الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة فرحات عباس
كلية العلوم قسم البيولوجيا

مذكـــرة

مقدمة لنيل **شهادة الماجستير**

في الميكروبيولوجيا التطبيقية

دراسة التأثـير المضـاد للبكتيريا والمضـاد للأكسـدة لمستخلصات *Artemisia herba alba* و*Punica granatum* وأنواع *Quercus* وبعض المركبات الفنولية

من طرف: إراتـــني نجـــاة

أمام اللجنة المتكونة من:

الرئيس: أ. قشي عبد الهـــادي	أستاذ التعليم العالي بجامعة فرحات عباس سطيف
المشرف: د. خنـــوف الصديق	أستـــاذ محـــاضـــر بجامعة فرحات عباس سطيف
الأعضاء: د. حـــــرزالله داود	أستـــاذ محـــاضـــر بجامعة فرحات عباس سطيف
د. بغياني عبد الرحمان	أستـــاذ محـــاضـــر بجامعة فرحات عباس سطيف

- 2008 -

التشكرات

أحمد الله وأشكره الذي بفضله وعونه تم إنجاز هذا العمل

أتقدم بجزيل الشكر إلى الدكتور خنوف الصديق الذي لم يبخل علي بتوجيهاته ونصائحه القيمة طيلة إشرافه على هذا العمل

تشكراتي الخالصة للدكتور حرزالله داود على كل مساعداته وتوجيهاته القيمة

أشكر الدكتور بغياني عبد الرحمان على مساعداته

أشكر الأستاذ قشي عبد الهادي على تشجيعاته

أتقدم بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة الذين تفضلوا بقبول مناقشة هذا البحث الأستاذ قشي عبد الهادي والدكتور حرزالله داود والدكتور بغياني عبد الرحمان

الشكر الجزيل لكل من ساهم في إنجاز هذا العمل

الإهداء

إلى والدي الكريمين

إلى كل العائلة

إلى كل الأصدقاء والزملاء

الفهرس

التشكرات

الملخص بالعربية

الملخص بالانجليزية

قائمة المختصرات

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

المقدمة 1

الدراسة المرجعية

I- عموميات عن النباتات الطبية 3

II- النباتات الطبية المستعملة في هذه الدراسة 5

II-1- نبات *Artemisia herba alba* 5

II-2- نبات *Punica granatum* 8

II-3- نبات *Quercus* 11

III- المركبات الفنولية 14

III-1- الأحماض الفنولية 14

III-2- الفلافونويدات 16

III-3- الدباغ 21

III-4- البناء الحيوي للمركبات الفنولية 23

III-5- النشاطية الحيوية للمركبات الفنولية 25

IV- النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة 25

IV-1- العوامل المضادة للأحياء الدقيقة 25

IV-1-1- المركبات الفنولية 26

IV-1-2- التربينويدات (terpenoids) والزيوت الأساسية 28

IV-1-3- القلويدات (alkaloids) 29

IV-1-4- اللكتينات (lectins) وعديدات الببتيد (polypeptides) 29

IV-1-5- المضادات الحيوية 30
IV-2- طرق دراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة 33
V- النشاطية المضادة للأكسدة 36
V-1- الإجهاد التأكسدي 36
V-2- الجذور الحرة 36
V-3- تأثيرات الإجهاد التأكسدي 37
V-4- نشاطية المركبات الفنولية المضادة للأكسدة 38
V-5- طرق دراسة النشاطية المضادة للأكسدة 39

المواد والطرق

I- المواد 42
I-1- العينات النباتية 42
I-2- الأنواع البكتيرية 42
I-3- المركبات الفنولية 42
I-4- المواد الكيميائية 43
II- طرق العمل 44
II-1- استخلاص المركبات الفنولية 44
II-2- تقدير عديدات الفنول الكلية في المستخلصات النباتية 44
II-3- دراسة نشاطية مستخلصات النباتات المضادة للبكتيريا 47
II-3-1- اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص (Disc Diffusion Agar) 47
II-3-2- تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC) 48
II-4- دراسة نشاطية مستخلصات النباتات المضادة للأكسدة 49
II-4-1- دراسة قدرة العينات على إزاحة جذر DPPH 49
II-4-2- اختبار β-carotene/حمض اللينولييك 50

النتائج

I- استخلاص وتقدير المركبات الفنولية في المستخلصات النباتية 51
II- تأثير مستخلصات النباتات المضاد للبكتيريا 53

II-1- اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص 53
II-2- تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC) 57
III- تأثير مستخلصات النباتات المضاد للأكسدة 58
III-1- تأثير العينات الإزاحي لجذر DPPH 58
III-2- باستعمال اختبار β-carotene/حمض اللينولييك 61

المناقشة

I- استخلاص وتقدير المركبات الفنولية في المستخلصات النباتية 67
II- تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للبكتيريا 68
III- تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للأكسدة 72

الخاتمة 75
قائمة المراجع 76
الملحق

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلصات بعض النباتات ذات الاستعمال الشائع في الطب الشعبي الجزائري وبعض المركبات الفنولية النقية. تتمثل النباتات في نبات الشيـــح *Artemisia herba alba* ونبات الرمان *Punica granatum* وبعض أنواع البلوط *Quercus*. حيث استخلصت المركبات الفنولية من هذه النباتات وقدرت تراكيزها. تم دراسة النشاطية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص، واستخدم اختباري DPPH وβ-carotene/حمض اللينولييك لدراسة النشاطية المضادة للأكسدة. أظهرت المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية نشاطية مضادة لنمو بعض الأنواع البكتيرية الممـــرضة مثل: *Staphylococcus aureus* و*Enterobacter agglomerans* و*Salmonella typhi* و*Citrobacter freundii*، كما أبدت كل هذه المواد تأثيرا مضادا للأكسدة ومزيحا للجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية: *Artemisia*، *Punica*، *Quercus*، المركبات الفنولية، النشاطية المضادة للبكتيريا، النشاطية المضادة للأكسدة، النباتات الطبية.

Summary:

In this study, the antibacterial and antioxidant activities of some medicinal plant extracts were examined. These plants are widely used in the Algerian folk medicine. They are indicated in *Artemisia herba alba*, *Punica granatum* and some *Quercus* species. Phenolic compounds were extracted and quantified in the aqueous and organic extracts of the previous plants. The antibacterial activity of plant extracts and phenolic compounds was examined using disc diffusion agar method. Their antioxidant activity was assessed by DPPH and β-carotene/linoleic acid assays. From one hand; plant extracts and phenolic compounds exhibited antibacterial activity against some bacteria species like: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella typhi* and *Citrobacter freundii*. In the other hand, these extracts and phenolic compounds exhibited strong antioxidant and free radical scavenging properties.

Key words: *Artemisia*, *Punica*, *Quercus*, polyphenols, antibacterial activity, antioxidant activity, medicinal plants.

قائمة المختصرات

FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection
MIC	Mimimum Inhibitory Concentration
NO	Nitric Oxide
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RAA	Relative Antioxidant Activity
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standard Deviation
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TRAP	Total Radical Trapping Parameter
WHO	World Health Organization

قائمة الأشكال

الشكل 1: نبـــات *Artemisia herba alba* 7

الشكل 2: نبـــات *Punica granatum* 10

الشكل 3: أنـــواع *Quercus* المستعملة في هذه الدراسة 13

الشكل 4: البنية الكيميائية لبعض الأحماض الفنولية 15

الشكل 5: الشكل العام للفلافونويدات 18

الشكل 6: البنية الكيميائية لـــ Flavone وFlavonol 18

الشكل 7: البنية الكيميائية لـــ Chalcone وAurone 18

الشكل 8: البنية الكيميائية لـــ Flavanone 18

الشكل 9: البنية الكيميائية لنظير الفلافون (Isoflavone) 18

الشكل 10: البنية الكيميائية لـــ Anthocyanidin 20

الشكل 11: البنية الكيميائية لـــ Flavan-3-ol وFlavan-3,4-diol 20

الشكل 12: البنية الكيميائية لـــ apigenin 6-C-β-D-glucopyranoside 20

الشكل 13: البنية الكيميائية لفلافان ثنائي (biflavan) 22

الشكل 14: البنية الكيميائية لـــ tellimagrandin II (دباغ مميهة) 22

الشكل 15: البنية الكيميائية لـــ procyanidin B_4 (دباغ مكثفة) 22

الشكل 16: البناء الحيوي لبعض المركبات الفنولية 24

الشكل 17: البنية الكيميائية للمركبات الفنولية النقية المستعملة في هذه الدراسة 43

الشكل 18: منحنى العيارية لحمض الغاليك 45

الشكل 19: منحنى العيارية للكاتشين 46

الشكل 20: نتائج تأثير المستخلصات النباتية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة DPPH 60

الشكل 21: نتائج تأثير المركبات الفنولية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة DPPH 60

الشكل 22: نشاطية المركبات الفنولية المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 63

الشكل 23: نشاطية مستخلصات *A. herba alba* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 63

الشكل 24: نشاطية مستخلصات *P. granatum* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 64

الشكل 25: نشاطية مستخلصات أوراق *Q. ilex* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 64

الشكل 26: نشاطية مستخلصات قشور جذور *Q. ilex* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 65

الشكل 27: نشاطية مستخلصات *Q. faginea* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 65

الشكل 28: نشاطية مستخلصات *Q. suber* و*Q. coccifera* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك 66

قائمة الجداول

الجدول 1: مردود الاستخلاص وتركيز عديدات الفنول الكلية في المستخلصات النباتية (مغ/غ وزن مجفد) 52

الجدول 2: نتائج تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على السلالات البكتيرية بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص 55

الجدول 3: النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على السلالات البكتيرية 56

الجدول 4: تركيز المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المثبطة لـــ 50% من جذر DPPH 59

الجدول 5: نتائج تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة β-carotene/حمض اللينولييك 62

المقدمـــة:

إن اكتشاف وتطور واستعمال المضادات الحيوية خلال القرن التاسع عشر أدى إلى انخفاض مخاطر الصحة العمومية الناتجة عن الإصابة بالأنواع البكتيرية انخفاضا كبيرا. غير أنه في السنوات الأخيرة، فقد عدد من المضادات الحيوية فعاليته بسبب زيادة مقاومة السلالات البكتيرية ومعظمها من خلال التعبير عن المورثات المقاومة (Davies، 1994؛ Service، 1995) نتيجة لاستخدامها غير الحكيم. بالإضافة إلى ذلك ارتبطت المضادات الحيوية أحيانا ببعض الآثار السلبية التي تعود بالضرر على العائل مثل فرط التحسس واستجابات الحساسية وكبح المناعة (Wilkinson، 1998). لذلك كانت الحاجة إلى تطوير أدوية بديلة مضادة للبكتيريا من أجل معالجة الأمراض التي تسببها الأنواع البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية الحالية، مثل النباتات الطبية.

النباتات الطبية هي محل اهتمام وفضول الإنسان على مر العصور، إذ كانت ولازالت تمثل مصدرا طبيعيا للمعالجة سواء على شكل مستحضرات تقليدية أو مواد فعالة نقية. وذلك لعلاج الإصابات الناتجة عن العدوى بالأحياء الدقيقة أو الأمراض الناتجة عن الإجهاد التأكسدي مثل الالتهاب، والتي تعزى إلى غنى هذه النباتات بالمركبات الفنولية (الأحماض الفنولية والفلافونويدات والدباغ) التي تمثل المستقلبات الثانوية الأكثر انتشارا وتنوعا في المملكة النباتية وذات النشاطية البيولوجية والصيدلانية الواسعة (Bravo، 1998). وتمتاز النباتات الطبية عن الأدوية الكيميائية بانخفاض تكلفتها وقلة تأثيراتها الجانبية، بالإضافة إلى كونها طبيعية وذات فعالية علاجية عالية.

إن العلاج بالنباتات الطبية يقوم على أساس النتائج التجريبية من مئات وآلاف السنين، حيث أفادت منظمة الصحة العالمية (WHO) أن حوالي 80% من سكان العالم خاصة في البلدان المتقدمة يعتمدون على الأدوية المشتقة من النباتات من أجل الرعاية الصحية (Gurib-Fakim، 2006). ففي الولايات المتحدة الأمريكية مثلا، تبين في بداية التسعينات أن ما يقارب الثلث من السكان يستعمل على الأقل علاجا تقليديا

(Eisenberg وآخرون، 1993). وأنفق الأوربيون في سنة 1995 مبلغ بقيمة 35 مليار فرنك على مواد صيدلانية نباتية الأصل (Villar del Frenso، 1998). حيث لوحظ أن استعمال النباتات الطبية إلى جانب وسائل تقليدية أخرى في العلاج في تزايد وانتشار مستمرين، ويعود ذلك إلى الاعتراف بقيمة الأنظمة الطبية التقليدية.

فإذا كانت الدول المتقدمة تولي كل هذا الاهتمام بالنباتات الطبية، فإن دول العالم الثالث التي تفتقر إلى صناعة دوائية هي أولى بالاهتمام بهذا الجانب، وهذا من خلال فتح مجالات لتنظيم وإثراء برامج بحث متعددة الاختصاصات بهدف استعمال هذا المصدر الطبيعي كعلاج.

يندرج بحثنا في هذا الإطار ويتعلق بدراسة بعض النباتات الطبية ذات الاستعمال الشائع في الطب الشعبي الجزائري، المتمثلة في نبات الشيح *Artemisia herba alba* ونبات الرمان *Punica granatum* وبعض أنواع البلوط *Quercus*، إضافة إلى بعض المركبات الفنولية، وذلك من خلال محاولة اختبار قدرة هذه المواد على مكافحة بعض الأنواع البكتيرية وكذلك اختبار نشاطيتها المضادة للأكسدة.

الدراسة المرجعية

I- عموميات عن النباتات الطبية:

يسمى النبات نباتا طبيا إذا امتلك على الأقل عضو من أعضائه خصائص علاجية (Bruneton، 1993)، كما يمكن أن يعرف على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر على مادة أو عدة مواد كيميائية فعالة، بتركيز منخفض أو مرتفع، لها تأثير طبي أو فيزيولوجي أي القدرة على معالجة مرض معين أو على الأقل التقليل من أعراض الإصابة بهذا المرض إذا أعطيت للمريض في صورتها النقية بعد استخلاصها من النبات أو استخدامها في صورة عشب طازج أو مجفف أو مستخلص نباتي (هيكل وعمر، 1993).

وقد ذكر Gurib-Fakim (2006) أجزاء النبات التي يمكن استخدامها في العلاج وأهمها:

- **الجذور**: حيث تستعمل جذور العديد من الأنواع النباتية طبيا، والتي قد تكون ليفية مثل نبات القراص *Urtica dioica* أو *U. radix* من عائلة Urticaceae، أو صلبة مثل نبات العرقسوس *Glycyrrhiza glabra* من العائلة البقولية Leguminosae أو ثخينة مثل نبات *Harpagophytum procrumbens* من عائلة Pedaliaceae.

- **الريزومات**: هي الجزء الخشبي المتطاول من الجذع الذي ينمو عادة أفقيا تحت الأرض لتتشكل منه الأوراق فوق سطح الأرض والجذور داخل الأرض. هناك ريزومات ذات أهمية طبية مثل نبات *Piper methysticum* من عائلة Piperaceae ونبات الزنجبيل *Zingiber officinalis* من العائلة الزنجبيلية Zingiberaceae.

