	37

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Rendement des extraits des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	25
Tableau 2 : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes	28
Tableau 3 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition des extraits	33

Liste des Figures

Figure 1 : Calice de la plante <i>Hibiscus sabdariffa</i>	10
Figure 2 : Broyat d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L utilisé pour l'extraction	19
Figure 3: Principales étapes du processus d'extraction des composés phénoliques à partir des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	20
Figure 4: Réduction du DPPH	22
Figure5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	27
Figure6: Courbe d'étalonnage de la quercetine	29
Figure7 Activité antiradicalaire des trois extraits d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> comparée à celle du standard (BHT).....	31

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: Butylhydroxytoluène

DI: Diamètre d'Inhibition

DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DMSO: Diméthylsulfoxyde

EAG: Equivalent d'acide gallique

ERA : Les espèces réactives de l'azote

ERO : Les espèces réactives de l'oxygène

EQ : Equivalent de quercétine

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

IC50 : Concentration inhibitrice de 50 %

MH : Muller Hinton.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SOD : Super Oxydes Dismutases

الملخص

تُعرف *Hibiscus sabdariffa L.* باسم الكركديه، وهي نبتة طبية تنتمي إلى عائلة الخبازيات، وتُستخدم على نطاق واسع بفضل خصائصها العلاجية. يهدف هذا العمل إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا لمستخلصات هذه النبتة. تم تحضير ثلاثة مستخلصات: اثنان منهما بالإيثانول المائي M2 و M7 و آخر مائي (DEC) وقد شملت التحاليل دراسة مردود الاستخلاص، ومحتوى كل مستخلص من المركبات الفينولية الكلية و الفلافونويدات. أظهرت النتائج أن المستخلص M2 سجل أعلى مردود (64.84%)، بينما أظهر المستخلص M7 أعلى تركيز من البوليفينولات (5.85 ± 88.32 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ)، وأفضل نشاط مضاد للأكسدة IC_{50} مقدر 0.019 ± 0.05 ملغ/مل وكان ذلك مماثلاً لـ BHT المرجعي. كما أظهر كل من المستخلصين M2 و M7 نسبة مرتفعة من الفلافونويدات مقارنة بالمستخلص المائي، DEC وتشير العلاقة بين المحتوى الفينولي والنشاط المضاد للأكسدة إلى احتمال مساهمة مركبات نشطة حيويًا أخرى في هذا التأثير. أما بخصوص النشاط المضاد للبكتيريا، فقد أُجري باستخدام تقنية الانتشار في وسط الأغار، وكشفت النتائج عن فعالية ملحوظة للمستخلص الإيثانولي المائي، خصوصًا ضد سلالاتي *Bacillus cereus* (جرام موجب) و *Escherichia coli* (جرام سالب)، وذلك بتركيز 150 ملغ/مل. تؤكد هذه النتائج الإمكانات العلاجية لنبتة *Hibiscus sabdariffa L.* كمصدر طبيعي للمركبات المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الكركديه، النشاط المضاد للأكسدة، البوليفينولات، DPPH، النشاط المضاد للبكتيري

Abstract

Hibiscus sabdariffa L., commonly known as Karkadé, is a medicinal plant from the Malvaceae family, widely used for its therapeutic properties. This study aims to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of extracts obtained from the plant's calyces. Three extracts were prepared: two hydroethanolic extracts (M2 and M7) and one aqueous extract (DEC). The results showed that extract M2 had the highest extraction yield (64.84%), while M7 exhibited the highest total polyphenol content (88.32 ± 5.85 mg GAE/g) and the strongest antioxidant activity ($IC_{50} = 0.0525 \pm 0.019$ mg/ml), comparable to the standard antioxidant BHT. Both M2 and M7 also contained significantly higher levels of flavonoids compared to the aqueous extract DEC. The relationship between phenolic content and antioxidant activity suggests that other bioactive compounds may also contribute to the observed effects. The antibacterial activity, assessed by the agar well diffusion method, revealed a notable efficacy of the hydroethanolic extract, especially against *Bacillus cereus* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative), particularly at the concentration of 150 mg/ml. These findings confirm the therapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa* L. as a natural source of antioxidant and antimicrobial compounds.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., Antioxidant activity, Polyphenols, DPPH, Antibacterial activity.

Résumé

Hibiscus sabdariffa L., communément appelé Karkadé, est une plante médicinale appartenant à la famille des Malvacées, reconnue pour ses multiples propriétés thérapeutiques. Ce travail a pour objectif d'évaluer les activités antioxydantes et antibactériennes des extraits obtenus à partir des calices de cette plante. Trois types d'extraits ont été préparés : deux extraits hydroéthanoliques (M2 et M7) et un extrait aqueux (DEC). L'étude a porté sur les rendements d'extraction, les teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes. Les résultats ont révélé que l'extrait M2 présentait le meilleur rendement d'extraction (64,84 %), tandis que l'extrait M7 affichait la plus forte teneur en polyphénols totaux ($88,32 \pm 5,85$ mg EAG/g) et une activité antioxydante élevée ($IC_{50} = 0,0525 \pm 0,019$ mg/ml), comparable à celle du BHT. Les extraits M2 et M7 se sont également distingués par leur teneur élevée en flavonoïdes, comparativement à l'extrait aqueux DEC. La relation observée entre la richesse en composés phénoliques et l'activité antioxydante suggère l'implication possible d'autres métabolites bioactifs. Par ailleurs, l'étude de l'activité antibactérienne, réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, a mis en évidence une efficacité notable de l'extrait hydroéthanolique, en particulier contre *Bacillus cereus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif), avec un effet marqué à la concentration de 150 mg/ml. Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de *Hibiscus sabdariffa* L. en tant que source naturelle de composés antioxydants et antimicrobiens, et soutiennent son intérêt pour de futures applications pharmaceutiques.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa* L., Activité antioxydante, polyphénols, DPPH, activité antibactérienne.

Introduction

Introduction

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales occupent une place essentielle dans les pratiques de soins traditionnelles. Parmi elles, *Hibiscus sabdariffa* L., communément appelé karkadé, est largement utilisée dans de nombreuses régions du monde, y compris en Algérie, où ses calices rouges entrent dans la préparation de diverses infusions, décoctions et remèdes traditionnels. Reconnue pour ses vertus médicinales, cette plante est particulièrement appréciée dans la pharmacopée populaire algérienne pour ses effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire, les troubles digestifs, les infections et les inflammations (**Christian et al., 2006 ; Lin et al., 2005**).

L'intérêt croissant pour cette espèce repose sur sa richesse en métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanines et les acides organiques (**Xavier et al., 2019 ; Falleh et al., 2021**). Ces substances sont connues pour leurs propriétés antioxydantes, permettant de neutraliser les radicaux libres responsables du stress oxydatif, un facteur clé dans l'apparition de nombreuses maladies chroniques telles que les affections cardiovasculaires, le diabète ou certains cancers (**Aurelio et al., 2007**). Parallèlement, plusieurs études récentes ont mis en évidence l'activité antibactérienne de *Hibiscus sabdariffa*, en particulier contre des souches pathogènes responsables d'infections humaines courantes (**Khan et al., 2022**). Cette double activité, antioxydante et antibactérienne, confère à cette plante un potentiel thérapeutique important, justifiant sa valorisation dans des contextes aussi bien médicaux que nutritionnels.

Malgré son usage ancestral et sa place dans la médecine traditionnelle algérienne, il existe encore peu de données systématiques quant à l'effet des paramètres d'extraction (type de solvant, méthode, durée) sur la composition chimique des extraits de cette plante et leur efficacité biologique. Ainsi, une meilleure compréhension de l'influence de ces paramètres permettrait d'optimiser l'extraction des principes actifs et de mieux exploiter les propriétés fonctionnelles de la plante (**Xavier et al., 2019 ; Falleh et al., 2021**).

Dans cette perspective, notre travail vise à extraire, caractériser et évaluer les composés phénoliques présents dans les calices de *Hibiscus sabdariffa*, en analysant leur activité antioxydante par le test DPPH et leur activité antibactérienne vis-à-vis de souches bactériennes pathogènes. L'objectif est d'établir une corrélation entre les conditions d'extraction, la composition des extraits et leur efficacité biologique. Cette étude s'inscrit

ainsi dans une logique de valorisation des ressources végétales locales et de promotion des savoirs traditionnels à la lumière des méthodes scientifiques modernes.

Un premier volet, à caractère bibliographique, est consacré à la présentation générale de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L., en mettant l'accent sur sa classification botanique, sa composition chimique, ainsi que les différentes activités biologiques qui lui sont attribuées selon la littérature scientifique. Le second volet, expérimental, décrit les protocoles méthodologique mis en œuvre pour l'extraction et l'analyse des composés bioactifs à partir des calices, ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante et antibactérienne.

I.1. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques qui ne participent pas directement aux fonctions vitales de base telles que la croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse ou la reproduction. Leur présence est souvent limitée à certaines parties spécifiques de la plante. Ces substances jouent néanmoins un rôle crucial dans divers processus physiologiques et écologiques, notamment dans la protection contre les ravageurs et les agents pathogènes, l'allélopathie, les interactions symbiotiques avec les micro-organismes au niveau des nodules racinaires, ainsi que dans la détermination de la couleur, de l'odeur et du goût des plantes. Elles peuvent également servir d'attractifs pour les pollinisateurs (**Macheix *et al.*, 2005**).

La biosynthèse de ces composés se fait généralement dans une partie de la plante, tandis que leur stockage se fait dans une autre (**Vu Thi Dao, 2008**). On distingue trois grandes familles de métabolites secondaires : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (**Bendif, 2017**).

I.1.1. polyphénols

Les polyphénols font partie des métabolites secondaires les plus largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des molécules de poids moléculaire élevé, présentes dans toutes les parties de la plante (**Achat, 2013**). Ils se caractérisent par un cycle aromatique à six atomes de carbone, portant des groupes hydroxyles, libres ou liés à un glucide. Les principaux types de polyphénols sont les flavonoïdes et les tanins (**Nathalie et Jean-Paul, 2006**).

Ces composés possèdent des propriétés antioxydantes puissantes : ils sont capables de neutraliser les radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique et de réduire divers radicaux (hydroxyles, superoxydes, peroxydes). Grâce à leurs propriétés chélatrices, ils peuvent également piéger les ions métalliques (**Rodrigo *et al.*, 2011**).

I.1.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés en fonction du nombre d'atomes de carbone constituant leur squelette de base. Parmi les principales classes figurent : les acides phénoliques simples, les stilbènes, les coumarines, les tanins, les quinones, les flavonoïdes, les lignanes et les xanthones (**Dacosta, 2003**).