- **الأبصال**: عبارة عن بنية ثخينة متكونة من طبقات من القشور التي هي في الأصل عبارة عن أوراق. من أكثرها استعمالا في الطب الشعبي هي البصل *Allium cepa* والثوم *Allium sativum* من عائلة Liliaceae.

- **الدرنات**: تكون الدرنة منتفخة وذات بنية ثخينة، تنمو تحت الأرض. من الدرنات الأكثر استعمالا في التداوي هي درنات البطاطا الإفريقية *Hypoxis sp* من عائلة Hipoxidaceae.

- **اللحاء (bark)**: هو الطبقة الخارجية لجذع الشجرة التي تعمل على حمايته، ويحتوي عادة على تراكيز عالية من المكونات النشطة. من الأمثلة عليه: اللحاء الموجود في *Cinchona sp* من عائلة Rubiaceae و*Cinnamomum camphora* من عائلة Lauraceae.

- **الأوراق**: يمكن أن تستخدم الأوراق لوحدها أو مختلطة مع البتلات. من أمثلة النباتات التي تستعمل فيها الأوراق فقط نبات *Gingko biloba* من عائلة Ginkoaceae.

- **الجزء الهوائي**: هو جميع أجزاء النبات الموجودة فوق سطح الأرض. من النباتات التي تستعمل أجزاؤها الهوائية نبات *Hypericum perforatum* من عائلة Hyperiaceae.

- **الأزهار**: هي شائعة الاستعمال في الطب التقليدي، وتشمل عدة أنواع منها نبات *Syzygium aromaticum* من عائلة Myrtaceae ونبات *Chamaemelum nobile* من عائلة Asteraceae ونبات *Hibiscus sabdiriffa* من عائلة Malvaceae ونبات *Calendula officinalis* من عائلة Asteraceae.

- **الثمار**: منها ثمار نبات *Pimpinella anisum* من عائلة Apiaceae، وفي بعض الأحيان تستعمل قشور الفواكه مثل قشور الرمان *Punica granatum* من عائلة Punicaceae، وقشور الليمون *Citrus sp* من عائلة Rutaceae.

- **البذور**: تستعمل عادة مع الثمار وفي بعض الأحيان تستعمل وحدها، من الأمثلة عليها يوجد زيت بذور الخروع *Ricinus communis* من عائلة Euphorbiaceae وبذور نبات البسباس *Foeniculum vulgare* من عائلة Apiaceae.

- **الصمغ**: هو عبارة عن خليط من عديدات السكريات، قابل للذوبان في الماء ويهضم جزئيا من طرف الإنسان. ينتجه النبات أحيانا كوسيلة دفاع أو كنظام حماية ضد غزو البكتيريا والفطريات. من النباتات المنتجة

للصمغ نبات *Acacia senegal* من عائلة Leguminosae ونبات *Terminalia bentzoe* من عائلة Combretaceae ونبات الصبار *Aloe vera* من عائلة Liliaceae.

- الزيوت الأساسية: هي زيوت طيارة، يتم استخلاصها عادة من النباتات بعملية التقطير، وهي ذات أهمية كبيرة باعتبارها المكونات النشطة في العديد من النباتات الطبية. من أمثلة النباتات الغنية بهذه المواد نبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من العائلة الشفوية Lamiaceae ونبات *Cananga odorata* من عائلة Annonaceae.

II- النباتات الطبية المستعملة في هذه الدراسة:

II-1- نبات الشيح *Artemisia herba alba*:

أ- تعريفه:

جنس *Artemisia* هو عشبة عطرية شعبية، تنتمي إلى عائلة Asteraceae (Salido وآخرون، 2004). يشمل هذا الجنس عددا من الأنواع (من 200 إلى أكثر من 400 نوع) التي وجدت في نصف الكرة الشمالي (Marco وBarbara، 1990). وحسب Tutin وآخرون (1976) يمكن تقسيم هذا الجنس إلى *Artemisia* و*Dracunculus*. يضم جنس *Artemisia* نوع Asso *Artemisia herba alba* وهو شجيرة برية متقزمة طبية وعطرية، ينمو في المناطق الجافة من حوض البحر الأبيض المتوسط، ويمتد إلى شمال غرب جبال الهمالايا (Salido وآخرون، 2004)، ينتشر نسبيا في شبه الجزيرة الإيبيرية، ويبلغ أعلى كثافة له في وسط إسبانيا وينتشر أكثر في شرق وجنوب شرق وجنوب إسبانيا (Salido وآخرون، 2004).كما يعتبر النبات المميز لسهول شرق وشمال إفريقيا (Segal وآخرون، 1987)، وينتشر في المغرب في الصحراء الجنوبية وجبال الأطلس (Boriky وآخرون، 1996).

ب- استعماله في الطب التقليدي:

يستعمل نبات الشيح *Artemisia herba alba* بكثرة في الطب التقليدي، حيث يستخدم لعلاج الاضطرابات الهضمية مثل الإسهال وتشنجات البطن ولعلاج الجروح الخارجية (Feuerstein وآخرون، 1986)، كما يستخدم لعلاج مرضى السكري، وفي حالات أخرى مثل اليرقان (Marrif وآخرون، 1995)، وهو أيضا نبات مضاد للأحياء الدقيقة والديدان ومضاد للسموم (Ziyyat وآخرون، 1997). استعمل هذا النبات في علاج الاضطرابات العصبية مثل مرض الألزهيمر (Alzheimer) والصرع (epilepsy) والانهيار العصبي (Salah وJäger، 2005). وقد وجد أن المستخلص المائي والزيوت الأساسية لنبات *A. herba alba* لهما نشاطية مضـــادة لنوعـــين من *Leishmania* هما: *L. tropica* و*L. major*، بحيث أعطى الزيت الأساسي نشاطية أكبر على السلالتين بتركيز 2 µغ/مل، والمستخلص المائي بتركيز 4 µغ/مل (Hatimi وآخرون، 2000). كما وصف النبات على أنه مضاد لارتفاع الضغط الدموي الشرياني (Tahraoui وآخرون، 2007).

ج- مكوناته الأساسية:

يحتوي النبات الطبي *Artemisia* على مركبات نشطة بيولوجيا مثل المركبات الفنوليـــة والقلويـــدات (alkaloids) والفيتامين A وB_1 وB_2 وC ومعـــادن مختلفة (Hoffman وHerrman، 1982؛ Lee وآخـــرون، 1999؛ Kim، 2003)، وتـــؤكد بعـــض الدراسات أن مشتقـــات الكومارينات (coumarins) الموجودة في هذا النبات تحمي وظيفة الكبد (Kimura وآخرون، 1985؛ Gilani وJanbaz، 1993).

الشكل 1: نبـــات *Artemisia herba alba*

II-2- نبات الرمان *Punica granatum*:

أ- تعريفه:

نبات الرمان *Punica granatum* المعروف بالانجليزية Pomegranate هو شجيرة أو شجرة صغيرة، ينتمي إلى عائلة Punicaceae، أصله من منطقـــة البحـــر الأبيض المتوسط (Kaur وآخرون، 2006)، ينمو في إيران والهند والولايات المتحدة (Huanga وآخرون، 2005) وتركيا والشرق الأوسط ودول البحر الأبيض المتوسط والدول العربية (Maskan، 2006). أصبح عصير الرمان ذو شعبية متزايدة بسبب الأنشطة البيولوجية المهمة لهذا النبات، واحتوائه على نشاطية مضادة للأكسدة وكذلك حماية القلب (Li وآخرون، 2005).

ب- استعماله في الطب التقليدي:

يستعمل هذا النبات كمضاد للسرطان (Afaq وآخرون، 2005) ومضاد للبكتيريا (Prashanth وآخرون، 2001) ومضاد للفطريات (Dutta وآخرون، 1998) ومضاد للإسهال (Das وآخرون، 1999) ومضاد للقـــرحة المعدية (Gharzouli وآخرون، 1999)، التي تم إثبـــاتها مع عدة مستخلصات لمكونات مختلف أجزاء هذا النبات. كما استعملت قشور الرمان وفاكهته كأدوية قابضة في الإسهال والزحار (dysentery) (Ricci وآخرون، 2006).

أفادت دراسة Jafri وآخرون (2000) بأن المستخلص الإيثانولي المائي (50%ح/ح) لأزهار *P. granatum* يخفض نسبة السكر في نموذج حيواني مصاب بداء السكري.

ج- مكوناته الأساسية:

تحتوي مختلف أجزاء نبات الرمان على عدة مركبات نشطة بيولوجيا، حيث وجد أن لب هذا النبات غني بالسكريات والفيتامينات وعديدات السكريات وعديدات الفنول والمعادن. أما بذوره فهي غنية بالأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة، كما يحتوي النبات على بعض الأنتوسيانيدات مثل: delphinidin وcyanidin

وpelargonidin (Sestili وآخرون، 2007). يعتبر الدباغ Punicalagin (من الدباغ الإيلاجيكية) المكون الكيميائي الأساسي للب هذا النبات وقشوره (Kulkarni وآخرون، 2004)، وهو المادة الطبيعية المضادة للأكسدة الفعالة الموجودة في بقايا الثمار. إضافة إلى وجود مركبات أخرى تم عزلها سابقا مثل القلويدات والدباغ والجليكوزيدات (Prashanth وآخرون، 2001).

الشكل 2: نبـــات *Punica granatum*

II-3- نبات *Quercus*:

أ- تعريفه:

ينتمي جنس *Quercus* إلى عائلة Fagaceae (Berahou وآخرون، 2007). يتوزع على نطاق واسع في جميع أنحاء نصف الكرة الشمالي مع تنوع أكبر في جنوب شرق الولايات المتحدة ومرتفعات المكسيك وأوراسيا (Eurasia) الجبلية شبه الاستوائية وشرق آسيا (Borgardt وPigg، 1999). ينتشر بصورة كبيرة في غابات البحر الأبيض المتوسط (Hidalgo وآخرون، 2008). كما هو معروف عن أشجار هذا الجنس أنها من أكثر الأشجار المصدرة للمركبات العضوية الطيارة خاصة isoprene (Pio وآخرون، 2005).

أنـــواع *Quercus* التي تم استعمالها في هذه الدراســـة هي *Q. coccifera* والبلوط *Q. ilex* والـــزان *Q. faginea* والفلين *Q. suber*. فالنوع *Q. coccifera* هو شجيرة دائمة الاخضرار يتراوح طولها بين 2 و3 أمتار، تنمو في المناطق الجافة، أما *Q. ilex* فهو شجرة دائمة الاخضرار يصل طولها إلى 12 م وهي تفضل النمو على الترب الرطبة، في حين وجد أن *Q. faginea* عبارة عن شجرة نفضية يصل طولها إلى 20 م، وهي تحتل المناطق الرطبة (Rey Benayas وآخرون، 2005)، أما *Q. suber* فهو شجرة دائمة الاخضرار أيضا، تتميز بطبقة سميكة من قشور الجذور يصل سمكها إلى 15 سم (Hidalgo وآخرون، 2008)، ينمو هذا النوع في الأماكن الساخنة من المناطق الرطبة وشبه الرطبة من البحر الأبيض المتوسط مع 450 ملم على الأقل من الأمطار سنويا، استعمل منذ العصور القديمة لإنتاج الفلين (Lumaret وآخرون، 2005). وتنتشر هذه الأنواع المستعملة في هذه الدراسة على طول الأطلس التلي بالجزائر.

ب- استعماله في الطب التقليدي:

إن النوع الأكثر استعمالا في الطب التقليدي هو البلوط *Q. ilex*، فهو من النباتات الأكثر شيوعا في المغـــرب لعـــلاج الاضطرابات الهضـــمية (الإسهـــال والقـــرحة والتهـــاب المـــعدة) والإصابـــات الجلدية

(Berahou وآخرون، 2007). تستعمل قشور جذور هذا النبات لعلاج آلام المعدة كمنقوع أو على شكل مسحوق، وحده أو مختـــلط مع نبـــات الرمـــان *Punica granatum* ونبـــات الخروب *Ceratonia silica* (Benchaabane وAbbad، 1997)، كما يستعمل أيضا لعلاج الحنجرة والتريف والزحار (Berahou وآخرون،2007).

ج- مكوناته الأساسية:

تتميز مستخلصات أنواع *Quercus* بغناها بالمركبات الفنولية (Ohemeng وآخرون، 1993) مثل الفلافونويدات والدباغ (Zhentian وآخـــرون، 1999؛ Meng وآخـــرون، 2001؛ Hideyuki وآخـــرون، 2002).كما وجد أن *Q. coccifera* غني بالدباغ خاصة المكثفة منها (Ben Salem وآخرون، 2005). حيث تمكن Ito وآخرون (2002) من عزل دباغ مميهة مستخلصة من *Q. suber* و*Q. coccifera* التي تتمثل في castalagin وpedunculagin وacutissimin B وphillyraeoidin A.

Quercus ilex

Quercus suber

Quercus coccifera

Quercus faginea

الشكل 3: أنـــواع *Quercus* المستعملة في هذه الدراسة

III- المركبات الفنولية:

تمثل المركبات الفنولية مجموعة واسعة من المواد النباتية التي تبنى في شكل حلقات عطرية مرتبطة مع مجموعة أو أكثر من مجاميع الهيدروكسيل (Bruneton، 1993)، تتوزع هذه المستقلبات الثانوية بشكل واسع في المملكـــة النبـــاتية (Salunkhe وآخـــرون، 1990). وتنقســـم هذه المـــركبات إلى: الأحماض الفنولية والفلافونويدات والدباغ (Bruneton، 1993).

III-1- الأحماض الفنولية:

هي جزيئات فنولية بسيطة تمثل الوحدة الأساسية للمركبات الفنولية (Morton وآخرون، 2000)، ينقسم هذا القسم إلى: مشتقات حمض البترويك (hydroxybenzoates) ومشتقات حمض السيناميك (phenylpropanoids) وحمض phenol carboxylic.

أ- مشتقات حمض البتزويك:

هي مركـــبات مشتـــقة من حمـــض البتزويك، لها هيكل C_6-C_1 وتتواجد في عاريات البذور (angiosperms) (Bruneton، 1993). من بين المركبات الأكثر شيوعا هي: حمض p-hydroxybenzoic وحمض الفانيليك وحمض syringic وحمض protocatechuic. يوجد حمض الغاليك في العديد من النباتات الخشبية. تشارك مشتقات ثلاثية الهيدروكسيل هذه في تشكيل الدباغ الغاليكية المميهة (hydrolysable gallotannins). يستعمل الفانيلين (vanillin) مثلا على نطاق واسع في المستحضرات الصيدلانية (Morton وآخرون، 2000).

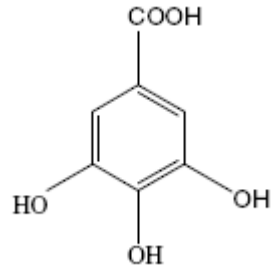
ب- مشتقات حمض السيناميك:

هي مركبات فنولية تحتوي على حلقة عطرية مرتبطة بسلسلة مكونة من ثلاث ذرات كربون. يعتبر حمض الهيدروكسي سيناميك (hydroxycynnamic acid) المركب الأكثر انتشارا، أما بقية المركبات المكونة

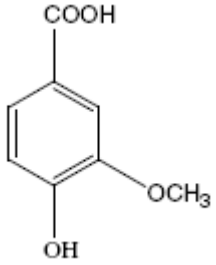
لهذا القسم فتشمل p-coumaric وحمض الكافييك وحمض الفيروليك وحمض السينابيك. يوجد حمض الهيدروكسي سيناميك في النباتات دائما في شكل مرتبط (Croft، 1998).

ج- حمض Phenol carboxylic:

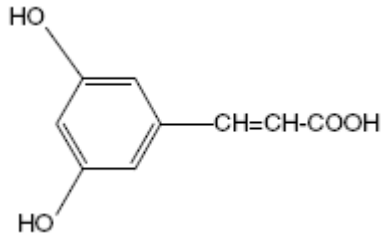
يمكن أن تتواجد هذه المجموعة من المركبات الفنولية في الطبيعة على شكل حر أو مرتبط مع السكريات غير المتجانسة وغير المرجعة في العديد من النباتات (Max، 1978)، حيث تم تسجيل أكثر من 700 كومارين (coumarins) في حوالي 100 عائلة (Croft، 2000).



حمض gallic



حمض vanillic



حمض caffeic (حمض 3,4-dihydroxycinnamic)

الشكل 4: البنية الكيميائية لبعض الأحماض الفنولية (Rodríguez Vaquero وآخرون، 2007)

III-2- الفلافونويدات:

الفلافونويدات هي مركبات فنولية تشمل أكثر من 600 بنية، تتواجد بكثرة في كل النباتات الأرضية (Bors وآخرون، 1997). تملك الفلافونويدات نفس نواة الفلافون المتكونة من حلقتي بنزين (A وB) والمرتبطتين بواسطة حلقة بيران (pyran) المحتوية على ذرة أوكسجين للحصول على أقسام بنيوية مختلفة من الفلافان أو مشتقات 2-phenylbenzopyran (الشكل 5) (Bravo، 1998؛ Narayana وآخرون، 2001).

يمكن أن تتغير هذه المركبات بإضافة مجاميع الهيدروكسيل و/أو مجاميع المثيل، وهي تعرض اختلافا بنيويا كبيرا، فالمجموعات الأساسية تشمل الفلافونولات والفلافونات والفلافانولات (flavan-3-ols) والأنتوسيانات، في حين تضم المجموعات الصغيرة الشالكونات (chalcones) والأورونات (aurones) ونظائر الفلافونويدات والفلافانولات وباقي الصبغات الفنولية (Forkmann، 1993).

أ- الفلافونولات (Flavonols) والفلافونات (Flavones):

الفلافونولات والفلافونات هي المجموعة الأكثر انتشارا في المركبات الفنولية، وتختلف الفلافونات عن الفلافونولات في عدم وجود مجموعة الهيدروكسيل على ذرة الكربون رقم 3 (الشكل 6)، يؤثر هذا الاختلاف على امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية والحركة الكروماتوغرافية والتفاعلات اللونية (Harborne، 1994).

والجدير بالذكر أن الفلافونات تتواجد في النباتات دائما مكان الفلافونولات، فبينما تتواجد الفلافونولات بكثرة في عاريات البذور الخشبية، تتواجد الفلافونات في عائلات النباتات العشبية (Harborne، 1994).

تتوزع الفلافونولات بصفة واسعة في النباتات، وتتواجد في أغلب الأحيان في التركيبات السكرية، والفلافونولات غير السكرية المعروفة أكثر هي kaempferol وquercitin وmyricetin التي تختلف فيما بينها

في عـــدد استبدالات مجمـــوعة الهيدروكسيل في الذراع الأيمـــن للحلقة، ويتواجـــد كل من kaempferol وquercitin في أكثر من نصف النباتات المدروسة (Harborne، 1994).

من جهة أخرى، توجد الفلافـــونات في النباتات العشبية والأكثر انتشارا هي apigenin وluteolin وtricetin (Harborne، 1994).

ب- الشالكونات (Chalcones) والأورونات (Aurones):

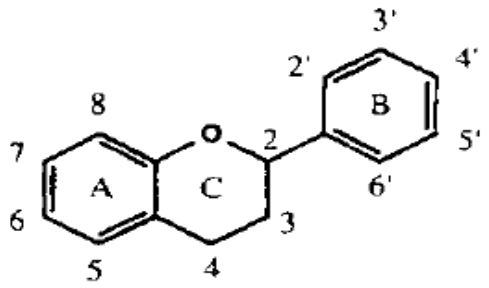
يتم التعرف على الشالكونات والأورونات أو كما تسمى بالصبغات الصفراء مباشرة بمعالجتها بالأمونيا، وقد اشتق اسم chalcone من كلمة يونانية *chalcos* التي تعني البرونز، في حين كان أصل كلمة aurone لاتيني *aurum* التي تعني الذهب. تتواجد عديدات الفنول هذه في أنسجة البتلات، إلا أن الشالكونات غير مقيدة بالبتلات فقط مثل الأورونات، بل تتواجـــد أيضا في قلب الخشب واللحاء والأوراق والثمار والجذور (Harborne، 1994). البنية الكيميائية لهما موضحة في الشكل 7.

ج- الفلافانونات (Flavanones):

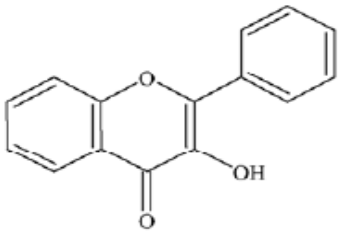
هي فلافونويدات ملونة تتميز بغياب الرابطة الثنائية في الوضعية 2 (الشكل 8)، وهي متماكبة (isomeric) مع الشالكونات. الفلافانون المعروف أكثر هو naringenin، وهو أول ما عزل من قشور الحمضيات، وهو المسؤول الرئيسي عن لذاعة الحمضيات (Bruneton، 1993).

د- نظائر الفلافونويدات (Isoflavonoids):

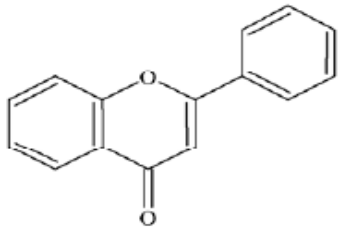
تختلف نظـــائر الفلافونويدات عن باقي أقسام الفلافونويدات بتنوعها البنيوي الكبير والتكرار الكبير لاستبدال isoprenoid ووجودها في النباتات في حالتها الحرة، وهي عبارة عن مماكبات للفلافونات، حيث تختلف عنها في وضعية ارتباط aryl الحلقة B مع مركز نواة البيران، أي أن الحلقة B مرتبطة في الوضعية 3 بدلا من الوضعية 2 (الشكل 9) (Lee وآخرون، 1994).



الشكل 5: الشكل العام للفلافونويدات (Middleton وآخرون، 2000)



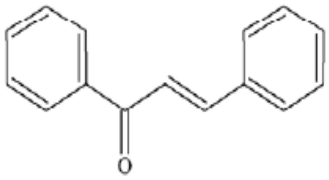
Flavonol



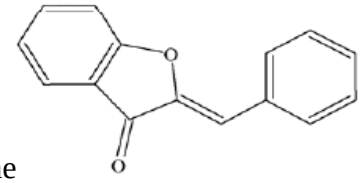
Flavone

الشكل 6: البنية الكيميائية لـــ Flavone وFlavonol (Cushnie وLamb، 2005)

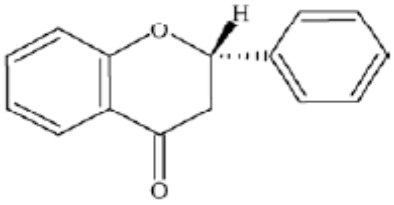
Chalcone



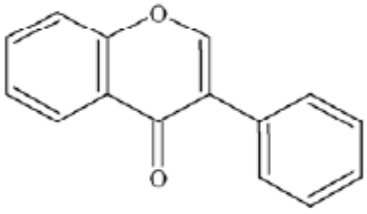
Aurone



الشكل 7: البنية الكيميائية لـــ Chalcone وAurone (Cushnie وLamb، 2005)



الشكل 8: البنية الكيميائية لـــ Flavanone (Cushnie وLamb، 2005)



الشكل 9: البنية الكيميائية لنظير الفلافون (Isoflavone) (Cushnie وLamb، 2005)

هـ- الأنتوسيانات (Anthocyanins):

هي المجموعة الأكثر أهمية وانتشارا في المواد الملونة. هذا المصطلح من أصل يوناني حيث *antho* تعني زهرة و*kyanos* تعني أزرق. هي صبغات قابلة للذوبان في الماء، وهي المسؤولة عن كل الألوان الوردية والحمراء والبنفسجية والأرجوانية والزرقاء في نباتات عاريات البذور (Bruneton، 1993).

تعتمد الأنتوسيانات كيميائيا على بنية عطرية واحدة هي cyanidin، التي تتشابه كثيرا مع بنية الفلافون إلا أنها تفتقد لمجموعة الهيدروكسيل في C_3، وكلها مشتقة من هذه الصبغة بإضافة أو استبدال مجاميع الهيدروكسيل أو المثيل أو مجاميع سكرية والشكـــل 10 يوضح البنية الكيميائية لمركب anthocyanidin. الأنتوسيانيدات هي أنتوسيانات غير سكرية تعتمد على كاتيون flavylium، ويمثلها كل من cyanidin وdelphinidin وmalvinidin (Jørgensen، 1998).

و- Flavan-3-ols وFlavan-3,4-diols:

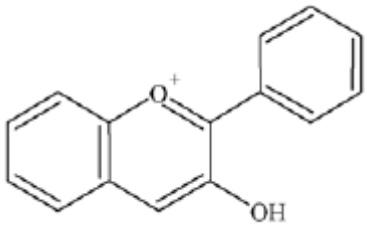
يملك flavan-3-ols أو flavanols مجموعة هيدروكسيل في C_3 لحلقة البيران المركزية، لكن تنقصه مجموعة كربونيل في C_4 ، يمثله catechin وgallocatechin (Markham، 1989). أما flavan-3,4-diols أو leucoanthocyanidins فيحتوي على مجاميع الهيدروكسيل في C_3 وC_4 للحلقة B (الشكل 11).

ز- الفلافونويدات السكرية (Flavonoids glycosides):

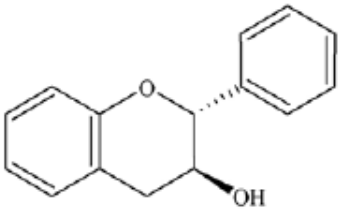
هي الشكل الأكثر انتشارا للفلافونويدات الموجودة في النباتات، وهي تنقسم إلى قسمين: C-glycosides مثل apigenin8-C-β-D glucopyranoside، وO-glycosides مثل rutin وdiosmin (Harborne، 1994).

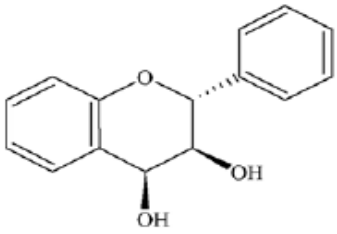
ح- الفلافونويدات الكبريتية (Sulphated flavonoids):

الفلافونويدات الكبريتية هي مركبات فنولية تذوب في الماء، تحتوي من 1 إلى 4 مجموعات كبريتية مرتبطة بمجاميع الهيدروكسيل للفنول أو للسكر (Harborne، 1994).

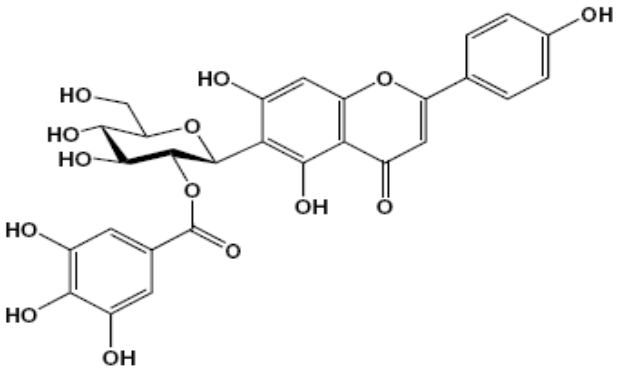


الشكل 10: البنية الكيميائية لـــ anthocyanidin (Cushnie و Lamb، 2005)

Flavan-3-ol 

Flavan-3,4-diol 

الشكل 11: البنية الكيميائية لـــ Flavan-3-ol و Flavan-3,4-diol (Cushnie و Lamb، 2005)



الشكل 12: البنية الكيميائية لـــ apigenin 6-C-β-D-glucopyranoside (Kanchanapoom، 2007)

ط- الفلافونويدات الثنائية (Biflavonoids):

يتم تشكلها بربط جزيئتي فلافونويد برابطة كربون-كربون، الذي ينتج عنه biflavones أو biflavanones أو جزيئة flavone-flavanone وذلك حسب نوع المركبات التي تم ربطها (الشكل 13) (Harborne، 1994).

III-3- الدباغ (Tannins):

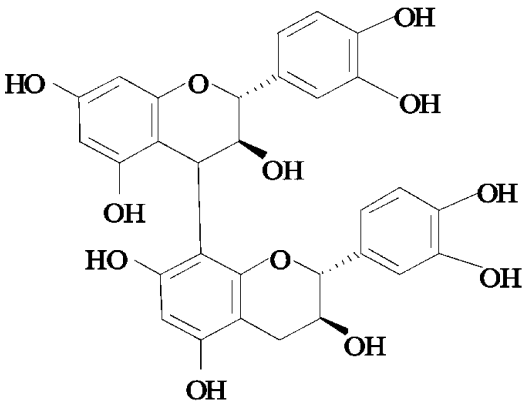
هي مركبات فنولية عديدة الوحدات، يتراوح وزنها الجزيئي بين 500 و20000 دالتن، تذوب في الماء باستثناء بعض البنيات ذات الوزن الجزيئي العالي، لها القدرة على الارتباط مع البروتينات لتشكيل معقدات دباغ-بروتين قابلة أو غير قابلة للذوبان (Haslam، 1993). تنقسم الدباغ إلى مجموعتين: الدباغ المميهة (hydrolysable tannins) والدباغ المكثفة (condensed tannins) أو تسمى البروأنتوسيانيدات (proanthocyanidins) (Bruneton، 1993).

أ- الدباغ المميهة:

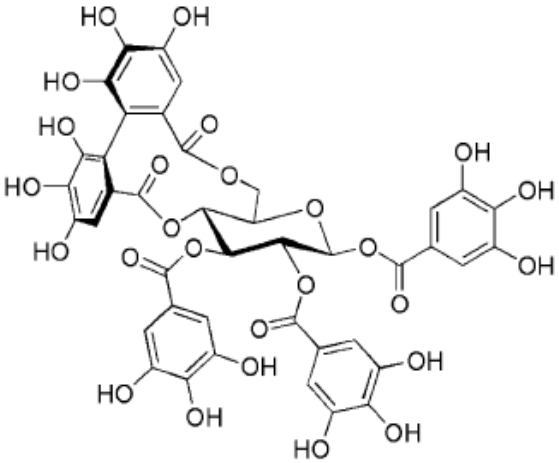
تتكون الدباغ المميهة من عديد وحدات غير متجانس، تؤدي إماهتها الكيميائية أو الإنزيمية إلى تحرير سكر عادة ما يكون سكر الغلوكوز وحمض فنولي (الشكل14) (Mehansho وآخرون، 1987). تتم أسترة مجاميع الهيدروكسيل لهذه الكربوهيدرات جزئيا أو كليا بمجاميع فنولية مثل حمض الغاليك فتنتج دباغ غاليكية (gallotannins)، أو حمض الإيلاجيك لتنتج دباغ إيلاجيكية (ellagitannins) (Scalbert وآخرون، 1989).