I.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la disponibilité des antioxydants dans l'organisme. Ce déséquilibre peut être dû soit à une insuffisance des mécanismes de défense antioxydante (enzymes ou composés protecteurs), soit à une surproduction de radicaux libres (**Morel et Barouki, 1999**).

I.2.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules possédant un électron non apparié sur leur couche externe, ce qui les rend très réactifs et instables. Lorsqu'ils sont présents en grande quantité, ils peuvent causer des dommages cellulaires importants et perturber le fonctionnement normal des cellules (**Migdal et Serres, 2011**).

Ces espèces réactives apparaissent notamment lors de dysfonctionnements du métabolisme de l'oxygène. La présence d'un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote entraîne la formation de molécules hautement réactives, appelées : Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et Espèces réactives de l'azote (ERA) (**Bendif, 2017**)

I.2.2. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être générés par divers facteurs, qu'ils soient internes (endogènes produits naturellement par l'organisme) ou externes (exogènes provenant de facteurs environnementaux ou externes). Ils résultent de réactions chimiques ou enzymatiques, mais peuvent aussi être induits par des agents physiques comme les rayonnements, la pollution ou le tabagisme.

En particulier, toute réaction impliquant de l'oxygène (O_2) ou un système de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. C'est notamment le cas de la chaîne respiratoire, qui représente une source majeure de production d'ERO. Les principaux sites de cette production sont: Les mitochondries, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. (**Pastre, 2005**).

Les principales sources de production des ERO sont les suivantes :

- **Sources endogènes :** NADPH oxydase Chaîne respiratoire mitochondriale Cytochromes P450, Xanthine oxydase, Cyclo-oxygénases, Lipo-oxygénases et Peroxysomes.
- **Sources exogènes :** Médicaments, Rayonnements électromagnétiques, Métaux de transition ,Pesticides, Xénobiotiques pro-oxydants, Cytokines pro-inflammatoires.

I.2.3. Rôle physiologique des radicaux libres

À des concentrations modérées, les radicaux libres remplissent des fonctions biologiques essentielles. Ils participent notamment : à la maturation cellulaire, à la fertilisation, à l'élimination des déchets toxiques, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (microbes, virus, cellules tumorales) (**Favier, 2003**).

I.2.4. Rôle pathologique des radicaux libres

Les radicaux libres jouent un rôle important dans certains processus physiologiques, mais lorsqu'ils sont produits en excès et dépassent la capacité des systèmes antioxydants, ils deviennent nocifs pour les cellules.

Cette accumulation excessive entraîne des altérations majeures des structures cellulaires, car ces molécules hautement réactives interagissent avec des composants essentiels tels que les protéines, les lipides et l'ADN.

Ces interactions provoquent notamment des modifications des protéines, les rendant plus vulnérables à la dégradation, des peroxydations lipidiques qui compromettent l'intégrité des membranes cellulaires, ainsi que des lésions de l'ADN, telles que des cassures de brins, la perte de nucléotides ou des modifications des bases, susceptibles de perturber la stabilité génétique cellulaire (**Rao et al., 2011**).

I.3. Antioxydants

Les antioxydants sont des composés d'origine naturelle ou synthétique dotés de la capacité de neutraliser les radicaux libres ou d'en limiter les effets délétères. Ces espèces réactives de l'oxygène, lorsqu'elles sont présentes en excès, peuvent induire un stress oxydatif, à l'origine de lésions cellulaires, de dysfonctionnements métaboliques, voire de maladies chroniques. En stabilisant ces radicaux libres, les antioxydants jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire et contribuent à la prévention du vieillissement prématuré et de diverses pathologies dégénératives. Leur origine peut être endogène (enzymes comme la superoxyde dismutase, catalase, glutathion) ou exogène, via l'alimentation (fruits, légumes, épices) (Mohammedi, 2013).

I.3.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont constitués d'enzymes spécialisées capables de neutraliser les radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène. Parmi ces enzymes, on retrouve notamment :

- **La superoxyde dismutase (SOD)** qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), moins réactif.
- **La catalase** : elle transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2), évitant ainsi l'accumulation de ce composé potentiellement toxique.
- **La glutathion peroxydase** : cette enzyme réduit le H_2O_2 et les hydroperoxydes en eau, en utilisant le glutathion comme cofacteur (Guéye, 2007).

I.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques regroupent un ensemble de molécules naturellement présentes dans l'organisme ou apportées par l'alimentation. On distingue notamment : Les vitamines : C, D, E et A, connues pour leur capacité à neutraliser les radicaux libres, les oligo-éléments : tels que le cuivre, le zinc et le sélénium, qui agissent en synergie avec les enzymes antioxydantes, et les caroténoïdes : pigments naturels présents principalement dans les fruits et légumes de couleur jaune, orange ou rouge, aux propriétés antioxydantes marquées (Bendif, 2017)

I.4. Nomenclature de la plante

Hibiscus sabdariffa L., est une plante médicinale, de grande taille, vigoureuse, peu ramifiée et très fibreuse. Cette plante est connue sous diverse appellations et noms vernaculaires :

- ✓ Nom en Arabe : كركديه
- ✓ Nom en Français : Oseille de Guinée.
- ✓ Nom en Anglais : Roselle, Rozelle, Sorrel, Sour-sour.
- ✓ Nom en Espagnol: Flore de Jamaica, Rosa de Jamaica (**Morton, 1987**).
- ✓ Nom en Africain : Karkadé, Bissap, Sorrel (**Shruthi et al., 2016**).
- ✓ Autres dénominations : Thé rose, thé de l'Empire (**Endrias, 2006**).

I.4.1. Position taxonomique

Hibiscus sabdariffa L. appartient à la famille des Malvaceae, une vaste famille de plantes à fleurs regroupant environ 244 genres et 4 225 espèces (**Grubben et Denton, 2004**). Le genre *Hibiscus* lui-même est riche en diversité, comprenant entre 200 et 300 espèces réparties dans différentes régions tropicales et subtropicales du monde. La classification botanique d'*Hibiscus sabdariffa* est la suivante (**Islam, 2019**) :

Régne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Diléniidées
Ordre	Malvales
Famille	Malvacées
Genre	<i>Hibiscus</i> .
Espèce	<i>Hibiscus Sabdariffa</i> L

Cette classification reflète l'appartenance de l'espèce à un groupe de plantes à fleurs dicotylédones caractérisées notamment par la présence de composés mucilagineux, des fleurs souvent voyantes et une grande diversité d'usages alimentaires, médicaux et ornementaux

I.4.2. Répartition géographique

L'origine exacte d'*Hibiscus sabdariffa* L. demeure sujette à débat parmi les chercheurs. Selon **Grubben et Denton (2004)**, l'espèce aurait été initialement cultivée en Afrique, où sa domestication pourrait remonter à environ 6 000 ans, notamment dans la région du Soudan. De là, elle aurait été introduite progressivement dans d'autres parties du monde, telles que l'Asie et les Amériques.

Cependant, d'autres hypothèses suggèrent des origines différentes : **Duke (1993)** avance que *H. sabdariffa* proviendrait des Indes orientales, tandis qu'**Abu-Tarboush et al. (1997)** évoquent une origine potentielle en Arabie Saoudite.

Aujourd'hui, la plante est largement cultivée et disséminée à travers le monde (**Nkumah, 2015**), avec une distribution étendue dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, des Indes occidentales, d'Amérique centrale et d'Asie, où elle s'est bien adaptée aux conditions locales (**Savio et al., 2020**). Des spécimens d'apparence réellement sauvage ont été identifiés au Ghana, au Niger, au Nigeria et en Angola, renforçant l'hypothèse d'une origine africaine (**Grubben et Denton, 2004**).

En Afrique, les principales zones de production sont localisées au Soudan, au Sénégal, au Mali et en Égypte, avec une culture particulièrement intensive dans le nord du Nigeria, où les conditions climatiques sont favorables (**Nkumah, 2015**).

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les plus grands producteurs mondiaux actuels d'*H. sabdariffa* sont la Chine et la Thaïlande. Il est à noter que bien que la FAO classe la roselle du Soudan comme étant de la meilleure qualité, cette dernière souffre toutefois de lacunes en matière d'emballage et de distribution (**Shruthi et Ramachandra, 2019**) (**Figure1**).



Figure 1: Calice de la Plante *Hibiscus sabdariffa* (Castro et al., 2004)

I.4.3. Ecologie

Hibiscus sabdariffa L. est une plante résiliente qui se développe dans une large gamme de conditions édaphiques (Shruthi et Ramachandra, 2019). Bien qu'elle puisse croître sur des sols relativement pauvres, une production optimale à des fins économiques nécessite des sols riches en matières organiques et bien pourvus en éléments nutritifs (Shruthi *et al.*, 2016).

La plante est particulièrement bien adaptée aux climats tropicaux, avec des précipitations annuelles idéales comprises entre 1 500 et 2 000 mm, bien réparties tout au long de l'année. Elle nécessite également au moins 13 heures d'ensoleillement pour éviter une floraison prématurée, et préfère des températures nocturnes supérieures à 21°C, ce qui explique sa prédilection pour les climats chauds et humides (Ismail *et al.*, 2008). Toutefois, des pluies excessives ou une forte humidité au moment de la récolte et du séchage peuvent entraîner une dégradation de la qualité des calices et une diminution du rendement global (McCaleb *et al.*, 2000).

La récolte des différentes parties de la plante (graines, tiges, feuilles et calices) s'effectue généralement de fin décembre à février. Les calices sont récoltés peu après la chute des fleurs, mais avant que les gousses ne deviennent sèches et ne s'ouvrent. Un délai excessif dans la récolte, notamment lorsque les graines commencent à mûrir, peut entraîner une fragilisation des calices, les rendant plus sensibles aux blessures, aux craquelures causées par le soleil, et à une détérioration générale de leur qualité (Nkumah, 2015).

I.4.4. Utilisation traditionnelle

L'utilisation d'*Hibiscus sabdariffa* L. varie considérablement d'un pays à l'autre, influencée par les habitudes alimentaires et les traditions locales. Ses calices séchés sont particulièrement recherchés et utilisés dans la production de divers aliments et boissons, ainsi que dans le traitement de plusieurs affections. En raison de sa richesse en arômes, en couleur et en composés bioactifs, *H. sabdariffa* est devenu un ingrédient prisé dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. Selon Selli *et al.* (2021), ces caractéristiques confèrent à la plante une grande valeur nutritionnelle et thérapeutique, ce qui explique sa popularité croissante à travers le monde.