ب- الدباغ المكثفة أو البروأنتوسيانيدات:

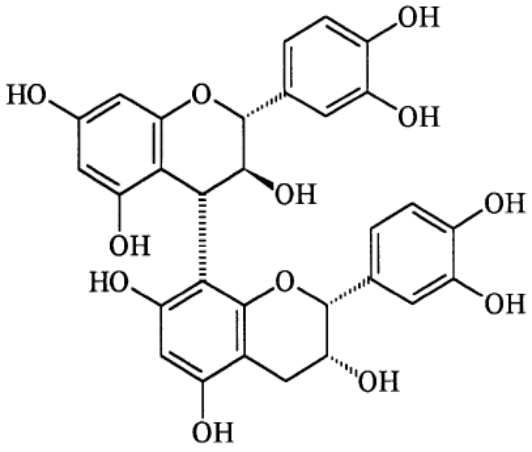
هي عبارة عن عديد وحدات من الفلافونويدات (مثل flavan-3-ols) مرتبطة ببعضها البعض بروابط كربون-كربون (الشكل 15) (Mehansho وآخرون، 1987). يعود اسم الدباغ المكثفة إلى بنيتها الكيميائية المكثفة. يمكن أن تحتوي البروأنتوسيانيدات على 2 إلى 50 أو أكثر من وحدات الفلافونويد، وهي ذات بنيات معقدة لأنه يمكن أن تختلف وحدات الفلافونويد في بعض الاستبدالات، وبسبب تغير مواقع الروابط داخل الفلافان (Haslam، 1993).



الشكل 13: البنية الكيميائية لفلافان ثنائي (biflavan) (Yao وآخرون، 2004)



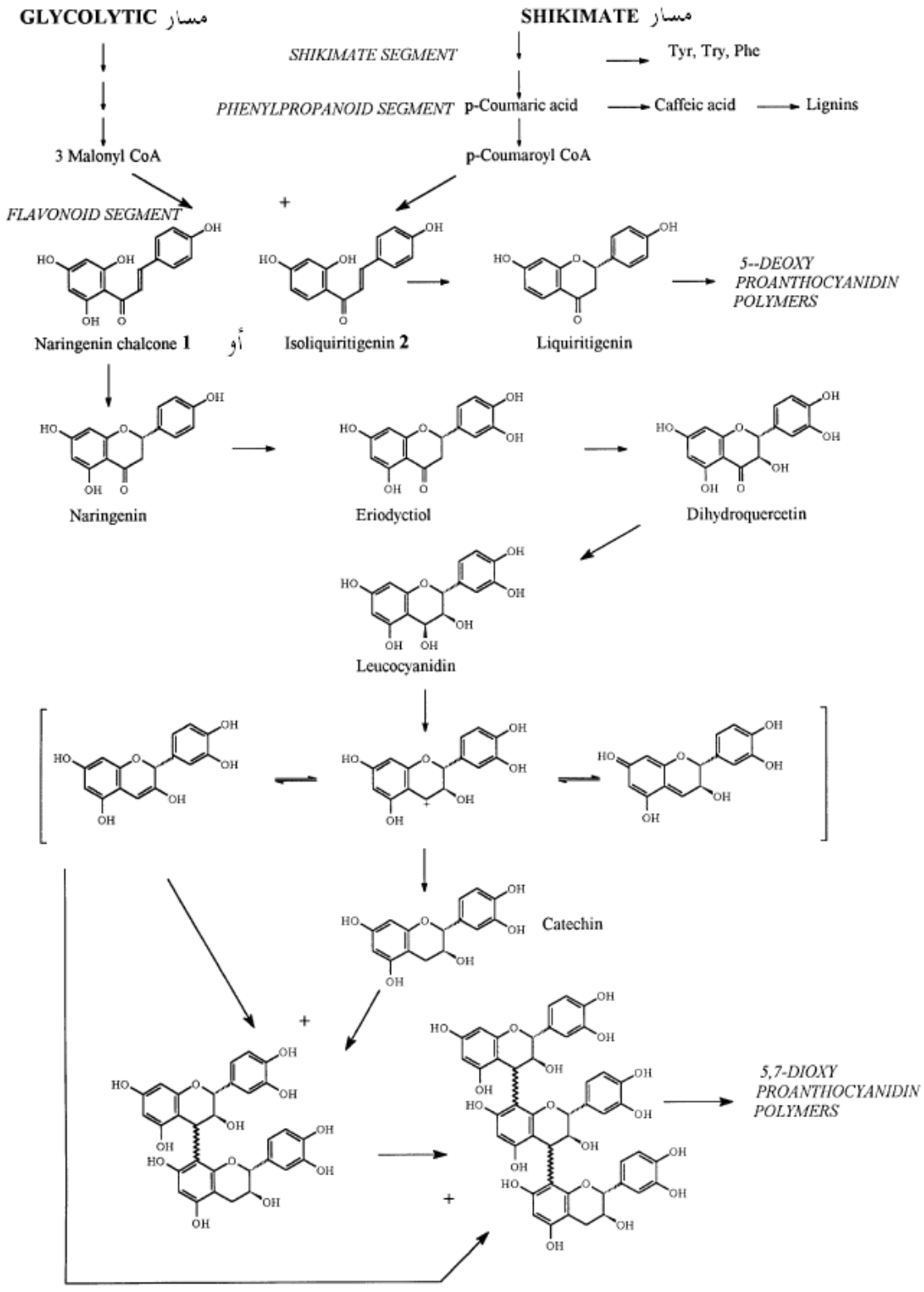
الشكل 14: البنية الكيميائية لـــ tellimagrandin II (دباغ مميهة) (Niemetz وGross، 2005)



الشكل 15: البنية الكيميائية لـــ procyanidin B_4 (دباغ مكثفة) (De Bruyne وآخرون، 1999)

III-4- البناء الحيوي للمركبات الفنولية:

تشمل المركبات الفنولية النباتية كل الجزيئات العطرية من الأحماض الأمينية العطرية البسيطة إلى الدباغ المكثفة. يتم بناؤها الحيوي عبر مسار يتكون من ثلاث أقسام رئيسية: قسم shikimate المنتج للأحماض الأمينية العطرية (فنيل ألانين والتيروزين والتربتوفان)، وقسم phenylpropanoid الذي ينتج مشتقات حمض السينناميك التي تعتبر طلائع الفلافونويدات واللجنينات، وقسم الفلافونويدات الذي ينتج مختلف مركبات الفلافونويدات. يبدأ البنـــاء الحيـــوي لـــ 5,7 dioxy-proanthocyanidins بإضـــافة ثلاث جزيئـــات من malonyl-CoA إلى جزيئة p-coumaryl-CoA لينتج الشالكون naringenin 1 بواسطة إنزيم chalcone synthase. بعد ذلك ينظم إنزيم chalcone isomerase الدورة للحصول على naringenin وهو طليعة المركبات التالية: flavan-3,4-diols وflavan-3-ols وprocyanidins وprodelphinidins (De Bruyne وآخرون، 1999). كما تم اقتراح بناء 5-deoxy proanthocyanidins بمسار مستمد من liquiritigenin عبر isoliquiritigenin، ويفسر هذا المسار بترافق إنزيم chalcone synthase مع إنزيم NADPH-dependent reductase (Lewis وYamamoto، 1989)، وأهم طريق للحصول على 2,3-trans procyanidins يتم حسب الترتيب التالي: naringenin ← eriodyctiol ← dihydroquercetin ← leucocyanidin ← catechin، ثم تتم إضافات متتابعة من الوسيط quinone-methide المشتق من flavan-3,4-diols إلى flavan-3-ol أو إلى السلسلة الموجودة من قبل (De Bruyne وآخرون، 1999)، إضافة إلى بعض التغيرات مثل إضافة مجاميع الهيدروكسيل أو الميثيل أو السكر (Forkmann، 1993).



الشكل 16: البناء الحيوي لبعض المركبات الفنولية (De Bruyne وآخرون، 1999)

III-5- النشاطية الحيوية للمركبات الفنولية:

تملك المركبات الفنولية نشاطية بيولوجية متنوعة، منها النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة والفيروسات والنشاطية المضادة للالتهاب والنشاطية المضادة للأورام والسرطان والنشاطية المضادة للأكسدة، كما تقلل هذه المركبات من خطر أمراض القلب (Lule وXia، 2005). تعود هذه الخصائص إلى قدرتها على تشكيل معقدات سواء مع أيونات معدنية أو مع جزيئات ضخمة مثل البروتينات وعديدات السكريات، إضافة إلى خصائصها المضادة للأكسدة وإزاحة الجذور الحرة المستمدة أساسا من الخواص الفيزيائية والكيميائية لهيكل المركبات الفنولية (De Bruyne وآخرون، 1999). كما تملك الدباغ نشاطية مضادة للقرحة والإسهال (De Bruyne وآخرون، 1999)، حيث ثبت أن عدة دباغ مميهة تثبط بكتيريا *Helicobacter pylori* المسببة للقرحة المعدية (Okuda، 2005). وقد دلت دراسات Rodríguez Vaquero وآخرون (2007) أن الفلافونويدات مضادة لارتفاع ضغط الدم ومضادة للحساسية ومضادة للروماتيزم وتمنع فوق أكسدة الليبيدات، وأن زيادة استهلاك الفلافونويدات مرتبط بانخفاض خطر الإصابة بالأمراض المزمنة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية.

IV- النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة:

IV-1- العوامل المضادة للأحياء الدقيقة:

تعتبر معظم هذه العوامل من المستقلبات الثانوية للنبات، مثل المضادات الحيوية التي يتم تصنيعها من طرف الأحياء الدقيقة (Hugo وRussell، 1998) ومواد أخرى ذات أصل نباتي التي تصنع من طرف النبات في كثير من الحالات كوسيلة دفاع ضد الأحياء الدقيقة والحشرات وآكلات الأعشاب، إلا أن البعض منها مثل التربينويدات تعطي روائح مميزة للنباتات، وأخرى مثل quinones والدباغ مسؤولة عن إعطاء اللون الخاص

بالنبات، والعديد منها مسؤول عن النكهة مثل capsaicin (terpenoid) الموجود في نبات الفلفل الحار *Capsicum annuum*، وبعض الأعشاب والتوابل الغذائية تستعمل في العلاج (Cowan، 1999).

IV-1-1- المركبات الفنولية:

أ- الفنولات البسيطة و الأحماض الفنولية:

من الأحماض الفنولية الأكثر شيوعا حمض الكافييك وحمض السيناميك، حيث وجد أن كل من الطرخون (tarragon) والزعتر يحتويان على حمض الكافييك وهو فعال ضد الفيروسات والبكتيريا والفطريات، إضافة إلى catechol وpyrogallol وكلاهما من الفنولات الهيدروكسيلية حيث أظهرا سمية ضد الكائنات الحية الدقيقة، ويعتقد أن عدد مجاميع الهيدروكسيل في المجاميع الفنولية له صلة بسميتها النسبية على الأحياء الدقيقة (Cowan، 1999).

كما وجد أن حمض الغاليك وحمض p-hydroxybenzoic والمركبات المتعلقة بهما تؤخر أو تمنع جزئيا نمو أو إنتاج سموم بكتيريا *Clostridium botulinum* من النمط A وB، وتزداد نشاطيتها التثبيطية بانخفاض تركيز البكتيريا، كما يثبط مركب ethyl p-methoxycinnamate بصورة طبيعية نمو الأعفان بتراكيز تتراوح بين 10 و50 جزء من المليون (Lule وXia، 2005).

كما أظهرت المركبات الفنولية الموجودة في نبات *Scrophularia frutescens* ونبات *S.sambucifolia* نشاطية على الأنواع البكتيرية موجبة الغرام (Fernandez وآخرون، 1996). ويعد نبات *S. frutescens* من أغنى الأنواع بالأحماض الفنولية، ويملك نشاطا عاليا ضد البكتيريا، مما يدعم دور عديدات الفنول في تثبيط النمو البكتيري (Fernandez وآخرون، 1996).

ب- الفلافونويدات:

تقوم النباتات بتصنيع الفلافونويدات كرد فعل على الإصابة بالأحياء الدقيقة، وبالتالي فليس من الغريب أن تظهر هذه المركبات نشاطية مضادة للكائنات الدقيقة في التجارب المخبرية، وقد تعود هذه النشاطية إلى قدرتها على تشكيل معقدات مع البروتينات الخارجية والذائبة ومع بروتينات جدران الخلايا البكتيرية، حيث وجد أن الكثير من الفلافونويدات الذائبة في الدهون يمكن أن تعيق عمل أغشية الكائنات الحية (Cowan، 1999).

أظهرت مستخلصات بعض النباتات التي كانت تستخدم في الطب التقليدي نشاطية مضادة للبكتيريا في الكثير من الأبحاث والتجارب المخبرية، وهذا ما أدى بكثير من الباحثين إلى عزل وتحديد البنية الكيميائية ونشاطية الفلافونويدات التجارية. من الأمثلة على ذلك المركبات التالية: apigenin وgalangin وpinocembrin وponciretin وnaringin وnaringenin وepigallocatechin gallate ومشتقاته وquercetin وluteolin وluteolin 7-glucoside و3-*O*-methylquercetin وkaempferol ومشتقاته والفلافونات السكرية ونظائر الفلافون والفلافانونات ونظائر الفلافانونات والفلافونولات والفلافونولات السكرية والشالكونات (Cushnie وLamb، 2005).

نظرا لقدرة الفلافونويدات الكبيرة على تثبيط إنبات الأبواغ الفطرية الممرضة للنباتات، فقد اقترحت هذه المركبات للاستعمال الطبي ضد الأنواع الفطرية الممرضة للإنسان. حيث أظهر الفلافونويد 7-hydroxy-3',4'-(methylenedioxy)flavan المعزول من قشور فواكه *Terminalia bellerica* نشاطا مضادا لخميرة *Candida albicans*، كما أظهر galangin، فلافونول موجود في عينات العبكر (propolis)، نشاطية تثبيطية على بعض الأنواع الفطرية مثل *Aspergillus tamarii* و*Aspergillus flavus*

Cushnie) *Penicillium italicum* و*Penicillium digitatum* و*Cladosporium sphaerospermum* و Lamb، 2005).

ج- الدباغ:

حضيت هذه المركبات في السنوات الأخيرة بقدر كبير من الاهتمام، حيث أظهرت الكثير من الدراسات أن استهلاك المشروبات التي تحتوي على الدباغ، مثل الشاي الأخضر، يمكن أن تعالج أو تحمي من العديد من الأمراض وتأثيرات أخرى، وقد تكون آلية عمل هذه المركبات بإعاقة التصاق الأحياء الدقيقة، أو تثبيط الإنزيمات أو بروتينات النقل على مستوى الجدار الخلوي، كما تشكل هذه المركبات أيضا معقدات مع عديد السكريات (Cowan، 1999).

حيث قام Funatogawa وآخرون (2004) باختبار نشاطية مركبات 40 نباتا على بكتيريا *Helicobacter pylori* مخبريا، وأظهرت كل الدباغ المميهة المختبرة نشاطية ضد هذه البكتيريا، والتي يمكنها أن تثبط نمو بكتيريا *H. pylori* دون التأثير على الفلورا المعوية.

IV-1-2- التربينويدات (terpenoids) والزيوت الأساسية:

هي مستقلبات نباتية ثانوية غنية جدا بالمركبات المعتمدة على بنية isoprene. يطلق عليها اسم التربينات (terpenes)، صيغتها الكيميائية العامة هي $C_{10}H_{16}$ ويمكن أن تكون مركبات sesquiterpenes (C_{15}) أو تربينات ثنائية (diterpenes) (C_{20}) أو تربينات ثلاثية (triterpenes) (C_{30}) ... الخ، وعندما تتضمن هذه المركبات عناصر إضافية (عادة الأوكسجين) تسمى تربينويدات (terpenoids) (Cowan، 1999).

تملك التربينات أو التربينويدات نشاطية مضادة للبكتيريا والفطريات (Taylor وآخرون، 1996) والفيروسات (Sun وآخرون، 1996) والبروتوزوا (protozoa) (Ghoshal وآخرون، 1996). حيث وجد أن حمض betulinic (تربينويد) يثبط فيروس HIV، كما وجد أن capsaicin الذي قد يعزز من نمو خميرة

Candida albicans، إلا أنه يثبط مختلف الأنواع البكتيرية وبدرجات متفاوتة، وقد يعود بالضرر على الغشاء المخاطي للجهاز الهضمي للإنسان عند استهلاكه رغم أنه يعمل على قتل بكتيريا *Helicobacter pylori*، كما أن aframodial (تربين ثنائي)، هو من التوابل الكاميرونية، له تأثير واسع على الفطريات (Cowan، 1999). بالإضافة إلى ذلك فإن مركب petalostemumol (تربينويد) الذي تم استخراجه من الجزء الذائب في الإيثانول لبرسيم المروج الأرجواني، أظهر نشاطية عالية ضد بكتيريا *Bacillus subtilis* وبكتيريا *Staphylococcus aureus* ونشاطية أقل على البكتيريا غرام سالب وخميرة *Candida albicans* (Hufford وآخرون، 1993).

IV-1-3- القلويدات (alkaloids):

هي مركبات نتروجينية غير متجانسة الحلقات، وأول نموذج مفيد طبيا هو morphine، الذي تم عزله سنة 1805 من نبات *Papaver somniferum*، ونجد أن solamargine، هو من القلويدات السكرية في نبات *Solanum khasianum*، وقلويدات أخرى قد تكون مفيدة ضد فيروس HIV (Cowan، 1999). أهم مركب يمثل مجموعة القلويدات هو berberine، الذي يملك فعالية ضد الأوليات مثل trypanosomes وplasmodia، وقد يعود تأثير القلويدات مثل berberine وharmane إلى قدرتها على التداخل مع الحمض النووي (Cowan، 1999).

IV-1-4- اللكتينات (lectins) وعديدات الببتيد (polypeptides):

تم إثبات نشاطية الببتيدات المضادة للكائنات الدقيقة أول مرة في سنة 1942 (Balls وآخرون، 1942). تكون هذه المركبات في الغالب ذات شحنة موجبة وتحتوي على روابط ثنائية الكبريت، قد تكون آلية عملها بتكوين قنوات أيونية في أغشية الأحياء الدقيقة أو بالتثبيط التنافسي مع بروتيناتها للالتصاق بالمستقبل متعدد السكريات للعائل (Cowan، 1999). في الآونة الأخيرة، انصب الاهتمام على دراسة الببتيدات واللكتينات المضادة لفيروس HIV، أما تثبيطها للبكتيريا والفطريات فهو معروف منذ زمن (Cowan، 1999).

Thionins هي ببتيدات شائعة في القمح والشعير تتكون من 47 جذر حمض آميني، وهي سامة على الخمائر والبكتيريا السالبة والموجبة الغرام، إلا أنه وجد أن ببتيدات Thionins AX1 وAX2 الموجودة في البنجر السكري تؤثر على الفطريات ولا تؤثر على البكتيريا (Cowan، 1999).

ووجد أن عدد كبير من جزيئات اللكتين، الذي يضم لكتينات محددة بالمانوز (mannose) من مختلف النباتات وMAP30 من لذاعة البطيخ وGAP31 من نبات *Gelonium multiflorum* وjacalin، يثبط انتشار الفيروسات (HIV، cytomegalovirus)، الذي ربما يكون بتثبيط تفاعل الفيروسات مع مركبات خلية العائل المستهدفة (Cowan، 1999).

IV-1-5- المضادات الحيوية:

يعرف المضاد الحيوي على أنه مادة يتم إنتاجها من طرف كائن حي دقيق وتعمل على تثبيط نمو باقي الأحياء الدقيقة. إلا أن تطور الطرق الصناعية أدى إلى تغيير هذا المفهوم، ليصبح المضاد الحيوي هو المادة التي ينتجها الكائن الدقيق أو مادة مماثلة لها يتم إنتاجها كليا أو جزئيا بالبناء الكيميائي، تكون بتراكيز منخفضة وتقوم بتثبيط نمو باقي الأحياء الدقيقة (Hugo وRussell، 1998).

حسب Hugo وRussell (1998) هناك ثلاثة مصادر أساسية للحصول على المضادات الحيوية:

- **من الأحياء الدقيقة**: هناك العديد من الأمثلة عليها، نذكر bacitracin وpolymyxin التي نحصل عليها من أنواع *Bacillus* وgentamicin من بكتيريا *Micromonospora purpurea* وmonobactams من بكتيريا *Pseudomonas acidophila* وأنـــواع *Gluconobacter*، وgriseofulvin وبعض أنـــواع penicillin وcephalosporins من بعض الأنواع الفطرية (*Penicillium* و*Acremonium*) من عائلة Aspergillaceae.

- **بالطرق الصناعية**: مثل chloramphenicol الذي يصنع بطرق صناعية.

- **بالطرق نصف الصناعية:** يتم إنتاج قسم من الجزيئة بعملية التخمر باستعمال الكائن الحي الدقيق المناسب، ثم يتم إحداث تغييرات بنيوية على الناتج، وينتج الكثير من penicillin وcephalosporins بهذه الطريقة.

تعتبر السمية الانتقائية واحدة من الخصائص المهمة للمضادات الحيوية، كما ينبغي أن تتوفر العديد من الخصائص الأخرى مثل التي ذكرها Hogg (2005) وهي:

- أن تكون المضادات الحيوية، مثلها مثل باقي الأدوية الكيميائية، قابلة للذوبان في جسم الإنسان من أجل تأثيرها عن طريق اختراق أنسجة الجسم، كما يجب استقلابها بسرعة وإفرازها من الجسم بعد السماح لها للقيام بعملها.
- يجب أن لا تتأثر بحموضة المعدة ولا تثبط عملها عند تناولها عن طريق الفم، وأن تكون قابلة للامتصاص بواسطة الأمعاء الدقيقة.
- أن لا يكون لها تأثير كبير على الفلورا المعوية للكائن العائل.
- أن يكون من الصعب على مسببات المرض تشكيل مقاومة ضدها.

حسب طريقة تأثيرها على الكائنات الدقيقة يقسم Hogg (2005) المضادات الحيوية إلى أربع مجموعات:

المجموعة الأولى: المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع جدران الخلية

إن المجموعة الرئيسية التي تعمل على تثبيط تصنيع جدران الخلية هي المضادات الحيوية β-lactam، وسميت بهذا الاسم لاحتوائها على حلقة β-lactam في بنيتها وتضم هذه المجموعة penicillins وcephalosporins.

إن أهم عامل لتقوية مركب peptidoglycan الموجود في الجدران الخلوية البكتيرية هو عبور cross-linking السلاسل بـــ transpeptidation، ومن هنا يكون عمل β-lactam، حيث ترتبط بشكل غير عكسي على إنزيم transpeptidase مشكلة روابط تكافئية مع جذر السيرين (serine) للموقع النشط للإنزيم، وبالتالي يستمر تشكيل الجدار الخلوي إلا أنه يصبح ضعيفا تدريجيا، غير مرتبط وpeptidoglycan ثابت. كما أن وجود البكتيريا عادة في بيئات منخفضة التوتر إضافة إلى ضعف الجدار يؤدي إلى دخول الماء إلى الخلية وانتفاخها ثم تحللها.

المجموعة الثانية: المضادات الحيوية المعيقة لأغشية الخلايا

المضادات الحيوية التي تنتمي إلى هذه المجموعة هي polymixins وتعمل على تعطيل فوسفوليبيدات الغشاء السيتوبلازمي مسببة خروج محتويات الخلية. تنتج طبيعيا من طرف أنواع *Bacillus*. فعالة على الجروح والحروق ذات العدوى ببكتيريا *Pseudomonas*، وفي كثير من الأحيان تستعمل مع bacitracin وneomycin (مضادات حيوية مثبطة لتصنيع البروتينات). نظرا لسميتها فهي غير صالحة للاستعمال الداخلي. المضادات الحيوية المتعددة (polyene) مثل amphotericin وnystatin هي مضادة للفطريات حيث تعمل على مركب الستيرول (sterol) الموجود في الأغشية.

المجموعة الثالثة: المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع البروتين

تملك المضادات الحيوية التي تؤثر على تصنيع البروتين عموما مجالا واسعا نسبيا لتأثيرها. streptomycin هو أول المضادات الحيوية التي أظهرت نشاطية على الكائنات سالبة الغرام، حيث ثبتت نشاطيته خاصة في علاج مرض السل، العامل المسبب لهذا المرض هو بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* التي كانت تحمي نفسها من البنسلين بطبقة شمعية من حمض mycolic في جدران خلاياها.

ينتمي streptomycin إلى مجموعة من المضادات الحيوية تسمى aminoglycosides، وهو يعمل بارتباطه على تحت الوحدة الريبوزومية البكتيرية 30S على منع ارتباطها بتحت الوحدة 50S وتشكل المعقد الابتدائي، وبالتالي يمكنها التمييز بين ريبوزومات الكائنات بدائية النواة (70S) وريبوزومات الكائنات حقيقية النواة (80S)، والنتيجة هي ارتفاع قيمتها العلاجية نسبيا (وإن لم تكن مرتفعة مثل مثبطات جدار الخلية). بعض المضادات الحيوية التي تنتمي إلى هذه المجموعة يوجد gentamicin وkanamycin وneomycin.

تعمل tetracyclines أيضا، بالارتباط على تحت الوحدة الريبوزومية 30S، على منع ارتباط aminoacyl tRNA وامتداد السلسلة الببتيدية. يتم إنتاجها من طرف ***Streptomyces sp***، وسواء كانت طبيعية أو نصف مصنعة فهي سهلة الامتصاص من طرف الأمعاء مما يتيح استعمالها عن طريق الفم.

المجموعة الرابعة: المضادات الحيوية المثبطة لتصنيع الحمض النووي

Rifampin هو من المضادات الحيوية التي تنتمي إلى مجموعة rifamycins، يعمل على تثبيط إنزيم RNA polymerase، وبالتالي منع إنتاج mRNA. يستعمل ضد البكتيريا المسببة للسل. خلافا لمعظم المضادات الحيوية يتفاعل rifampin مع أدوية أخرى وفي كثير من الحالات يؤدي إلى خفض أو إبطال مفعولها. كما لديه أعراض جانبية عند استعماله بجرعات عالية حيث يؤدي إلى تغييرات في لون الإفرازات مثل الدموع واللعاب والعرق وكذلك الجلد إلى اللون البرتقالي.

IV-2- طرق دراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة:

من الطرق الأكثر شيوعا لدراسة نشاطية المستخلصات النباتية المضادة للبكتيريا اختبار الانتشار على الآجار باستعمال الأقراص (disc diffusion agar)، التخفيف على الآجار (agar dilution) والتخفيف أو التخفيف الدقيق في المرق (broth dilution/microdilution). تعتمد هذه الطرق على الاختبار المرجعي للمضادات الحيوية. قد تؤثر عدة عوامل على مدى تلاؤم هذه الطرق مع المستخلصات النباتية، منها نوع

الكائن الدقيق المختبر وتركيز اللقاح وطبيعة الوسط وطبيعة المستخلص المراد دراسته (درجة الحموضة والتحلل) (Wilkinson، 2006).

تستعمل طريقتي اختبار الانتشار على الآجار باستعمال الأقراص والتخفيف على الآجار البكتيريا النامية على الوسط الصلب، وهما طريقتين سريعتين نسبيا، غير مكلفتين ولا تحتاجان إلى معدات مخبرية متطورة، غير أنهما لا تخلوان من العيوب (Wilkinson، 2006).

IV-2-1- طريقة الانتشار على الأقراص في الوسط الصلب:

تسمى أيضا بطريقة منطقة التثبيط، ويحتمل أن تكون الطريقة الأكثر استعمالا لدراسة النشاطية المضادة للبكتيريا. تستعمل هذه الطريقة كميات صغيرة من المادة المراد دراستها (10-30 µل)، وهي تتضمن تحضير أطباق بتري تحتوي على 15-25 مل آجار، ثم يتم زرعها بتركيز معروف من البكتيريا، ثم يوضع القرص (6 أو 8 مم) الذي يحتوي على حجم معين من المادة المختبرة في مركز الآجار، ثم تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة أو أكثر. بعد مرور هذه المدة، يقاس قطر المنطقة النيرة (منطقة التثبيط) المحيطة بالقرص وتقارن مع مناطق المضادات الحيوية المرجعية أو مواد كيميائية معزولة أو مستخلصات مماثلة. إذا كان المستخلص لزجا أو عبارة عن مادة صلبة فإن القرص يعوض ببئر يتم إنشاؤه في الآجار لتوضع فيه المادة مما يسمح لها بالانتشار (Wilkinson، 2006). هي طريقة كيفية وليست كمية حيث يتم الإشارة إلى وجود التثبيط أو عدم وجوده دون التعرف على التركيز المثبط (Gautam وآخرون، 2007).

IV-2-2- طريقة التخفيف على الوسط الصلب:

تسمح هذه الطريقة باختبار تراكيز معينة لمستخلصات أو مركبات معينة من أجل تقييم نشاطيتها وتحديد قيم تراكيزها الدنيا المثبطة (MIC) (Gautam وآخرون، 2007). حيث يتم إدماج المادة المختبرة بتركيز معين في وسط الآجار وتطبق البكتيريا على سطح الآجار، ويمكن تطبيق مجموعة من الأنواع البكتيرية في طبق

واحد. تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة أو أكثر، بعدها يتم تسجيل نمو أو عدم نمو البكتيريا (Wilkinson، 2006).

من عيوب هذه الطريقة استعمال أحجام كبيرة من المادة المراد دراستها مقارنة بالطرق الأخرى، وصعوبة تحقيق الاستقرار لمستحلبات الزيوت الأساسية والتحديد المسبق للتركيز الأقصى المستعمل الذي لا يؤثر على تصلب الآجار (Wilkinson، 2006).

IV-2-3- طريقة التخفيف في الوسط السائل:

تنمى البكتيريا في هذه الطريقة في أنابيب اختبار تحتوي على وسط سائل مع المادة المراد دراستها، يتم أخذ العينات خلال فترات زمنية منتظمة، لتحديد العدد البكتيري بإجراء تخافيف متتالية للعينة، وتحضن في وسط آجار ثم تعد وحدات المستعمرات المتشكلة. مقارنة بالطريقتين السابقتين تسمح هذه الطريقة بتحديد أدق للعوامل المضادة للبكتيريا حسب الزمن وتحديد الوقت الذي تم فيه قتل الكائنات الدقيقة، إلا أن احتياجها لزمن طويل وموارد كثيرة يجعلها غير عملية لاختبار عدد كبير من المواد (Wilkinson، 2006).