I.4.4.1. Utilisation médicinale traditionnelle

Hibiscus sabdariffa L., également connue sous le nom de roselle, bénéficie d'un large éventail d'applications médicinales à travers le monde. Cette plante est largement intégrée aux pratiques des médecines traditionnelles. En médecine traditionnelle chinoise, les calices rouges séchés sont utilisés pour traiter diverses affections, notamment l'hypertension, la fièvre et les troubles hépatiques (**Odigie et al., 2003**).

En Afrique, en Inde et au Mexique, des études ethnomédicinales ont montré que les infusions de calices ou de feuilles d'*H. sabdariffa* sont employées pour leurs propriétés hypotensives, cholérétiques et diurétiques. Elles servent également à traiter l'hyperlipidémie, à stimuler le péristaltisme intestinal et à réduire la viscosité sanguine (**Riaz et Chopra, 2018**).

Au Sénégal, une décoction de calices est traditionnellement utilisée comme diurétique et antiseptique urinaire. En Égypte, les calices sont couramment appliqués pour soigner des maladies nerveuses et cardiaques, tout en favorisant la production urinaire (**Leung, 1980**). Par ailleurs, la poudre séchée et les extraits de calices, associés au sel commun, sont employés pour traiter diverses affections telles que la diarrhée, les flatulences, les douleurs lombaires, la dysenterie ainsi que certains troubles gynécologiques, notamment en période post-partum, tant chez l'homme que chez l'animal (**Singh et al., 2006**).

I.4.4.2. Utilisation alimentaire et culinaire

Les calices séchés de *Hibiscus sabdariffa* L. occupent une place importante dans l'alimentation humaine, notamment sous forme de confitures, de gelées, ou encore infusés dans l'eau pour la préparation de boissons, chaudes (comme le thé) ou froides et désaltérantes (jus) (**Shruthi et al., 2016**). Cette utilisation est particulièrement ancrée dans les traditions culinaires d'Afrique et d'Asie. Au Sénégal, par exemple, la boisson préparée à partir de calices séchés est largement consommée, en particulier durant le mois de Ramadan, pour ses vertus rafraîchissantes et digestives (**Chikhouné, 2019**).

Au Nigéria, cette même boisson, appelée *zobo*, est très populaire et appréciée dans toutes les couches sociales (**Cissé et al., 2009**). Par ailleurs, les extraits concentrés ou la poudre obtenue à partir des calices sont utilisés comme colorants naturels, notamment dans les produits de pâtisserie, les boissons et les jus de fruits.

Les anthocyanines, pigments majoritaires des calices, confèrent à la plante son intense coloration rouge-violet et représentent une alternative naturelle intéressante aux colorants synthétiques. Leur utilisation dépasse le domaine alimentaire pour s'étendre aux secteurs pharmaceutique et cosmétique, où elles sont valorisées pour leurs propriétés antioxydantes et leur innocuité (Cissé, 2010).

I.4.5. Composition chimique des calices d'*Hibiscus sabdariffa*

Les extraits issus d'*Hibiscus sabdariffa* révèlent la présence de nombreux métabolites secondaires, notamment des composés phytochimiques et nutritionnels (Nkumah, 2015). Les principaux constituants phytochimiques incluent notamment les anthocyanines, les flavonoïdes, les composés phénoliques ainsi que divers acides organiques (Xiaowei *et al.*, 2021). Parmi les différentes parties de la plante, ce sont les calices qui sont les plus exploités, *H. sabdariffa* étant principalement cultivé pour ceux-ci en raison de leur richesse en composés bioactifs (Aurelio *et al.*, 2007; Ismail *et al.*, 2008).

❖ Acides organiques

Les calices d'*H. sabdariffa* sont particulièrement riches en acides organiques, dominés par les acides succinique et oxalique qui représentent environ 76 % des acides organiques totaux. On y retrouve également une concentration significative d'acide ascorbique, atteignant 141,09 mg/100 g (Wong *et al.*, 2002). D'autres acides, tels que l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide hydroxycitrique et l'acide d'hibiscus ainsi que leurs dérivés sont également présents dans les extraits de calices et de feuilles (Babalola *et al.*, 2001 ; Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

❖ Composés phénoliques

Les composés phénoliques forment un groupe important de métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques associés à des groupes hydroxyles (Alara *et al.*, 2021). D'après Formagio *et al.* (2015), les extraits méthanoliques d'*H. sabdariffa* révèlent une forte teneur en phénols totaux dans les calices, variant entre 454,66 et 474,09 mg/g selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Les anthocyanes représentent la majorité de ces composés phénoliques (Aurelio *et al.*, 2007), accompagnés d'autres composés tels que l'acide protocatéchique (Lin *et al.*, 2003) ainsi que des polyphénols de type flavanol, flavanol et flavonoïdes (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une classe de métabolites secondaires ubiquitaire dans le règne végétal, jouant un rôle dans la coloration, l'arôme et diverses fonctions biologiques (Panche *et al.*, 2016). Les calices présentent les teneurs les plus élevées en flavonoïdes (148,35 mg/g), comparativement aux feuilles (Formagio *et al.*, 2015). Parmi les flavonoïdes identifiés figurent la sabdaritrine, l'hibiscitrine (hibiscétine-3- glucoside), la gossytrine, la gossypitrine, la quercétine, la lutéoline, l'acide chlorogénique, l'acide protocatéchique, l'acide pèlargonidique, l'eugénol ainsi que les phytostérols tels que le β -sitostérol et l'ergostérol (Prasetyoputri *et al.*, 2021).

❖ Anthocyanes

Les anthocyanes, largement répandues dans le règne végétal, sont responsables d'une vaste gamme de couleurs (Holton et Cornish, 1995). *H. sabdariffa* est particulièrement riche en anthocyanes, notamment dans ses calices rouges (Mazza, 2018). Les principaux anthocyanes identifiés sont la delphinidine 3-sambubioside (hibiscine), la cyanidine 3-sambubioside (gossypicyanine), la delphinidine 3-glucoside et la cyanidine 3-glucoside (Aurelio *et al.*, 2007). La delphinidine 3-sambubioside est la plus abondante, représentant jusqu'à 70 % de la teneur totale en anthocyanes (Wang *et al.*, 2000 ; Herrera-Arellano *et al.*, 2004). Selon Juliani *et al.* (2009), la teneur totale en anthocyanes des calices varie de 0,3 à 2,4 %, pouvant atteindre 1,5 g/kg de matière sèche.

❖ Acide protocatéchique

L'acide protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque) est un acide phénolique majeur présent dans les calices, représentant environ 24,24 % des composés identifiés (Da- Costa-Rocha *et al.*, 2014).

1.4.6. Composition nutritionnelle

Les analyses nutritionnelles ont montré que les calices contiennent des protéines (1,9 g/100 g), des lipides (0,1 g/100 g), des glucides (12,3 g/100 g) et des fibres alimentaires (2,3 g/100 g). Ils sont également une bonne source de vitamine C (14 mg/100 g) et de β -carotène (300 mg/100 g) (Ismail *et al.*, 2008). Des études ont également identifié la présence de minéraux tels que l'aluminium, le chrome, le cuivre, le nickel (Wróbel *et al.*, 2000), ainsi que du calcium (25 mg/100 g) et du fer (55,5 mg/100 g) (Ahmed *et al.*, 2019).

Selon **Cissé *et al.* (2011)**, les calices présentent des teneurs intéressantes en potassium et en calcium, le potassium étant le minéral prédominant comme dans la majorité des produits d'origine végétale.

1.4.7. Activités biologiques

Hibiscus sabdariffa L. est reconnu pour ses nombreuses activités pharmacologiques, parmi lesquelles figurent une forte activité antioxydante et antiradicalaire, ainsi que des effets anti-inflammatoires, anti-obésité, antihyperlipidémiques et antihypertensifs, ainsi qu'une capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire et à favoriser la diurèse ce qui contribue à la prévention des maladies cardiovasculaires (**Riaz et Chopra, 2018**). Ces effets bénéfiques soulignent l'intérêt croissant porté à cette plante pour ses applications potentielles en prévention et en traitement de plusieurs troubles métaboliques et cardiovasculaires.

Les substances bioactives présentes dans *H. sabdariffa* confèrent à la plante une diversité d'activités pharmacologiques notables, notamment des propriétés antioxydantes et antiradicalaires puissantes (**Yang *et al.*, 2012 ; Formagio *et al.*, 2015 ; Apak *et al.*, 2004 ; Cissé *et al.*, 2011**). Ces effets sont attribués à leur capacité à neutraliser efficacement les radicaux libres, parfois avec une efficacité supérieure à celle de l'acide ascorbique.

Outre son potentiel antioxydant, *H. sabdariffa* L. présente également des effets anti-inflammatoires démontrés. **Shallangwa *et al.* (2017)** ont mis en évidence la capacité des extraits de calices à inhiber la dénaturation des protéines, un mécanisme fréquemment impliqué dans les processus inflammatoires.

Sur le plan métabolique, la plante est reconnue pour ses propriétés antihyperlipidémiques, anti-obésité et diurétiques, ainsi que pour sa capacité à prévenir l'agrégation plaquettaire, jouant ainsi un rôle important dans la prévention des pathologies cardiovasculaires (**Riaz & Chopra, 2018**).

Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence une activité antimicrobienne significative des extraits de calices contre des pathogènes tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*, renforçant l'intérêt de *H. sabdariffa* pour des applications pharmaceutiques et agroalimentaires (**Yin *et al.*, 2008 ; Das, 2014**).

L'activité anticancéreuse de *H. sabdariffa* a également été explorée. **Lin *et al.* (2005)** ont observé une induction de l'apoptose dans différentes lignées cellulaires tumorales, un

effet attribué notamment à la présence d'anthocyanes spécifiques, tels que la delphinidine-3-sambubioside (**Chang *et al.*, 2005**). Ces résultats suggèrent un potentiel prometteur pour cette plante dans le développement de stratégies thérapeutiques anticancéreuses.

Enfin, plusieurs essais cliniques ont confirmé l'efficacité de *H. sabdariffa* dans la réduction de la pression artérielle. Une consommation régulière d'extraits ou d'infusions à base de calices a permis une baisse significative de la tension chez des patients hypertendus (**Hopkins *et al.*, 2013 ; Jalalyazdi *et al.*, 2019**). Par ailleurs, l'effet antipyrétique a été mis en évidence par **Reanmongkol et Itharat (2007)**, qui ont observé une réduction notable de la fièvre chez le rat après administration d'extraits éthanoliques.

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

Les expérimentations ont été réalisées au sein du laboratoire de Biochimie la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, située à Bordj Bou Arreridj (Algérie).