كما تم تطوير طريقة التخافيف الدقيقة في المرق وذلك باستعمال الشرائح الدقيقة (microtitre plate)، وبالتالي الخفض من حجم المستخلص المراد دراسته. حيث تقاس عكارة الوسط بجهاز المطياف الضوئي أو باستعمال مؤشرات على الخلايا الحية مثل resazurin وmethylthiazoldiphenyltetrazolium. تستعمل هذه الطريقة عموما مع المستخلصات النباتية إلا أنه يحدث مشكل مع المستخلصات الملونة بشدة لأنها تتداخل مع قياس المؤشرات الكيميائية (Wilkinson، 2006).

V- النشاطية المضادة للأكسدة:

V-1- الإجهاد التأكسدي:

ينتج الإجهاد التأكسدي باختلال التوازن بين طلائع المؤكسدات ومضادات الأكسدة، حيث يمثل طلائع المؤكسدات الأنواع النشطة المشتقة من الأكسجين والنتروجين، التي يتم إنتاجها بصورة دائمة من طرف الخلايا خاصة على مستوى الميتوكوندري خلال عملية التنفس الخلوي، وفي الخلايا الداخلية للأوعية بتنشيط إنزيم xanthine oxidase، وفي حالة ارتفاع حموضة الدم (acidose) خلال الأكسدة الذاتية للكاتيكولامينات (catecholamines)، وخلال الالتهاب بواسطة إنزيم NADPH oxidase وmyeloperoxidase وخلال اضطراب استقلاب الكالسيوم (Groussard، 2006).

V-2- الجذور الحرة:

الجذور الحرة هي الجزيئات التي تملك إلكترون حر (فردي) وتكون نشطة جدا، حيث يتم تشكيلها خلال تفاعلات الأكسدة التي تحدث كجزء طبيعي من الاستقلاب، إلا أنه في بعض الحالات، مثل الإجهاد البيئي أو الإصابة بجروح أو الإصابة بعامل ممرض، يرتفع تركيز الجذور الحرة عن المستوى العادي، مما يؤدي إلى أضرار بالغة في حالة عدم إزاحتها، وتعود هذه النتائج إلى نشاطها العالي، خاصة تجاه الحمض النووي DNA والأغشية (الدهون والبروتينات)، وفي جزء التفاعلات التي تبدؤها، حيث تفاعل الجذر الحر مع جزيئة أخرى يعطي إلكترون وبالتالي ينتج جذر آخر الذي يتفاعل بدوره مع جزيئات أخرى (Vermerris وNicholson، 2006).

V-1-2- الأنواع الأكسجينية النشطة ROS:

الأنواع الأكسجينية النشطة هي جزيئات تحتوي على الأكسجين، عالية النشاط بسبب وجود جذر حر، أو بإعداد ذرة الأكسجين بحيث تكون الإلكترونات أكثر من المعتاد، مثل جذر الهيدروكسيل ($OH^{\cdot}$)

وجذر superoxide ($O_2^{\cdot -}$) من المجموعة الأولى، وperoxide (O_2^{-2}) وأيونات hypochlorite ($ClO^{\cdot -}$) من المجموعة الثانية، إضافة إلى H_2O_2 الذي يعتبر أيضا من ROS بسبب نشاطيته، ويعتبر جذر الهيدروكسيل من أكثر الجذور نشاطا، بسبب قدرته على التفاعل مع مجموعة واسعة من الجزيئات (البيولوجية)، والذي يمكن إنتاجه بتفاعل Fenton (Vermerris وNicholson، 2006) كما يلي:

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^{\cdot -}$$

إضافة إلى جذر superoxide الذي يتم تحويله إلى H_2O_2 بواسطة إنزيم superoxide dismutase، أو يحول بطريقة غير إنزيمية إلى أنواع غير جذرية نشطة H_2O_2 والأكسجين المهيج $^1O_2$، في حالة وجود معادن مرجعة مثل أيونات الحديد أو النحاس، يتحول H_2O_2 إلى جذر الهيدروكسيل النشط ($OH^{\cdot}$)، وبدلا من ذلك يمكن أن يتحول H_2O_2 إلى H_2O بواسطة إنزيم catalase أو glutathione peroxidase (Dröge، 2002).

V-2-2- الأنواع النتروجينية النشطة RNS:

يتم إنتاج جذر NO في الكائنات الراقية بأكسدة ذرة guanido-nitrogen النهائية لـــ L-arginine بواسطة إنزيم NO Synthase، ويمكن لـــ NO أن يتحول إلى مختلف الأنواع النتروجينية النشطة الأخرى مثل كاتيون nitrosonium (NO^+)، أنيون nitroxyl (NO^-) أو peroxynitrite ($ONOO^-$) (Dröge، 2002).

V-3- تأثيرات الإجهاد التأكسدي:

تقوم الأنواع الأكسجينية النشطة بالعديد من الأدوار الفزيولوجية فهي تحمي الجسم من الأمراض بمساعدة الجهاز المناعي، تتدخل في نقل الإشارة الخلوية وتلعب دور أساسي في موت الخلايا (Seifried وآخرون، 2007). إلا أنه يعتقد أن العديد من الأمراض مرتبطة بارتفاع مستوى الجذور الحرة في الخلية، فمن الأمراض التي تسببها الأنواع الأكسجينية النشطة مرض تصلب الشرايين، ضيق التنفس المتلازم عند الكبار، مشاكل القلب وبعض أشكال السرطان (Vermerris وNicholson، 2006)، الالتهاب المزمن (Lule وXia،

2005)، الشيخوخة وتصلب الأنسجة المتعدد (De Bruyne وآخرون، 1999)، داء السكري ومرض الألزهيمر وغيره من الأمراض العصبية (Seifried وآخرون، 2007).

V-4- نشاطية المركبات الفنولية المضادة للأكسدة:

يملك جسم الإنسان آليات فطرية للدفاع ضد الجذور الحرة تتمثل في الإنزيمات مثل superoxide dismutase وglutathione dismutase، إضافة إلى الفيتامين C والفيتامين E وselenium وlycopene و-β carotene وlutein وباقي الكاروتنويدات، وإلى جانبها تلعب المستقلبات النباتية الثانوية مثل الفلافونويدات والتربنويدات دور مهم في الدفاع ضد الجذور الحرة (Surveswaran وآخرون، 2007).

فالمركبات الفنولية خاصة الفلافونويدات لها القدرة على العمل كمضادات للأكسدة، فهي تؤثر على ROS وفوق أكسدة الليبيدات اللذان يشاركان في عدة ظروف إمراضية (Lule وXia، 2005).

تعود نشاطية المركبات الفنولية المضادة للأكسدة إلى بنيتها الكيميائية، حيث تتعلق إزاحة الجذور الحرة من طرف المركبات الفنولية (مثل الفلافونويدات والأحماض الفنولية) بعدد ووضعية مجاميع الهيدروكسيل المعطية للهيدروجين في الحلقة العطرية للمركبات الفنولية، كما تتأثر بعوامل أخرى مثل إضافة المجاميع السكرية ومجاميع أخرى معطية للهيدروجين (-SH، -NH)، فمثلا الفلافونولات غير السكرية، مثل quercetin وmyricetin وkaempferol، تحتوي على عدة مجاميع هيدروكسيلية وتملك نشاطية مضادة للأكسدة أكبر من الفلافونولات السكرية مثل rutin وmyricitrin وastragalin، فإضافة المجاميع السكرية للفلافونويدات تخفض من نشاطها (Cai وآخرون، 2004). كما تملك أحماض الهيدروكسي سيناميك والهيدروكسي بنزويك نشاطية مضادة للأكسدة التي ترتبط بعدد ووضعية مجاميع الهيدروكسيل في هذه الجزيئات (Dziedzic وHudson، 1983). والبروأنتوسيانيدات التي يمكنها إزاحة الجذور الحرة التي تتأثر ببنية الوحدات المكونة لها ودرجة بلمرتها (Hatano وآخرون، 2002).

درس Murota وآخرون (2002) قدرة الفلافونويدات ونظائر الفلافونويدات على إزاحة الجذور الحرة، حيث يملك quercetin وkaempferol وluteolin نشاطية كبيرة في إزاحة الجذور الحرة، في حين أظهر نظير الفلافون genistein والفلافون apigenin نشاطية ضعيفة.

أثبت Abdel-wahab وآخرون (2003) الأثر الإيجابي للحمض الفنولي p-coumaric في حماية الحيوانات من doxorubicin وهو العامل المحفز لأمراض القلب، ويمكن أن ترجع هذه الحماية لحمض p-coumaric إلى قدرته على إزاحة الجذور الحرة.

في عام 1996، أكد Nanjo وآخرون العلاقة بين بنية catechin الموجود في الشاي ونشاطيته على إزاحة جذر DPPH.

وأظهر epigallocatechin gallate-(-) أفضل تثبيط على تشكل 8-oxodeoxyguanosine و3-nitrotyrosine أكثر من حمض الأسكوربيك وglutathione، وتعتبر هذه النواتج أولى الخطوات لمرض تصلب الشرايين (Fiala وآخرون، 1996).

V-5- طرق دراسة النشاطية المضادة للأكسدة:

تستعمل عدة طرق لقياس نشاطية المركبات البيولوجية المضادة للأكسدة، وهي كثيرة الاستعمال بسبب سهولتها وسرعتها وحساسيتها (Ali وآخرون، 2008). أكثرهم استعمالا هي طريقة ABTS وDPPH، إضافة لاختبارات أخرى مثل اختبار FRAP، اختبار ORAC وغيرها، وهي كالتالي:

V-5-1- اختبار ABTS أو Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC):

اقترح اختبار TEAC أول مرة من طرف Miller وآخرون (1993) وRice-Evans وMiller (1994) ليتم التعديل فيه من طرف Re وآخرون (1999). يعتمد هذا الاختبار على التثبيط الذي تقوم به مضادات الأكسدة لامتصاصية الجذر الموجب (ABTS) (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)،

الذي يتميز بطيف امتصاص في موجات طويلة يظهر في 660 و734 و820 نانومتر. يحضر محلول ABTS ويضاف إلى 1 مل منه تراكيز مختلفة من المستخلصات المراد دراستها، لتقاس امتصاصية المزيج بعد حوالي 10 دقائق، ويستعمل الفيتامين E كشاهد مرجعي. يستعمل هذا الاختبار على نطاق واسع في العديد من الدراسات الحديثة المتعلقة بالكشف عن خصائص النباتات المضادة للأكسدة (Ali وآخرون، 2008).

V-5-2- اختبار diphenylpicrylhydrazyl (DPPH):

قدمت هذه الطريقة من طرف Brand-Williams وآخرون (1995) وعدلت فيما بعد من طرف Sánchez-Moreno وآخرون (1998). يعتبر هذا الاختبار من أكثر الطرق شيوعا المستعملة لاختبار النشاطية المضادة للأكسدة للعينات النباتية. تعتمد هذه الطريقة على إزاحة الجذر 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) من طرف مضادات الأكسدة، مما يؤدي إلى انخفاض الامتصاصية في طول موجة 515 نانومتر. عند مزج محلول DPPH مع مادة قادرة على إعطاء ذرة هيدروجين، فإن الشكل المرجع لهذا الجذر يرافقه فقدان اللون (Ali وآخرون، 2008)، بحيث يكون التفاعل الابتدائي كما يلي:

$$Z^* + AH \rightarrow ZH + A^*$$

حيث: Z^* هو جذر DPPH، وAH هو الجزيئة المعطية لذرة الهيدروجين.

V-5-3- اختبار Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP):

اختبار FRAP هو تقنية تسمح بتحديد القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية للمركبات، التي تترجم بالقدرة على الإرجاع (Ali وآخرون، 2008). قدم هذا الاختبار أول مرة من طرف Benzie وStrain (1999)، واستعمل حديثا جدا من طرف Lim وMurtijaya (2007) وNetzel وآخرون (2007) وSoobrattee وآخرون (2008) لاختبار النشاطية المضادة للأكسدة لمختلف الأنواع النباتية.

حيث تقوم المواد المرجعة (أو المضادة للأكسدة) الموجودة في العينة المراد دراستها بإرجاع معقد Fe (III)/tripyridyltriazine (TPTZ)، المتواجد بشكل فائض، إلى الحديدوز ferrous ذو اللون الأزرق، مع

زيادة الامتصاصية في طول موجة 593 نانومتر، والنتيجة هي نسبة الحديديك ferric المرجع على قدرة مضادات الأكسدة في العينة (قيمة FRAP)، ويعبر عن النتائج النهائية بمكافيء Trolox (ميكرومول) لكل غرام من الوزن الجاف (Ali وآخرون، 2008).

$$Fe\ (III)(TPTZ) + ArOH \rightarrow Fe\ (II)(TPTZ) + ArOH^{+}$$

ArOH: المادة المرجعة.

V-5-4- اختبار Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC):

يعتمد اختبار ORAC بصفة كبيرة على العمل الذي صرح به Glazer (1990). وهو يستعمل beta-phycoerythrin (PE) كمادة بروتينية مؤكسدة و 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) كمولد لجذر البيروكسيل، أو Cu^{+2}–H_2O_2 كمولد لجذر الهيدروكسيل. استعمل هذه الاختبار في دراسات حديثة مرتبطة بالنباتات (Almeida وآخرون، 2008؛ Soobrattee وآخرون، 2008؛ Zhao وآخرون، 2008).

V-5-5- اختبار Total Radical Trapping Parameter (TRAP):

اختبار TRAP لـــ Wayner وآخرون (1985) هو أكثر الطرق استعمالا لقياس قدرة البلازما أو المصل المضادة للأكسدة خلال العشرية الماضية، واستعمله Schlesier وآخرون (2002) لتقدير الخصائص المضادة للأكسدة للشاي ومختلف عصائر الفواكه. يستعمل هذا الاختبار جذور البيروكسيل الناتجة عن (AAPH) والمواد الموجودة في البلازما أو السوائل البيولوجية الأخرى. بعد إضافة AAPH إلى البلازما، تتم مراقبة أكسدة المواد القابلة للأكسدة بقياس الأكسجين المستهلك خلال التفاعل، إلا أنه يتم تثبيط عملية الأكسدة من طرف مضادات الأكسدة خلال فترة الحضن. تتم مقارنة طول فترة التحفيز مع مرجع موحد هو Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)، بعدها يتم ربطها كميا مع قدرة البلازما المضادة للأكسدة (Ali وآخرون، 2008).

المواد والطرق

I- المواد:

I-1- العينات النباتية:

اختيرت العينات النباتية في هذه الدراسة على أساس استعمالها الشائع في الطب الشعبي، وجلبت من مناطق مختلفة من الشرق الجزائري، حيث تم جلب أوراق وجذور البلوط *Quercus ilex* من جبل بابور، أما أوراق الزان *Quercus faginea* وأوراق شجرة الفلين *Quercus suber* وأوراق *Quercus coccifera* فقد تم جلبها من الحظيرة الوطنية للقالة، أما نبات الشيح *Artemisia herba alba* فقد تم الحصول عليه لدى بائع محلي للأعشاب الطبية، واستعملت قشور ثمار الرمان *Punica granatum* من الثمار الموجودة محليا. عرفت العينات النباتية بمخبر علم النبات، بقسم البيولوجيا، جامعة سطيف.

I-2- الأنواع البكتيرية:

استعملت ثلاث أنواع بكتيرية مرجعية American Type Culture Collection (ATCC) وهي: *Escherichia coli* ATCC 25922 (غرام سالب) و*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (غرام سالب) و*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (غرام موجب)، و6 أنواع بكتيرية ممرضة تم عزلها سريريا من المرضى وتعريفها على مستوى مخبر علم البكتيريا والطفيليات بالمستشفى الجامعي لسطيف، ومنها موجبة الغرام هي *Bacillus sp*، وسالبة الغرام هي *Klebsiella pneumoniae* و*Salmonella typhi* و*Enterobacter agglomerans* و*Serratia marcescens* و*Citrobacter freundii*.

I-3- المركبات الفنولية:

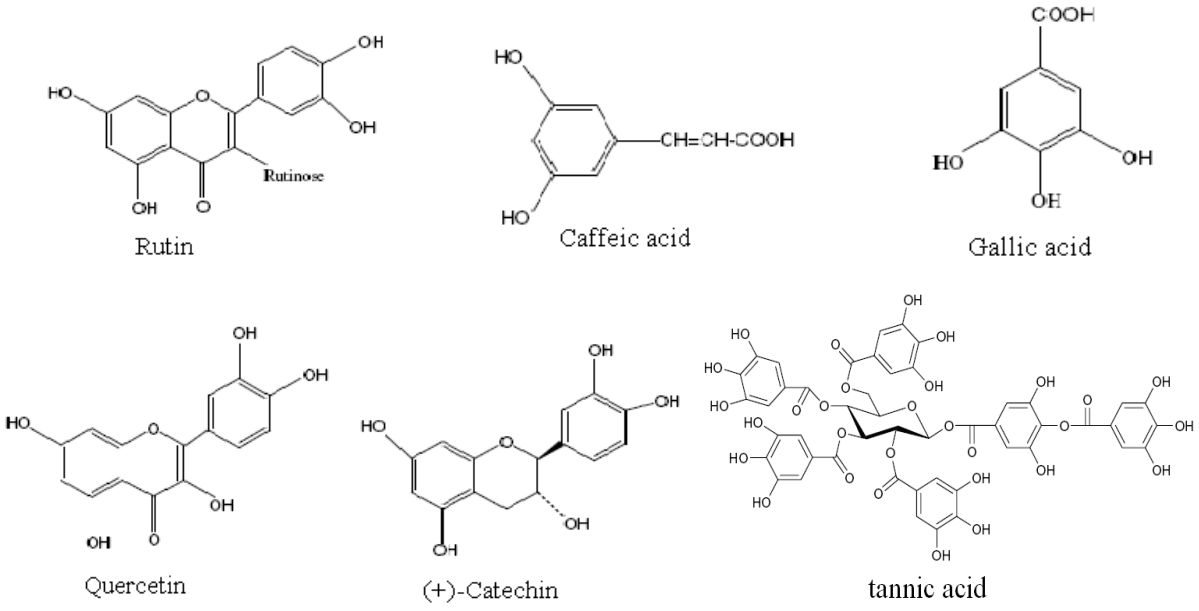
استعملت في هذه الدراسة ست مركبات فنولية نقية، تم جلبها من شركة Sigma هي: الكرستين quercetin (flavonol) والروتين rutin (flavonol) والكاتشين catechin(-)+ (flavanol) وحمض التانيك

tannic (دباغ مميهة) وحمض الغاليك gallic (مشتق حمض hydroxybenzoic) وحمض الكافييك caffeic (مشتق حمض hydroxycinnamic)، وبنيتها الكيميائية موضحة في الشكل 17.

I-4- المواد الكيميائية:

استعملت في هذه الدراسة أوساط زرع لتنمية الأنواع البكتيرية، يتمثل الوسط الصلب في وسط Mueller-Hinton (Fluka) والوسط السائل عبارة عن مرق مغذي (Sigma). كما استعملت أقراص المضاد الحيوي Gentamicin (6 ميليمتر) كشاهد موجب للمقارنة به والذي يحتوي كل قرص منه على 30 ميكروغرام.

استعملت في هذه الدراسة عدة مذيبات مثل الأستون والميثانول والإيثانول وإيثيل الأستات وغيرها ذات درجة تحليلية (analytical grade) من مصادر مختلفة. كما استعملت مركبات أخرى مثل β-carotene وحمض اللينولييك و40 Tween و2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Sigma) وكذلك dimethylsulfoxide (DMSO).



الشكل 17: البنية الكيميائية للمركبات الفنولية النقية المستعملة في هذه الدراسة

II- طرق العمل:

II-1- استخلاص المركبات الفنولية:

يتم استخلاص المركبات الفنولية حسب درجة ذوبانها في المذيبات العضوية، واستعمل الأستون (70%) في هذه الدراسة. كما استخلصت الدباغ من أوراق *Quercus suber* و*Quercus coccifera* باستعمال الأستون (70%) (Ito وآخرون، 2002؛ Khennouf، 2005).

تطحن 30 غ من العينات النباتية ويضاف لها 200 مل بتروليوم الإيثر لمدة ساعتين ثم يتم غسلها بنفس المذيب مرتين للتخلص من الكلوروفيل والدهون ثم يطرح هذا الطور، ويغسل المستخلص المتبقي بـــ 300 مل من الأستون (70%) لمدة 24 ساعة، وبعد الترشيح، يتم تبخير مستخلص الأستون إلى الطور المائي في جهاز التبخير في درجة حرارة 35°م. بعدها يستخلص الطور المائي بـــ 200 مل من إيثيل الأستات (3 مرات)، ثم يبخر كل من الطور المائي وطور إيثيل الأستات بجهاز التبخير. المحاليل الناتجة يتم تجفيدها وتخزينها في المجمد. يتم حساب مردود الاستخلاص لكل عينة. وتستعمل العينات المجفدة في الاختبارات المجراة في هذه الدراسة.

II-2- تقدير عديدات الفنول الكلية في المستخلصات النباتية:

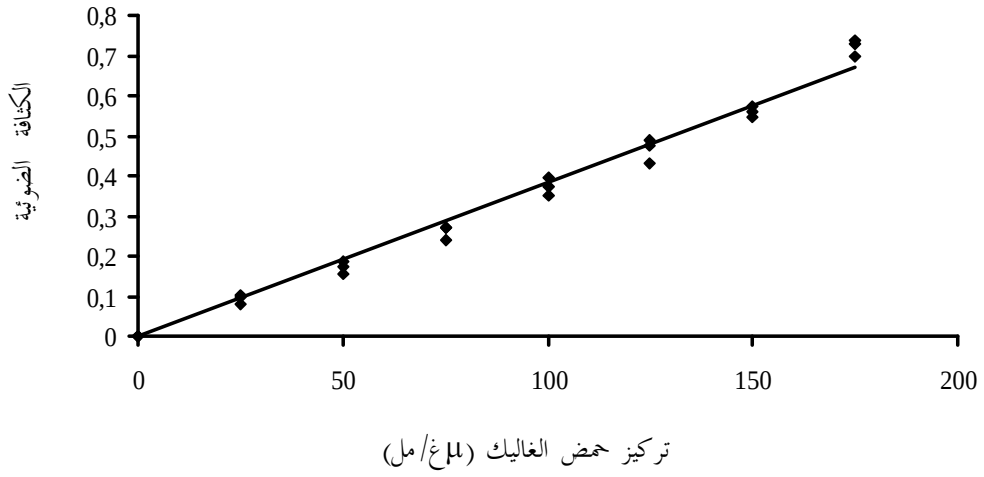
قدرت عديدات الفنول الكلية في مستخلصات النباتات باستعمال طريقتين، طريقة أزرق بروسي (Prussian blue) باستعمال حمض الغاليك كشاهد (Price وButher، 1977؛ Graham، 1992) وبطريقة Folin-Ciocalteu (FC) باستعمال الكاتشين كشاهد.

أ- اختبار أزرق بروسي:

استعملت طريقة أزرق بروسي لتقدير عديدات الفنول الكلية في مستخلصات الشيح *A. herba alba* وقشور ثمار الرمان *Punica granatum* وأنواع *Quercus*. وصفت هذه الطريقة في البداية من طرف Price

وButler (1977) وتم تعديلها من طرف Graham (1992) باستعمال $FeCl_3$ بدلا من $FeNH_4(So_4)_2$، وتعطي هذه التعديلات استقرارا لونيا عاليا.

يتم أخذ 0.1 مل من التخفيف المختار للمستخلص المجفد والمذاب في الميثانول أو الماء ويضاف له 3 مل ماء مقطر، ثم يرج المحلول الناتج. يضاف إلى هذا المحلول 1 مل $K_3F_2(CN)_6$ (مولاريته 0.016) و1 مل $FeCl_3$ (مولاريته 0.02) المذاب في حمض الكلور (HCl، 1 نظامي). ترج الأنابيب وتحضن في درجة حرارة المخبر لمدة 15 دقيقة، وبعد فترة التفاعل هذه، تضاف 5 مل من محلول التثبيت الذي يحتوي على الماء وحمض الفوسفوريك 85% وصمغ عربي 1% بالنسب التالية (1:1:3؛ ح/ح/ح)، ثم تقاس امتصاصية المحلول الناتج في طول موجة 700 نانومتر في جهاز التحليل الطيفي. يستعمل حمض الغاليك (25-175 µغ/مل) لتحديد منحنى العيارية الموضح في الشكل 18، ويتم التعبير عن النتائج بعدد الملغرامات الموافقة لحمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص المجفد.



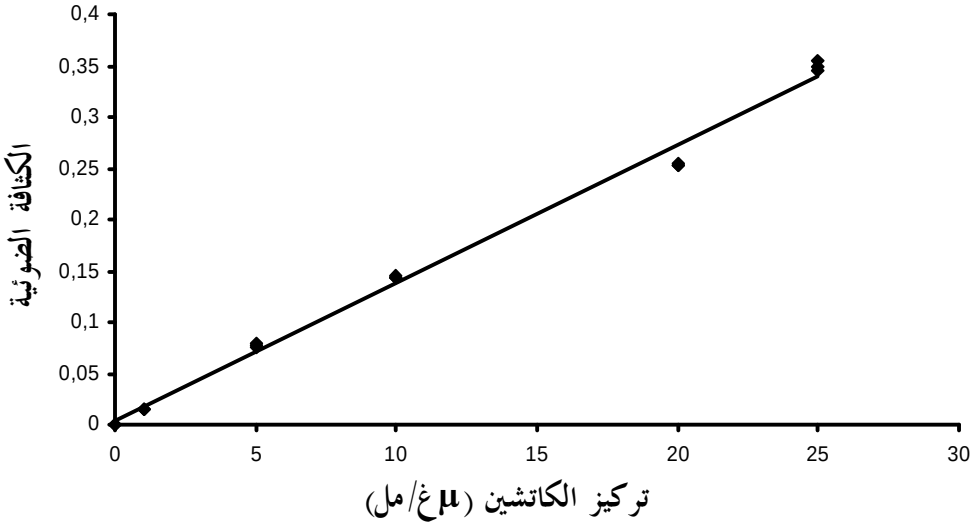
الشكل 18: منحنى العيارية لحمض الغاليك.

تمثل كل نقطة من المنحنى الوسيط الحسابي لـــ 3 قياسات ± الانحراف المعياري (SD)

ب- اختبار Folin-Ciocalteu:

تم تطوير هذه الطريقة في عام 1927 من طرف Folin وCiocalteu لتقدير المركبات الفنولية، ووصفها Waterman وMole بتفاصيلها في سنة 1994. تم هذا التقدير الآلي باستعمال جهاز تحليل متعدد المقاييس (Hitachi 704) في 37°م. نضع 5 µل من العينة في أنبـــوب الاختبار ثم نضيف لها 350 µل من كـــاشف Folin-Ciocalteu. بعد 8 دقائق، نضيف 350 µل من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) 20%، تقاس امتصاصية الخليط في طول موجة 700 نانومتر بعد مرور 14 دقيقة من إضافة كاشف Folin-Ciocalteu.

يعبر عن النتائج بعدد الملغرامات على أساس قيم موافقة للكاتشين لكل غرام من الوزن المجفد للمستخلص النباتي. تم إنشاء المنحنى العياري للكاتشين (1-25 µغ/مل) من أجل هذا الاختبار الموضح في الشكل 19، بحيث يحضر الكاتشين في الميثانول (100 µغ/مل) ثم تحضر تراكيز مختلفة من هذا المحلول.



الشكل 19: منحنى العيارية للكاتشين.

تمثل كل نقطة من المنحنى الوسيط الحسابي لـــ 3 قياسات ± الانحراف المعياري

II-3- دراسة نشاطية مستخلصات النباتات المضادة للبكتيريا:

II-3-1- اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص (Disc Diffusion Agar):

أ- تحضير العينات:

تذاب الأطوار المائية للمستخلصات النباتية في الماء المقطر بتركيز 30 مغ/مل، أما الأطوار العضوية والمركبات الفنولية النقية فيذاب 30 مغ منها في 1 مل من dimethylsulfoxide (DMSO)، ثم يتم تعقيمها بترشيحها عبر مرشحات ذات مسامات دقيقة قطرها 0.45 µم.

ب- اختبار نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضادة للبكتيريا:

لاختبار نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضادة للبكتيريا، استعملت في هذه الدراسة طريقة الانتشار على الوسط الصلب باستعمال الأقراص (Bauer وآخرون، 1966) التي عدلت من طرف Sharififar وآخرون (2007).

ينمى كل نوع بكتيري في مرق مغذي معقم لمدة 6 ساعات في درجة حرارة 37°م لكل الأنواع ماعدا بكتيريا *Bacillus* التي حضنت في 30°م. تخفف معلقات الأنواع البكتيرية المنماة فيما بعد في الماء المقطر أو الماء الفيزيولوجي إلى 10^{-1} و10^{-2}، ثم يتم زرع 5 مل من التخفيف 10^{-2} في أطباق بتري (9 سم)، التي تحتوي على حوالي 25 مل من وسط Mueller-Hinton الصلب المحضر والمعقم سابقا، والتي تم تجفيفها في ظروف معقمة. يترك محلول البكتيريا لمدة 2 إلى 3 دقائق ثم نفرغ الفائض، توضع الأقراص المعقمة (قطرها 6 مم) على السطح ونضع عليها 10 µل من العينة المراد دراسة نشاطيتها المضادة للبكتيريا، وهذا ما يعادل 300 µغ لكل قرص. تكرر العملية 3 مرات مع كل عينة، ويستعمل المذيب كشاهد سالب والمضاد الحيوي Gentamicin (30µغ/قرص) كشاهد موجب في نفس الشروط. وتحضن الأطباق في درجة حرارة 37°م ما عدا بكتيريا *Bacillus* في 30°م لمدة 24 ساعة، بعد مرور هذه الفترة يقاس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر.

II-3-2- تحديد التركيز الأدنى المثبط Mimimum Inhibitory Concentration (MIC):

تحدد قيم التركيز الأدنى المثبط للأنواع البكتيرية التي أظهرت حساسية لبعض المستخلصات النباتية أو المركبات الفنولية في الاختبار السابق (Disc diffusion agar). ويعبر عن هذه الحساسية بنسبة قطر منطقة التثبيط للمستخلص على قطر منطقة التثبيط للمضاد الحيوي (Gentamicin)، حيث تحدد قيم MIC للمستخلصات النباتية أو المركبات الفنولية التي لها نشاطية أكبر من 0.6 (Rabe وvan Staden، 1997).