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel végétal

La plante a été achetée dans une herboristerie située dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie). Selon les informations fournies par l'herboriste, l'origine géographique de la plante serait l'Irak. Le matériel végétal a été soigneusement lavé à l'eau distillée, puis séché à l'air libre. Une fois bien séchés, les calices ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

II.1.2. Souches bactériennes

Quatre souches bactériennes ont été sélectionnées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Deux d'entre elles sont des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), et deux sont des bactéries à Gram positif : *Bacillus cereus* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). L'ensemble des souches utilisées dans cette étude a été fourni par le laboratoire de microbiologie de de l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arreridj.

II.1.3. Matériel non biologique

La réalisation des expériences de cette étude a fait appel à un matériel classique composé de verreries, d'équipements et d'appareillages, il comprend aussi un ensemble de réactifs et de produits chimiques. comme l'Acide gallique, Quercetine, folin-ciocalteu, (Chlorure de fer), Méthanol, Eau distillée et 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH).

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de la plante

permettant de retenir une fraction de taille inférieure ou égale à 200 μm . La poudre obtenue a été conservée dans des bocaux en verre, hermétiquement fermés et placés à l'abri de la lumière, en attendant son utilisation pour les différentes étapes (**Figure 2**).

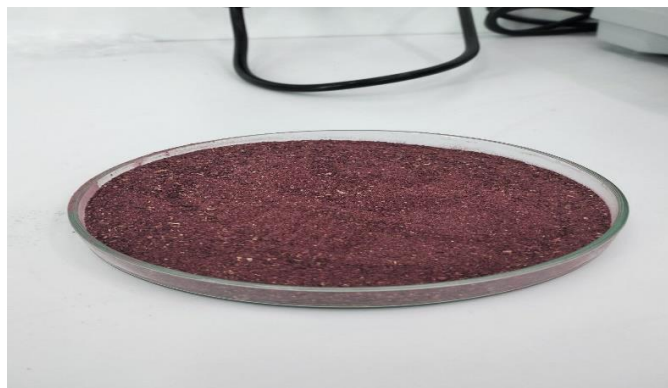


Figure 2 : Broyat d'*Hibiscus sabdariffa* L utilisé pour l'extraction.

II.2.2 Extraction

L'extraction des composés phénoliques d'*Hibiscus sabdariffa* a été réalisée selon la méthode décrite par **Markham (1982)**. Cette opération consiste à immerger la poudre végétale dans un solvant afin d'extraire les principes actifs.

Deux types de macérations ont été effectués. Pour le premier extrait, 50 g de matière végétale broyée ont été mis en contact avec 425 ml d'éthanol et 75 ml d'eau distillée (rapport éthanol/eau : 85/15, v/v). Le mélange a été soumis à une agitation douce et maintenu en macération pendant 48 heures à température ambiante.

Le second extrait a été obtenu selon la même procédure, mais avec un temps de macération prolongé de 7 jours, toujours sous agitation douce, afin d'optimiser le rendement d'extraction.

Les deux extraits macérés ont ensuite été filtrés, puis concentrés par évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, permettant l'élimination du solvant et la récupération des composés actifs.

Le troisième extrait, désigné par l'abréviation DEC, a été préparé par décoction selon la méthode décrite par **Guemmaz et al. (2020)**. Pour cela, 100 g de matière végétale ont été portés à ébullition 100 °C dans 1 L d'eau distillée pendant une durée 20 min, puis filtrés.

Tous les extraits obtenus ont été séchés dans une étuve ventilée à 40 °C représentant les extraits bruts. Ces derniers ont été conservés dans des flacons en verre ambré, hermétiquement fermés, étiquetés, et stockés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation expérimentale (**Figure 3**).

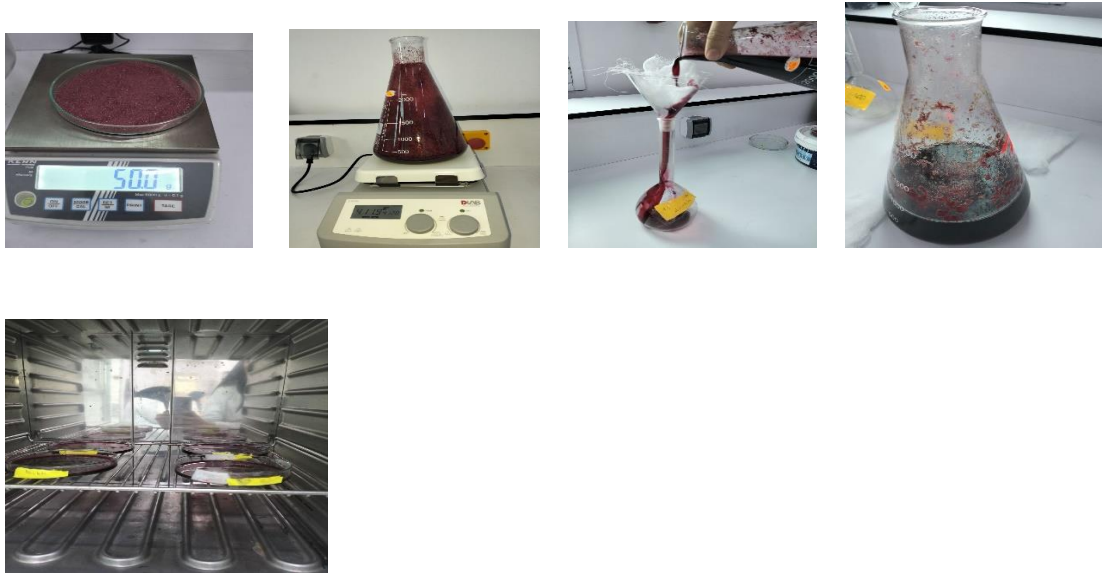


Figure 3: Principales étapes du processus d'extraction des composés phénoliques à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*.

II.2.2.1 Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est calculé en pourcentage R (%) du rapport de la masse de L'extrait obtenu sur la masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction.

$$R (\%) = (M/Mt) \times 100$$

- ✓ M : masse de l'extrait brut obtenue (en g).
- ✓ Mt : masse du matériel végétal à traiter (en g).

II.2.3 Analyses phytochimiques

Le taux de polyphénols totaux dans les extraits a été évalué par la méthode de Folin-Ciocalteu (Lister et Wilson, 2001), et par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium (Dewanto *et al.*, 2002) respectivement.

II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits de *Hibiscus sabdariffa* L. a été déterminée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, telle que décrite par **Boumerfeg et al. (2012)**, avec quelques modifications. Un volume de 200 µl de chaque extrait ou de la solution standard (acide gallique) a été mélangé à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué à 1/10. Après agitation, le mélange a été incubé pendant 4 minutes puis complété par l'ajout de 800 µL de solution de carbonate de sodium (75 g/l). L'incubation s'est poursuivie durant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque échantillon a ensuite été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration des composés phénoliques totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec des concentrations croissantes d'acide gallique (20 à 160 µg/ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts a été déterminée par la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium (AlCl₃), décrite par **Dewanto et al. (2002)**, avec la quercétine comme standard de référence.

Le mélange réactionnel a été préparé en ajoutant 1 ml de chaque extrait à 1 ml de solution de trichlorure d'aluminium (2 % dans le méthanol). Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La même procédure a été appliquée à la solution standard de quercétine pour établir une courbe d'étalonnage. La concentration en flavonoïdes a été calculée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue, et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g ES).

II.2.4. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

II.2.4.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des trois extraits a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Ce test repose sur la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) par sa décoloration de couleur violette foncée en couleur jaunâtre due à sa réduction en présence de capteurs des radicaux libres. Ce test consiste à incuber 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits et de standard avec 1.25 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 % pendant 30 minutes, les absorbances ont été enregistrées à 517 nm (**Boumerfeg et al., 2012**).

Les résultats obtenus ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence (**Figure 4**). Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits de a été calculé comme suit :

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

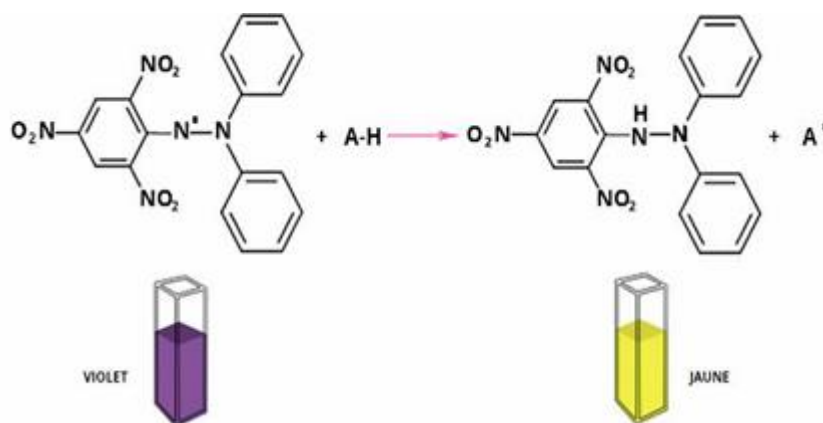


Figure 4 : Réduction du DPPH.

II.2.5 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des trois extraits a été testée selon la méthode décrite par **Rahal (2005)** contre quatre souches bactériennes ATCC (deux bactéries à Gram positif et deux souches à Gram négatif pathogènes pour l'homme), Cette activité est effectuée par la méthode de diffusion en puits sur la gélose.

L'effet antibactérien des trois extraits est examiné en utilisant le milieu Mueller- Hinton (MH) car c'est le milieu approprié pour le développement des bactéries.

Avant de commencer l'activité, une étape de stérilisation et d'autoclavage du matériel à 121°C pendant 15 minutes est enregistré (L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les embouts jaunes et bleus enrobés dans du papier aluminium). Le milieu est coulé dans des boîtes pétries stériles avec une épaisseur de 4mm et laissé pour 30 min avant l'utilisation (20ml de MH correspond 4mm d'épaisseur).

Quatre concentrations de chaque extrait sont préparées dans le DMSO (150, 100, 50 et 25 mg/ml). Les bactéries sont cultivées sur la gélose Mueller Hinton (MH) 18 h avant d'entamer l'expérience, ensuite une ou plusieurs colonies de chaque culture pure de ces bactéries sont prélevées et transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile (NaCl 0.9 %), afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité équivalente à 0.5 Mc Farland, ce qui est traduit par une absorbance comprise entre 0.08 et 0.1 à 625 nm (**Falleh et al., 2008**). L'inoculum est ajusté en ajoutant, soit de la culture bactérienne, s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. A partir de cet inoculum, les souches bactériennes sont étalées par écouvillonnage (un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne et chargé au maximum), sur la totalité de la surface gélosée en stries serrés sur le milieu Mueller Hinton dans des boîtes de Pétri (**Rahal., 2005**).

II.2.5.1 Méthode de diffusion en puit sur gélose

Une fois l'ensemencement est effectué, la gélose est perforée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et coupée afin d'obtenir des puits de 06 mm de diamètre, et remplis par 50 μ l de chaque extrait en quatre concentrations (150, 100, 50 et 25mg/ml), Ensuite les boîtes sont placées au réfrigérateur 2 h pour éviter l'écoulement de l'extrait. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. L'effet inhibiteur se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions produites et exprimées en millimètres (**Ismail et al., 2008**).

II.3 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD). Les différences entre les moyennes des groupes ont été évaluées par une analyse de variance unidirectionnelle (One-Way ANOVA), suivie du test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples (seuil de signification fixé à $p \leq 0,001$). Une analyse de régression linéaire a été réalisée afin de déterminer la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) pour chaque test antioxydant. L'ensemble des analyses statistiques a été effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism®, version 7.0.

Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion

III.1 Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération hydro-éthanolique pendant 2 jours et 7 jours, et la décoction par l'eau distillée, pour extraire la majorité des composés bioactifs contenus dans cette plante.

Rendements de l'extraction

Les rendements d'extraction ont montré des variations significatives selon la méthode utilisée. La macération hydro-éthanolique pendant 48 heures a permis d'obtenir le rendement le plus élevé (64,84 %), suivie de la décoction (32,42 %) et enfin de la macération prolongée sur 7 jours (29,2 %). Ces différences s'expliquent par divers facteurs liés à la nature des solvants, à la température et à la durée d'extraction (**Tableau1**).

La macération de 48 heures semble offrir un compromis optimal entre temps d'exposition et température ambiante, favorisant une diffusion efficace des métabolites secondaires tout en évitant leur dégradation thermique (**Meroua & Kerrouche, 2024**). Ce procédé apparaît donc particulièrement adapté à l'extraction des composés sensibles à la chaleur.

Toutefois, bien que la décoction permette l'extraction de composés hydrosolubles tels que les polysaccharides, les polyphénols et les flavonoïdes, son rendement reste modéré. Cette méthode implique une exposition prolongée à des températures élevées, susceptibles d'altérer partiellement les substances thermosensibles, ce qui peut compromettre l'efficacité globale du processus d'extraction.

De façon surprenante, la macération prolongée sur sept jours a conduit au rendement le plus faible. Cette diminution pourrait résulter de la dégradation progressive de certains constituants bioactifs, d'une saturation du solvant limitant la solubilisation supplémentaire, ou encore de phénomènes d'oxydation et de contamination microbienne liés à l'exposition prolongée au milieu aqueux (**Mekhoukhe et al., 2016**).

Tableau1 : Rendement d'extraction (%) des extraits obtenus à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*

Méthodes d'extractions	Rendement
Décoction	32,42
M2	64,84 %
M7	29,2 %

Dans une étude comparable, Singh et al. (2021) ont rapporté un rendement d'extraction de 15,01 % pour l'extrait éthanolique et de 29,96 % pour l'extrait aqueux. Si ces valeurs se rapprochent de celles obtenues dans notre étude pour l'extrait aqueux, elles diffèrent notablement de celles observées pour l'extrait éthanolique, notamment dans le cas de la macération de 48 heures (M2), dont le rendement atteint 64,84 %. De même, **Shallangwa et al. (2017)**, utilisant le méthanol, un solvant de polarité similaire à celle de l'éthanol, ont obtenu un rendement comparable à celui de notre macération de 7 jours (M7), mais nettement inférieur à celui de M2, lequel s'avère presque deux fois plus élevé (39,82 %).

Les résultats de **Yagi et Hussein (2020)** confirment les nôtres, avec un rendement éthanolique atteignant 77,2 % et des valeurs comparables pour l'extrait aqueux. Ces écarts entre les études soulignent l'influence majeure des conditions opératoires (telles que la durée, la température, la nature du solvant et la méthode d'extraction, sur le rendement final. À cet égard, plusieurs auteurs s'accordent sur l'efficacité supérieure des solvants mixtes (eau/éthanol ou eau/méthanol), dont la synergie de propriétés physico-chimiques favorise une meilleure solubilisation et diffusion des composés phénoliques dans la phase liquide, comparativement à l'usage de solvants purs.

Ainsi, les données de notre étude, mises en parallèle avec celles de la littérature, confirment la supériorité des systèmes hydro-organiques, notamment dans le cadre d'une macération hydro-éthanolique de courte durée. Cette dernière s'est révélée la plus performante pour l'extraction des composés bioactifs de *Hibiscus sabdariffa*, surpassant aussi bien la décoction que la macération prolongée. L'association eau-éthanol semble optimiser l'extraction des polyphénols tout en facilitant l'évaporation du solvant, ce qui en fait une méthode particulièrement avantageuse. Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale d'une optimisation fine des paramètres d'extraction, en particulier dans une perspective d'exploitation thérapeutique ou industrielle des extraits végétaux.

III.2 Caractérisation phytochimique

III.2.1 Teneurs en polyphénols

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard de référence. La teneur en composés phénoliques a été déterminée à partir de l'équation de la droite de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (**Figure 5**) et exprimée en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g E).

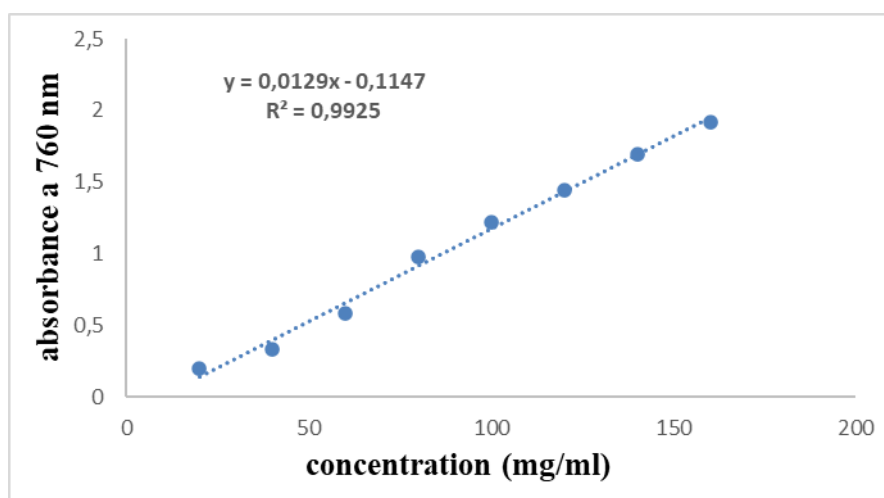


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

L'extrait M7 présente la plus forte teneur en polyphénols totaux ($88,32 \pm 5,85$ mg EAG/g), suivi de l'extrait M2 ($52,87 \pm 9,33$ mg EAG/g), tandis que l'extrait aqueux brut obtenu par décoction (DEC) montre la concentration la plus faible ($12,48 \pm 3,13$ mg EAG/g). Ces écarts sont statistiquement très significatifs ($p < 0,001$), indiquant une influence marquée de la méthode d'extraction sur la concentration en composés phénoliques (**Tableau 2**).

La macération prolongée (M7) semble ainsi favoriser une extraction plus efficace des polyphénols, probablement grâce à un contact prolongé entre le solvant et la matrice végétale, facilitant la solubilisation et la diffusion de ces composés dans le milieu extracteur. Cependant, cette méthode n'a pas généré le rendement global le plus élevé, ce qui souligne un compromis possible entre quantité d'extrait obtenu et richesse en principes actifs.

Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale des paramètres opératoires, notamment la durée d'extraction, la nature du solvant et la température, dans l'optimisation de la récupération des composés bioactifs, en particulier les polyphénols, largement reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. Un ajustement judicieux de ces paramètres est donc essentiel pour maximiser la qualité phytochimique des extraits, en fonction de l'objectif visé (thérapeutique, nutritionnel ou industriel).

Tableau2 : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) et en flavonoïdes (mg EQ/g) des extraits d'*Hibiscus sabdariffa*.

	DEC	M2	M7
polyphénols	12,483±3,13	52,87±9,33**	88,32±5,85***
Flavonoïdes	13,25±0,33	35,62 ±3,002*	32,91± 0,924***

Les résultats obtenus pour l'extrait M2 révèlent une teneur en polyphénols ($52,87 \pm 9,33$ mg EAG/g) nettement supérieure à celle rapportée par **Das (2014)**, qui avait obtenu 34 mg EAG/g d'extrait dans des conditions d'extraction comparables (macération hydro-éthanolique pendant deux jours). De même, l'extrait M7 ($88,32 \pm 5,85$ mg EAG/g) dépasse largement les valeurs rapportées par **Shallangwa et al. (2017)**, qui avaient obtenu 21,87 mg EAG/g en appliquant une méthode d'extraction similaire.

Concernant l'extrait aqueux obtenu par décoction (DEC), sa teneur en polyphénols ($12,48 \pm 3,13$ mg EAG/g) s'avère significativement plus élevée que celle obtenue par **Mohd-Esa et al. (2010)**, qui ont rapporté seulement 1,85 mg EAG/g suite à une décoction à 80 °C. Cette différence marquée peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que la température et la durée d'ébullition, mais aussi à des variables liées à la matière première elle-même (origine géographique, état physiologique, conditions de séchage).

Les extraits obtenus par macération hydro-éthanolique (M2 et M7) se distinguent ainsi par leur richesse en polyphénols par rapport à l'extrait aqueux, ce qui confirme l'efficacité accrue des solvants mixtes pour l'extraction de composés phénoliques. Ces observations sont en accord avec les travaux de **Guemmaz et al. (2020)**, qui ont montré que la macération dans un solvant organique (méthanol) permettait d'obtenir des extraits plus concentrés en polyphénols que ceux obtenus par décoction aqueuse.

III.2.2 Teneurs en flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent l'un des groupes les plus diversifiés et omniprésents parmi les composés naturels, et sont généralement considérés comme les polyphénols les plus représentatifs. Leur importance réside dans la diversité de leurs activités chimiques et biologiques, notamment leurs puissantes propriétés antiradicalaires (**Boumerfeg et al., 2018**).

La quantification des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), largement utilisée en raison de sa simplicité, de son faible coût et de sa bonne sensibilité. Ce protocole repose sur la formation d'un complexe stable entre les

ions Al^{3+} et les groupements hydroxyles des flavonoïdes, réaction spécifique qui permet de les doser en présence d'autres composés phénoliques non réactifs avec ce réactif. L'analyse quantitative a été effectuée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (**Figure 6**), et les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (μg EQ/mg E).

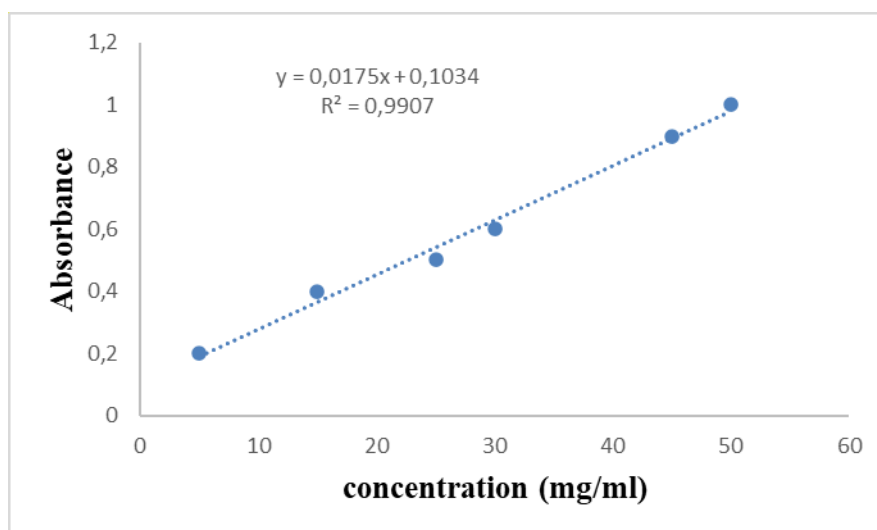


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats obtenus (**Tableau 2**) indiquent que les extraits M2 et M7 présentent des concentrations en flavonoïdes significativement plus élevées que l'extrait aqueux DEC. Bien que la teneur soit légèrement inférieure pour M7 ($32,91 \pm 0,92$ mg EQ/g) par rapport à M2 ($35,62 \pm 3,00$ mg EQ/g), cette différence n'est pas statistiquement significative (ns ; $p < 0,001$), suggérant que les deux protocoles de macération hydro-éthanolique offrent une efficacité comparable pour l'extraction de ces composés.

Les variations observées dans les teneurs en flavonoïdes suivent la même tendance que celles des polyphénols totaux, en fonction de la nature du solvant et de la méthode d'extraction utilisée. Les macérations hydroalcooliques se sont révélées les plus performantes, tandis que l'extrait obtenu par décoction a présenté les concentrations les plus faibles. Cette faible teneur peut s'expliquer par la sensibilité des flavonoïdes à la chaleur, qui favorise leur oxydation et leur dégradation lors d'une exposition prolongée à une température élevée (**Shahidi et Yeo, 2016**).

Le choix du solvant s'avère donc déterminant dans l'extraction des composés phénoliques. Les solvants organiques comme l'éthanol, notamment en mélange avec l'eau, permettent une meilleure solubilisation des flavonoïdes en raison de leur polarité intermédiaire. Par ailleurs, la différence entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes peut s'expliquer par la co-extraction éventuelle de composés non phénoliques (tels que sucres, protéines ou pigments) susceptibles d'interférer avec les méthodes spectrophotométriques de dosage (Do *et al.*, 2014).

III.3 Evaluation de l'activité antioxydante

III.3.1 Test DPPH

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) constitue l'une des méthodes les plus répandues pour l'évaluation de l'activité antioxydante, en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité, de sa sensibilité élevée et de sa bonne reproductibilité (Akar *et al.*, 2017). Il présente également l'avantage de pouvoir être réalisé à température ambiante, limitant ainsi les risques de dégradation thermique des composés bioactifs, tout en permettant l'analyse simultanée de nombreux échantillons à un coût modéré.

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical libre DPPH•, caractérisé par une coloration violette intense due à la présence d'un électron non apparié sur l'atome d'azote. En présence d'un antioxydant, ce radical est réduit en une forme non radicalaire, entraînant un changement de couleur vers le jaune pâle. Cette variation d'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm (Musa *et al.*, 2016). La réaction fait intervenir à la fois des mécanismes de transfert d'électron (SET) et de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT).

L'activité antioxydante des extraits est évaluée à partir de la variation de leur pouvoir antiradicalaire en fonction de la concentration. L'IC₅₀, c'est-à-dire la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH•, est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire établie pour chaque extrait. Une faible valeur d'IC₅₀ traduit une forte capacité antioxydante.

Les résultats obtenus (présentés sous forme d'IC₅₀) montrent que les trois extraits testés possèdent une activité antiradicalaire notable. Toutefois, des différences significatives ont été relevées entre les extraits, ainsi qu'en comparaison avec le BHT (butylhydroxytoluène),

utilisé comme antioxydant de référence. Ces écarts reflètent une efficacité antioxydante variable selon le type d'extrait, probablement liée à leur composition en composés phénoliques et flavonoïdiques (**Figure7**).

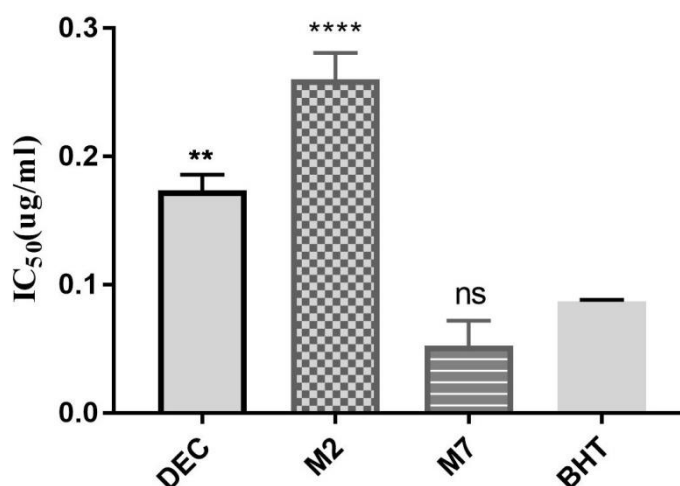


Figure7 : Activité antiradicalaire des trois extraits d'*Hibiscus sabdariffa* comparée à celle du standard (BHT).

L'extrait M7 a présenté une activité antioxydante marquée vis-à-vis du radical DPPH, avec une valeur d'IC₅₀ de 0,0525 ± 0,019 mg/ml. Cette efficacité est comparable à celle du BHT, antioxydant de référence (IC₅₀ = 0,08 ± 0,005 mg/ml), aucune différence statistiquement significative n'ayant été observée ($p \leq 0,001$). Ainsi, l'extrait M7 se distingue comme le plus performant parmi les extraits testés.

De manière surprenante, l'extrait aqueux DEC a montré une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait M2, avec une valeur d'IC₅₀ de 0,17 ± 0,039 mg/ml contre 0,26 ± 0,02 mg/ml respectivement. Cette observation suggère que, bien que moins riche en polyphénols, l'extrait DEC pourrait contenir d'autres composés hydrosolubles bioactifs contribuant à l'effet antiradicalaire.

En comparaison avec la littérature, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique rapportée par Das (2014) (IC₅₀ = 0,058 mg/ml) reste inférieure à celle obtenue dans notre étude pour l'extrait M7, tandis que **Formagio et al. (2015)** ont rapporté une activité encore plus faible (IC₅₀ = 0,037 mg/ml). Ces différences pourraient s'expliquer par les conditions d'extraction, la durée de macération, la nature du solvant et les caractéristiques de la matière végétale utilisée.

L'efficacité antioxydante accrue observée avec les extraits éthanoliques de macération longue durée souligne l'impact du temps de contact solvant/matrice sur l'extraction des composés actifs. Cette relation a été confirmée dans plusieurs travaux antérieurs, notamment par **Hayouni et al. (2007)**, qui ont mis en évidence le rôle clé du solvant dans la modulation à la fois du rendement et de l'activité antioxydante.

Sur la base de l'ensemble des résultats, une corrélation positive peut être établie entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits, ce qui suggère que l'effet antiradicalaire est fortement influencé par la concentration en composés phénoliques. Cette relation a été démontrée dans de nombreuses études (**Stagos, 2019 ; Righi et al., 2021 ; Chadi et al., 2024**).

En conclusion, cette étude met en évidence le potentiel antioxydant significatif des extraits de *Hibiscus sabdariffa*, en particulier ceux issus de la macération hydro-éthanolique, positionnant cette plante comme une source prometteuse d'antioxydants naturels pour des applications nutritionnelles, pharmaceutiques ou cosmétiques.

III.4 Evaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats obtenus (**Tableau 3**) mettent en évidence une activité antibactérienne dose-dépendante des extraits testés, qui varie selon la souche bactérienne et le type d'extrait utilisé. D'une manière générale, plus la concentration de l'extrait augmente, plus le diamètre des zones d'inhibition s'élargit, traduisant une efficacité croissante. Cette tendance confirme la nature dose-réponse de l'activité antimicrobienne observée.

Chez *Staphylococcus aureus*, seul l'extrait DEC a montré une activité antibactérienne à toutes les concentrations testées, atteignant un diamètre d'inhibition maximal de 21 mm à 150 mg/ml, contre 18 mm pour M2. L'extrait M7 n'a pas été testé contre cette souche (nt).

Pour *Bacillus subtilis*, les extraits M2 et M7 ont présenté une bonne activité antibactérienne, en particulier à 100 et 150 mg/ml, avec des zones d'inhibition atteignant 20 mm pour M2 et 18 mm pour M7. En revanche, l'extrait DEC n'a pas montré d'effet inhibiteur contre cette souche (nt).

Concernant *Escherichia coli*, les trois extraits ont montré une efficacité comparable, avec des zones d'inhibition atteignant 15 mm à 150 mg/ml. Cette activité est modérée mais

constante à travers les concentrations.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, souche souvent résistante, une activité notable a également été observée. L'extrait M7 s'est révélé le plus actif, avec un diamètre d'inhibition atteignant 24 mm à 150 mg/ml, surpassant DEC (12 mm) et M2 (16 mm). Ce résultat suggère une efficacité marquée de l'extrait M7 contre les souches à Gram négatif résistantes.

Tableau 3 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) selon les concentrations des extraits (mg/ml)

Souche bactérienne	DEC Concentration (mg/ml)				M2 Concentration (mg/ml)				M7 Concentration (mg/ml)			
	25	50	100	150	25	50	100	150	25	50	100	150
<i>S. aureus</i>	6	10	15	21	6	8	12	18	nt	Nt	Nt	nt
<i>B. subtilis</i>	nt	nt	nt	nt	6	8	15	20	8	9	10	18
<i>E. coli</i>	6	10	12	15	12	9	12	15	6	9	12	15
<i>P. aeruginosa</i>	5	7	9	12	7	9	10	16	7	9	14	24

nt : non testé

Les résultats obtenus (**Tableau 3**) révèlent une activité antibactérienne dose-dépendante des extraits d'*Hibiscus sabdariffa*, variant selon la méthode d'extraction et la souche bactérienne testée. Tous les extraits ont induit une inhibition mesurable de la croissance bactérienne, avec des diamètres de zones d'inhibition croissant en fonction de la concentration appliquée, ce qui traduit une relation directe entre la concentration des composés bioactifs et l'efficacité antimicrobienne.

L'extrait obtenu par décoction (DEC) s'est distingué par une activité modérée à marquée, particulièrement contre *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 21 mm à 150 mg/ml), mais aussi contre *Escherichia coli* (15 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm). Cette efficacité peut être attribuée à l'action thermique, qui favorise l'extraction de composés hydrosolubles tels que les anthocyanes, les flavonoïdes et certains acides organiques.

En revanche, l'extrait issu de la macération courte (M2, 48 h) a montré une activité légèrement inférieure, notamment contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. L'absence de chaleur pourrait expliquer la plus faible extraction de certains métabolites actifs. Toutefois,

cet extrait s'est révélé particulièrement efficace contre *Bacillus subtilis* (20 mm), démontrant une activité spécifique selon la structure des parois bactériennes.

L'extrait obtenu par macération prolongée (M7, 7 jours) a montré une activité antibactérienne comparable, voire supérieure à celle de la décoction, en particulier contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* (jusqu'à 24 mm). Le contact prolongé entre la matière végétale et le solvant a probablement permis une extraction plus complète et plus douce des composés actifs, en l'absence d'altération thermique. Ces résultats indiquent une affinité accrue des extraits riches en phénoliques pour les bactéries à Gram positif, en particulier *S. aureus*.

Dans l'ensemble, la macération prolongée apparaît comme la méthode la plus efficace, suivie par la décoction, puis la macération courte. Ces différences soulignent l'impact déterminant des paramètres d'extraction (durée, température, nature du solvant) sur la composition phytochimique des extraits et leur efficacité biologique.

L'activité antimicrobienne observée est en grande partie liée à la nature des métabolites secondaires extraits, tels que les polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et anthraquinones. Ces composés exercent des effets inhibiteurs par différents mécanismes : complexation des protéines membranaires, altération de la perméabilité cellulaire ou inhibition des enzymes bactériennes clés. En particulier, les tanins sont connus pour leur capacité à précipiter les protéines et perturber les fonctions enzymatiques, ce qui inhibe efficacement la croissance bactérienne.

Ces observations sont en accord avec les travaux de **Suman *et al.* (2014)**, qui ont mis en évidence l'effet antimicrobien et antioxydant des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Notre étude va plus loin en comparant plusieurs méthodes d'extraction (macération courte, longue et décoction), ce qui permet de mieux cerner l'influence des solvants et des conditions d'extraction sur l'activité antimicrobienne.

De plus, nos résultats corroborent ceux d'**Al-Hashimi *et al.* (2012)**, qui ont montré que les extraits éthanoliques contiennent une teneur plus élevée en polyphénols que les extraits aqueux. Cette richesse en composés actifs se traduit par une activité antioxydante et antimicrobienne accrue, en lien avec la présence d'anthocyanes, d'acide ascorbique et d'autres molécules bioactives.

Contrairement à certaines études antérieures limitées à *S. aureus* et *E. coli* (**Suman et al., 2014 ; Olaleye et al., 2017**), notre travail a élargi le spectre des souches testées en incluant également *Bacillus subtilis* et *P. aeruginosa*, permettant une évaluation plus complète de l'efficacité antibactérienne.

En conclusion, nos résultats confirment que l'origine des effets antibactériens observés dans les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* réside dans la présence de composés phytochimiques bioactifs, dont la concentration et la nature dépendent fortement de la méthode d'extraction employée. Ces extraits, en particulier ceux issus de la macération prolongée, représentent une source prometteuse d'agents antimicrobiens naturels, potentiellement exploitables dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Dans un contexte où les maladies liées au stress oxydatif sont en augmentation et où la résistance des agents pathogènes aux traitements conventionnels devient une problématique majeure de santé publique, l'intérêt pour les ressources naturelles, en particulier les plantes médicinales riches en composés bioactifs, connaît un regain d'actualité. La présente étude s'inscrit dans cette dynamique en valorisant les calices de *Hibiscus sabdariffa* L., plante traditionnellement reconnue pour ses vertus thérapeutiques multiples.

L'évaluation comparative de différentes méthodes d'extraction (décoction, macération courte et prolongée) a permis de caractériser les extraits obtenus en termes de rendement, de teneur en polyphénols et flavonoïdes, ainsi que d'activités antioxydante (test DPPH) et antibactérienne. Parmi les résultats notables, l'extrait hydroéthanolique obtenu par macération de 48 heures (M2) a affiché le meilleur rendement d'extraction et la concentration la plus élevée en polyphénols, confirmant ainsi l'efficacité de l'éthanol, notamment en mélange avec l'eau, pour la récupération de ces composés.

Par ailleurs, l'extrait aqueux (DEC) a révélé une capacité antioxydante intéressante, suggérant que des molécules hydrosolubles autres que les polyphénols, telles que l'acide ascorbique ou certains pigments, pourraient également contribuer à l'effet antiradicalaire observé. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, tous les extraits ont démontré une efficacité notable, en particulier contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, résultats attribuables à l'action synergique de métabolites secondaires tels que les tanins, flavonoïdes et alcaloïdes, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Ces données mettent en évidence le potentiel thérapeutique et fonctionnel de *Hibiscus sabdariffa* en tant que source naturelle d'antioxydants et d'agents antimicrobiens, et ouvrent des perspectives intéressantes dans les domaines de la phytothérapie, de la nutrition fonctionnelle et de la cosmétique naturelle.

Enfin, cette étude propose plusieurs pistes de recherche et de valorisation :

- Identifier et caractériser des substances bioactives naturelles susceptibles d'offrir des alternatives viables aux agents de synthèse, notamment dans un contexte de résistance antimicrobienne croissante ;
- Développer des formulations phytothérapeutiques standardisées et validées pour leur activité antioxydante et antibactérienne ;
- Approfondir les recherches sur les polyphénols et leurs mécanismes d'action afin

- d'optimiser leur extraction, leur stabilité et leur efficacité biologique ;
- Encourager la culture durable de plantes médicinales à usage alimentaire et thérapeutique, dans une optique de réduction des coûts de traitement et de préservation de la biodiversité végétale locale.

Références Bibliographiques

- Abu-Tarboush, H. M., Ahmed, S. A. B., & Al Kahtani, H. A. (1997). Some nutritional and functional properties of karkade (Hibiscus sabdariffa) seed products. *Cereal chemistry*, 74(3), 352-355.
- Achat, S. (2013). Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques (Doctoral dissertation, Université d'Avignon; Université Abderrahmane Mira-Bejaïa (Bejaïa, Algérie)).
- Ahmed, A., et al. (2019). Mineral composition and nutritional values of Hibiscus sabdariffa calyces. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83, 103296.
- Akar, Z., Küçük, M., & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 640-647.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.
- Al-Hashimi, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), 506-511.
- Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa atropurpurea* sub. *maritima* L. *Revue Scientifique de l'Université de Liège*, 87, Article 7398. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.7398>
- Anokwuru, C., Anyasor, G. N., Ajibaye, O., & Fakoya, O. (2011). Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three Nigerian medicinal plants. *Nature and Science of Sleep*, 9(9), 7.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apaliya, M. T., Kwaw, E., Mahunu, G. K., Osei-Kwarteng, M., Osae, R., & Azirigo, M. (2021). Nutritional properties and feeding values of Hibiscus sabdariffa and their products. In *Roselle (Hibiscus sabdariffa)* (pp. 137-154). Academic Press.
- Aurelio, D. L., Edgardo, R. G., & Navarro-Galindo, S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (Hibiscus sabdariffa L. cv. 'Criollo') infusion. *International journal of food science & technology*, 43(2), 322-325.
- Aurelio, M., et al. (2007). Antioxidant activity and phenolic content of Hibiscus sabdariffa L. extracts. *Journal of Medicinal Plants*, 31(2), 123-130.
- Babalola, S. O., Babalola, A. O., & Aworh, O. C. (2001). Compositional attributes of the calyces of roselle (Hibiscus sabdariffa L.)
- Bendif, E. (2017). Les antioxydants naturels et leur rôle dans la prévention du stress oxydatif. *Revue des Sciences Biologiques*, 25(2), 95-103.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3(1): 30-41.
- Chadi, S., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Guemmez, T., & Boudechicha, A. (2024). Polyphenol content, Antioxidant and Antimicrobial activities of *Hyoscyamus albus* L. Aerial extracts. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 17(11), 5515-5524.
- Chang, Y. C., Huang, H. P., Hsu, J. D., Yang, S. F., & Wang, C. J. (2005). Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied pharmacology*, 205(3), 201-212.
- Chikhoun, A., & Boudjellal, A. (2019). Effets des antioxydants naturels issus de *Pituranthos*

- scoparius et Hibiscus sabdariffa sur la stabilité oxydative d'émulsions à base de lactosérum et la cristallisation des lipides (Doctoral disserta.
- Christian, A., et al. (2006). Effects of Hibiscus sabdariffa calyx extract on hypertension: A clinical study. *Phytomedicine*, 13(6), 383-388.
- Cisse, M. (2010). Les anthocyanes de Hibiscus sabdariffa L. : extraction, identification et application comme colorants naturels. Thèse de doctorat, Université Montpellier II.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., & Sock, O. (2009). Le bissap (Hibiscus sabdariffa L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(3), 179-193.tion, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- Cisse, M., Vaillant, F., Bouquet, S., Pallet, D., Lutin, F., Reynes, M., & Dornier, M. (2011). Athermal concentration by osmotic evaporation of roselle extract, apple and grape juices and impact on quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 352-360.
- Dacosta, R. (2003). Classification and properties of polyphenols in medicinal plants. *Phytochemical Research*, 15(3), 202-210.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- Dewanto V, Wu X, Adom K K, Liu R H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, p. 3010 -3014.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302
- Duke, J. A. (1993). *CRC Handbook of Alternative Cash Crops*. CRC Press.
- Endrias, A. (2006). Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'Hibiscus sabdariffa L. et à l'Artemisia annua (Doctoral dissertation).
- Falleh H., Kousri R., Chaieb K., Karray- Boutaoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. Organs, and their biological activities .*C.R.Biologies*. 331:372-379.
- Falleh, H., et al. (2021). Bioactive compounds from medicinal plants: Their role in health and disease. *Phytochemistry Reviews*, 19(1), 1-15.
- Favier, A. (2003). Role of free radicals in cellular processes and immunity.
- Formagio, A. S. N., Ramos, D. D., Vieira, M. C., Ramalho, S. R., Silva, M. M., Zárata, N. A. H., ... Carvalho, J. E. (2015). Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology*, 75, 69-76.
- Forsyth, W. G. C., & Simmonds, N. W. (1954). Constituents of Hibiscus sabdariffa calyces. *Biochemical Journal*, 56(2), 259–264.
- Grubben, G. J. H., Denton, O. A. (2004). Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables. *Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables*.
- Guemmaz T, Arrar L, Baghiani A, Total Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Algerian *Alkanna tinctoria* aerialpart Extracts, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020; 10(5):3944
- Guéye, M. (2007). Rôle des enzymes antioxydantes dans la protection cellulaire. *Bulletin de Biochimie Appliquée*, 18(1), 22–29.
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134.

- Herrera-Arellano, A., Flores-Romero, S., Chavez-Soto, M. A., Tortoriello, J. (2004). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 11(5), 375-382.
- Holton, T. A., & Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 1071–1083.
- Hopkins, A. L., Lamm, M. G., Funk, J. L., Ritenbaugh, C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 85, 84-94.
- Islam, M. T. (2019). *Hibiscus sabdariffa* L.: A comprehensive review on its phytochemistry and pharmacological perspectives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(12), 1629–1650.
- Ismail, H., Lemriss, S., Aoun, Z. B., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., ... & Bouraoui, A. (2008). Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(1), 23-26.
- Jalalyazdi, M., Ramezani, J., Izadi-Moud, A., Madani-Sani, F., Shahlaei, S., Ghiasi, S. S. (2019). Effect of *Hibiscus sabdariffa* on blood pressure in patients with stage 1 hypertension. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 10(3), 107.
- Jamini, T. S., Islam, A. A. (2021). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Nutraceutical and Pharmaceutical Significance. In *Roselle* (pp. 103-119). Academic Press.
- Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), 181–185.
- Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., Simon, J. E. (2009). Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural product industry in Senegal. *Journal of Food Science*, 74(2), S113-S121.
- Khan, I., et al. (2022). *Hibiscus sabdariffa* L.: A review of its medicinal properties. *Pharmacognosy Reviews*, 16(1), 45-56.
- Leung, A. Y. (1980). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*. John Wiley & Sons.
- Lin (a), W. L., Hsieh, Y. J., Chou, F. P., Wang, C. J., Cheng, M. T., Tseng, T. H. (2003). Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Archives of Toxicology*, 77(1).
- Lin (b), H., Huang, P., Huang, C., Chen, H., Wang, J. (2005). Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 43(2), 86-99.
- Lister E, Wilson P., (2001). Measurement of total phenolics and ABTS assay for Antioxidant Activity. New Zealand: Crop Research Institute. London: Academic. Press, 1-113.
- Macheix, J. J., et al. (2005). Role of secondary metabolites in plant defense. *Journal of Plant Physiology*, 162(3), 225-234.
- Mahmoud, B. M., Ali, H. M., Homeida, M. M. A., & Bennett, J. L. (1994). Significant reduction in chloroquine bioavailability following coadministration with the sudanese beverages aradaib, karkadi and lemon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(5), 1005-1009
- Mahmoud, B. Z. (1994). Ethnopharmacological practices in Senegal: A study on the use of *Hibiscus sabdariffa*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*.
- Mazza, G. (2018). Anthocyanins and their potential applications in food and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 147–168.
- McCaleb, Robert S., Leigh, Evelyn., Morien, Krista. (2000). An Authoritative Guide to 40 Leading Medicinal Plants. In: *The Encyclopedia of Popular Herbs*. Prima Lifestyles.

- Mekhoukhe, A., Madani, K., Chibane, M., & Brahmi, N. (2016). Étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits de quelques plantes médicinales de la région de Béjaïa. *Substances Naturelles et Innovations Thérapeutiques*, (46). Université Abderrahmane Mira, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biomathématiques, Biochimie, Biophysique et Scientométrie
- Meroua, B., & Kerrouche, K. (2024). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales* (Doctoral dissertation, university centre of abdelhafid boussouf-mila-).
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Sciences: M/S*, 27(4), 405-412.
- Mohammedi, Z. (2013). Les antioxydants naturels et leurs implications en santé humaine. *Phytothérapie et Santé*, 12(3), 145–151. Abu-Tarboush, H. M., Ahmed, S. E., & Al Kahtani, H. A. (1997). Some nutritional properties of karkade (Hibiscus sabdariffa) seed products. *Cereal Chemistry*, 74(3), 352–355.
- Mohd-Esa, N., Hern, F. S., Ismail, A., Yee, C. L. (2010). Antioxidant activity in different parts of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food chemistry*, 122(4), 1055-1060.
- Morel, F., & Barouki, R. (1999). Oxidative stress and its impact on human health. *Toxicological Research Journal*, 22(3), 211-220.
- Morton, J. (1987) Roselle. In: *Fruits of Warm Climate*, Julia F. Morton, Miami, FL, 281-286.
- Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks. *Food chemistry*, 194, 705-711.
- Nathalie, S., & Jean-Paul, D. (2006). Flavonoids and their antioxidant properties in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 3898- 3905.
- Nkumah, A. (2015). Effect of climate and soil on the cultivation of Hibiscus sabdariffa L. in tropical regions. *African Journal of Plant Science*, 9(2), 78–84.
- Odigie, I. P., Ettarh, R. R., & Adigun, S. A. (2003). Chronic administration of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa attenuates hypertension in rats.
- Olaleye, Oladimeji Olanipekun, Rose Kukwa, M. O. Eke, and T. O. Aondo. 2018. "Extraction, Physicochemical and Phytochemical Characterization of Oil from Sesame Seed." *Asian Food Science Journal* 1 (4): 1–12.
- Olvera-García, V., Castaño-Tostado, E., Rezendiz-Lopez, R. I., Reynoso-Camacho, R., González de Mejía, E., Elizondo, G., Loarca-Piña, G. (2008). Hibiscus sabdariffa L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. *Journal of Food Science*, 73(5), T75-T81.
- Panche, A., Diwan, A., Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, E47.
- Pastre, D. (2005). Sources of reactive oxygen species and their implications in oxidative stress. *Cellular Biology Reviews*, 16(5), 300-307.
- Piovesana, S., et al. (2019). Identification and quantification of carotenoids in Hibiscus sabdariffa L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(28), 8037–8043.
- Prasetyoputri, A., Rahmawati, S. I., Atikana, A., Izzati, F. N., Hapsari, Y., Septiana, E., Putra, M. Y. (2021). A Mini Review on the Antibacterial Activity of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) Phytochemicals. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1192, No. 1, p. 012017).
- Rahal, RMS, De Freitas-Júnior, R. et Paulinelli, RR (2005). Facteurs de risque d'ectasie canalaire. *Le journal du sein*, 11 (4), 262-265.

- Rao, P., et al. (2011). DNA damage induced by free radicals: Mechanisms and consequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1205-1215.
- Reanmongkol, W., Itharat, A. (2007). Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol*, 29(1), 29-38.
- Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.
- Righi, N., Boumerfeg, S., Deghima, A., Fernandes, P. A., Coelho, E., Baali, F., ... & Baghiani, A. (2021). Phenolic profile, safety assessment, and anti-inflammatory activity of *Salvia verbenaca* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 272, 113940.
- Rodrigo, R., et al. (2011). Antioxidant activity of polyphenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*, 122(1), 104-110.
- Suman, S., Kurisetty, V., Das, TP, Vadodkar, A., Ramos, G., Lakshmanaswamy, R., & Damodaran, C. (2014). L'activation de la signalisation AKT favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et la croissance tumorale dans les cellules cancéreuses colorectales. *Carcinogénèse moléculaire*, 53 (S1), E151-E160.
- Savio, S.E., Issiaka, T., Fatoumata, T. (2020). Activité antioxydante in vitro des extraits des graines de *Hibiscus sabdariffa* L. récoltées dans quatre localités du Mali. *International journal of applied research*, 6, 557-560.
- Selli, S., et al. (2021). Traditional and contemporary uses of *Hibiscus sabdariffa* L.: An ethnobotanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113-125.
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Bioactivities of polyphenols: The role of extraction method and temperature. *Food Chemistry*, 199, 55-66.
- Shallangwa, G A., Ekwumengbo, P A., Osu, U I., Bolarin, O O., Moyosore, A. (2017). *Algerian Journal of Natural Products*: 5(2), 483-491.
- Shruthi, R., et al. (2016). Comprehensive phytochemical investigation of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 39(1), 115-121.
- Shruthi, S. D., & Ramachandra, Y. L. (2019). Ethnopharmacological properties of *Hibiscus sabdariffa*: An overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2650-2656.
- Singh R.K., Sureja A.K., Singh D. (2006). Cultural and agricultural dynamics of agrobiodiversity conservation. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. *Indian J. Tradit. Knowl.* 5 :151-157.
- Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., Adhikari, B. (2021). Extraction and characterization of polyphenolic compounds and potassium hydroxycitrate from *Hibiscus sabdariffa*. *Future Foods*, 4, 100087.
- Stagos, D. (2019). Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*, 9(1), 19.
- Vu Thi Dao, C. (2008). Biosynthesis and storage of secondary metabolites in plants. *Plant Biology Journal*, 23(5), 112-119.
- Wang, C. J., et al. (2000). *Hibiscus* anthocyanins, polyphenolic compounds, and their antioxidant effects. *Food Chemistry*, 70(3), 307-312.
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Che Man, Y. B. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32(2), 68-73.
- Wróbel, K., Wróbel, K., Urbina, E. M. C. (2000). Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (mate) by ETA-AAS. *Biological Trace Element Research*, 78, 271-280.
- Xavier, R., et al. (2019). Secondary metabolites from medicinal plants: A comprehensive overview.

- Journal of Natural Products, 82(3), 211-220.
- Xiaowei, H., Zhihua, L., Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Yiwei, X., Xiaodong, Z. (2021). Conventional and rapid methods for measurement of total bioactive components and antioxidant activity in Hibiscus sabdariffa. Roselle (Hibiscus sabdariffa), 199-214.
- Yagi, S., Hussain, Z. T. (2020). Chemical profile and scavenging activity of four extracts from Hibiscus sabdariffa L. calyx.
- Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zhang, B., Wu, X. (2012). Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (Hibiscus sabdariffa L.). African Journal of Biotechnology, 11(17), 4063-4068.
- Yin, M. C., Chao, C. Y. (2008). Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. International journal of food microbiology, 127(1-2), 73-77.