لهذا الغرض أجري اختبار تخافيف الآبار الدقيقة (Micro-well dilution)، حيث ينمى النوع البكتيري في مرق مغذي لمدة 12 ساعة في 37°م ليحضر منها لقاح ذو كثافة 0.5 McFarland، وتحضر المستخلصات النباتية بإذابة الأطوار المائية في الماء المقطر والأطوار العضوية في DMSO والمركبات الفنولية في DMSO، ثم ترشح بمرشحات ذات مسامات دقيقة بقطر 0.45 µم، لتجرى منها تخافيف ثنائية متتالية يتراوح تركيزها بين 0.97 و500 µغ/مل في شريحة معقمة بها 96 بئرا دقيقا، يكرر كل تخفيف 3 مرات، بحيث نتحصل على 100µل من كل تخفيف في كل بئر، تضاف لها 95 µل من المرق المغذي المعقم و5 µل من اللقاح البكتيري المحضر سابقا، لنتحصل على حجم نهائي 200 µل في كل بئر. يوضع في البئر الأخير 195 µل من المرق المغذي مع 5 µل من اللقاح البكتيري ليستعمل كشاهد سالب، تغطى الشريحة بغطاء معقم خاص بها، ثم ترج في جهاز رج خاص بهذا النوع من الشرائح في 300 دورة/دقيقة لمدة 20 ثانية، وتحضن في 37°م لمدة 24 ساعة (Sharififar وآخرون، 2007). بعد مرور 24 ساعة، تزرع حوالي 3 µل من محتوى كل بئر على سطح وسط Mueller-Hinton الصلب بشكل خطوط بواسطة إبرة الزرع، تحضن الأطباق في 37°م لمدة 24 ساعة.

تحدد قيمة MIC على أنها أدنى تركيز ثبط نمو السلالة البكتيرية.

II-4- دراسة نشاطية مستخلصات النباتات المضادة للأكسدة:

لدراسة نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضادة للأكسدة أجري اختباران هما: اختبار قدرة العينات على إزاحة الجذور الحرة باستعمال 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)، وقدرتها على تثبيط نواتج أكسدة الليبيدات عن طريق اختبار β- carotene/حمض اللينولييك.

II-4-1- دراسة قدرة العينات على إزاحة جذر DPPH:

يتم قياس قدرة المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على إعطاء إلكترون أو ذرة هيدروجين بزوال اللون البنفسجي لمحلول DPPH الميثانولي. يستعمل هذا الاختبار الطيفي جذر مستقر هو 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) كمادة كاشفة (Kartal وآخرون، 2007).

تذاب المستخلصات المائية في الماء المقطر بينما تذاب المستخلصات العضوية والمركبات الفنولية في الميثانول النقي ماعدا مستخلصات *Quercus suber* و*Quercus coccifera* تذاب في الميثانول 70%. ثم تضاف 50 µl من مختلف تراكيز عينات المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية إلى 5 مل من محلول DPPH الميثانولي (0.004%)، ويستعمل butylated hydroxytoluene (BHT) (مادة مصنعة مضادة للأكسدة) كشاهد موجب، يكرر كل تركيز 3 مرات. تحضن الأنابيب في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام لمدة 30 دقيقة، بعد مرور هذه الفترة نقيس الكثافة الضوئية للمحاليل في طول موجة 517 نانومتر مقارنة مع الشاهد (الذي يحتوي كل مواد التفاعل ماعدا المادة المختبرة). تحسب نسبة تثبيط الجذر الحر DPPH (I%) كما يلي:

$$I\% = (A_{\text{الشاهد}} - A_{\text{العينة}})/A_{\text{الشاهد}} * 100$$

$A_{\text{الشاهد}}$: امتصاصية الشاهد. و$A_{\text{العينة}}$: امتصاصية العينة.

ثم يتم حساب التركيز الموافق لتثبيط 50% من الجذر الحر (IC_{50}) من منحنى نسب التثبيط (I%) مع تراكيز المستخلصات أو المركبات الفنولية أو BHT.

II-4-2- اختبار β-carotene/حمض اللينولييك:

تقدر النشاطية المضادة للأكسدة في هذا الاختبار بقياس تثبيط تشكل روابط الهيدروبيروكسيد الثنائية (diene conjugated hydroperoxide) والمواد العضوية الطيارة الناتجة عن أكسدة حمض اللينولييك (Aslan وآخرون، 2006).

تذاب 0.5 مغ من β-carotene في 1 مل كلوروفورم، ثم يضاف لها 25 µل حمض اللينولييك و200 مغ من Tween 40 مع الرج، ثم يتم تبخير الكلوروفورم كليا في جهاز التبخير في 40°م، وتضاف 100 مل ماء مقطر مشبع بالأكسجين (لمدة 30 دقيقة، سرعة التدفق 100 مل/دقيقة) مع الرج. ثم توضع 2.5 مل من الخليط المحضر سابقا في أنابيب الاختبار، ويضاف لها 350 µل من العينات المحضرة بتركيز 2 مغ/مل. نفس العملية تجرى مع BHT كشاهد موجب، ومع مذيبات المستخلصات النباتية كشواهد سالبة (الماء المقطر والميثانول)، يكرر الاختبار 3 مرات مع كل مستخلص. تحضن الأنابيب في درجة حرارة المخبر في الظلام. تقاس امتصاصية المحاليل في طول موجة 490 نانومتر بعد ساعة ثم بعد ساعتين و4 ساعات و6 ساعات و24 و48 ساعة. تقارن النشاطية المضادة للأكسدة للعينات مع BHT والشاهد السالب. ويتم حساب نشاطية المستخلصات والمركبات الفنولية المضادة للأكسدة النسبية (RAA%) حسب المعادلة التالية:

$$RAA\% = A_{العينة}/A_{BHT} * 100$$

$A_{العينة}$: امتصاصية العينة، وA_{BHT}: امتصاصية BHT.

النتائج

I- استخلاص وتقدير المركبات الفنولية في المستخلصات النباتية:

قدر تركيز عديدات الفنول الكلية في مستخلصات العينات النباتية بطريقتين: اختبار أزرق بروسي وطريقة Folin-Ciocalteu. تمت هذه التقديرات في كل من الأطوار المائية والأطوار العضوية للعينات النباتية المستخلصة بالأستون (70%). ووجد أن مردود الاستخلاص أعلى في الأطوار المائية عنه في الأطوار العضوية حيث يتراوح بين 4 و45%.

يتضح من النتائج المدونة في الجدول 1 أن قشور ثمار الرمان *Punica granatum* تعطي أعلى مردود (53%)، وأنها تحتوي على أكبر كمية من عديدات الفنول (500 و2080 مغ/غ وزن مجفد باستعمال طريقة أزرق بروسي وFolin-Ciocalteu على الترتيب). تحتوي قشور جذور البلوط *Quercus ilex* على كمية كبيرة من عديدات الفنول الكلية مقارنة مع أوراق البلوط *Q. ilex* و*Q. faginea* و*Q. suber*، بينما سجلت تراكيز ضعيفة من عديدات الفنول في أوراق الشيح *Artemisia herba alba* (91 و309.6 مغ/غ من الوزن المجفد للنبات باستعمال طريقة أزرق بروسي وFolin-Ciocalteu على الترتيب). تحتوي الأطوار العضوية على كمية من عديدات الفنول الكلية أكبر من الأطوار المائية تقريبا في كل مستخلصات النباتات المدروسة. إن استعمال طريقة Folin-Ciocalteu يعطي قيم عالية من عديدات الفنول الكلية في كل المستخلصات النباتية.

الجدول 1: مردود الاستخلاص وتركيز عديدات الفنول الكلية في المستخلصات النباتية (مغ/غ وزن مجفد)

العينات النباتية	طور المستخلص	مردود الاستخلاص %	عديدات الفنول الكلية	
			PB	FC
أوراق الشيح *Artemisia herba alba*	مائي	4,66	43	93,6
	عضوي	4	48	216
قشور ثمار الرمان *Punica granatum*	مائي	45	180	736
	عضوي	8	320	1344
أوراق البلوط *Quercus ilex*	مائي	14	163	556
	عضوي	6	184	848
قشور جذور البلوط *Quercus ilex*	مائي	24	241	668
	عضوي	9	288	1088
أوراق الفلين *Quercus faginea*	مائي	4	150	420
	عضوي	12,5	102	520
أوراق الزان *Quercus suber*	عضوي	4	107	592

PB: أزرق بروسي (مغ مكافئ لحمض الغاليك/غ وزن المستخلص المجفد)

FC: Folin-Ciocalteu (مغ مكافئ للكاتشين/غ وزن المستخلص المجفد)

II- تأثير مستخلصات النباتات المضاد للبكتيريا:

II-1- اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص:

تم اختبار نشاطية مستخلصات *Artemisia herba alba* و*Punica granatum* وأنواع *Quercus* وبعض المركبات الفنولية على 9 أنواع بكتيرية المذكورة سابقا بواسطة طريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص، وذلك بقيمة 300 µغ لكل قرص. يتضح من النتائج المدونة في الجدول 2 أن هذه المستخلصات تظهر نشاطية على بعض الأنواع البكتيرية، بمناطق تثبيط يتراوح قطرها بين 7 و21 مم، خاصة على بكتيريا *Staphylococcus aureus* التي أثرت عليها تقريبا كل المستخلصات والمركبات الفنولية المدروسة تأثيرا كبيرا، عكس بكتيريا *Bacillus* التي أظهرت مقاومة مطلقة مع كل المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المدروسة، أما باقي الأنواع البكتيرية فكانت حساسة لبعض المستخلصات النباتية ومقاومة لمستخلصات أخرى.

أظهر الطور العضوي لكل من أوراق وقشور جذور *Quercus ilex* أكبر نشاطية بتأثيرهما على 7 أنواع بكتيرية، حيث وصل قطر منطقة تثبيط الطور العضوي لأوراق *Quercus ilex* على بكتيريا *Staphylococcus aureus* إلى 21 مم وهي مقاربة جدا لقطر منطقة تثبيط المضاد الحيوي Gentamicin لهذه البكتيريا. أما الطور المائي لأوراق *Q. ilex* وأوراق *Q. suber* فهي تؤثر على 6 أنواع، ونجد أن الطور المائي لقشور جذور *Q. ilex* والطور العضوي لأوراق *Q. faginea* وأوراق *Q. coccifera* ذوو نشاطية متوسطة. وعلى العموم أبدت كل مستخلصات أنواع *Quercus* نشاطية مضادة للأنواع البكتيرية المدروسة خاصة بكتيريا *Salmonella typhi* و*Enterobacter agglomerans* و*Citrobacter freundii* و*Serratia marcescens* و *Pseudomonas aeruginosa*.

أما قشور ثمار *Punica granatum* فهي ذات نشاطية ضعيفة نوعا ما كونها لم تؤثر على عدد كبير من الأنواع البكتيرية المختبرة، إلا أنها تثبط بشكل كبير نمو بكتيريا *Staphylococcus aureus*، حيث كان قطر منطقة التثبيط معتبرا (16.5 و17 مم للطور المائي والعضوي على الترتيب).

في حين نجد أن أوراق الشيح *Artemisia herba alba* ذات نشاطية ضعيفة خاصة الطور المائي الذي لم يؤثر على أي نوع من الأنواع البكتيرية المختبرة، في حين ثبط الطور العضوي نمو نوعين بكتيريين هما: *Staphylococcus aureus* و*Citrobacter freundii* بقطر منطقة التثبيط المساوي لـــ 8.5 مم و7.5 مم على التوالي.

فيما يخص نشاطية المركبات الفنولية لوحظ أن كل هذه المركبات تملك نشاطية مضادة للبكتيريا، من حمض التانيك وحمض الكافييك اللذان يؤثران على 7 أنواع بكتيرية إلى الكرستين الذي يؤثر على 3 أنواع، وهذا بمناطق تثبيط ذات أقطار مختلفة، أين سجل أكبر قطر لحمض الكافييك (16.5 مم) على بكتيريا *Staphylococcus aureus*. وهي تؤثر خاصة على الأنواع البكتيرية التالية: *Salmonella typhi* و*Enterobacter agglomerans* و*Citrobacter freundii* و*Serratia marcescens* وبنسبة قليلة على بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*.

مع العلم أن DMSO الذي استعمل لإذابة المستخلصات العضوية والمركبات الفنولية لم يكن له أي تأثير تثبيطي على كل الأنواع البكتيرية المختبرة.

كما تم اختبار نشاطية المضاد الحيوي Gentamicin على كل الأنواع البكتيرية، وأقطار مناطق تثبيطه لنمو هذه الأنواع مدونة في الجدول 2.

الجدول 3 يوضح قيم النشاطية المضادة للبكتيريا التي تم حسابها بقسمة قطر منطقة التثبيط للمستخلصات النباتية أو المركبات الفنولية على قطر منطقة التثبيط للمضاد الحيوي Gentamicin.

الجدول 2: نتائج تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على الأنواع البكتيرية بطريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص.

قطر منطقة التثبيط (ميليمتر)										
Serratia marcescens	*Citrobacter freundii*	*Enterobacter agglomerans*	*Salmonella typhi*	*Klebsiella pneumoniae*	*Bacillus sp*	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	طور المستخلص	الأنواع البكتيرية / المستخلصات النباتية
6	6	6	6	6	6	6	6	6	طور مائي	أوراق الشيح *Artemisia herba alba*
6	7,5	6	6	6	6	6	6	8,5	طور عضوي	
6	6	6	7	6	6	7	6	6	طور مائي	أوراق *Quercus faginea*
9	8,5	8,5	6	6	6	10	6	7	طور عضوي	
7,5	8	8	8	6	6	8	6	14	طور مائي	أوراق *Quercus ilex*
9	9	9	9	7	6	10	6	21	طور عضوي	
7,5	6	8	8	6	6	8	6	13,5	طور مائي	قشور جذور *Quercus ilex*
8,5	9	11	10	6	6	8	7	9	طور عضوي	
9	10	9,5	8,5	6	6	10	6	10	طور عضوي	أوراق *Quercus suber*
8	10	9,5	8,5	6	6	6	6	20,5	طور عضوي	أوراق *Quercus coccifera*
6	6	6	8	6	6	6	6	16,5	طور مائي	قشور ثمار *Punica granatum*
6	6	6	8,5	6	6	9	7	17	طور عضوي	
8	8	8	6	6	6	6	6	6		Quercetin
10	9	8	8	6	6	8	7	6		Rutin
8,5	9	9	6	6	6	6	6	16		حمض الغاليك
8	8,5	7	9	9,5	6	7	6	15		حمض التانيك
10	8,5	9	8	6	6	9	7	16,5		حمض الكافييك
9	9	8,5	6	8	6	8,5	7	6		Catechin
24	22	23	17	18	23	17	24	22		Gentamicin

الجدول 3: النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على الأنواع البكتيرية.

Serratia marcescens	*Citrobacter freundii*	*Enterobacter agglomerans*	*Salmonella typhi*	*Klebsiella pneumoniae*	*Bacillus sp*	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	طور المستخلص	**الأنواع البكتيرية** / **المستخلصات النباتية**
0,25	0,27	0,26	0,35	0,33	0,26	0,35	0,25	0,27	طور مائي	أوراق الشيح
0,25	0,34	0,26	0,35	0,33	0,26	0,35	0,25	0,39	طور عضوي	*A.herba alba*
0,25	0,27	0,26	0,41	0,33	0,26	0,41	0,25	0,27	طور مائي	أوراق
0,38	0,39	0,37	0,35	0,33	0,26	0,59	0,25	0,32	طور عضوي	*Quercus faginea*
0,31	0,36	0,35	0,47	0,33	0,26	0,47	0,25	0,64	طور مائي	أوراق
0,38	0,41	0,39	0,53	0,33	0,26	0,59	0,25	0,95	طور عضوي	*Quercus ilex*
0,31	0,27	0,35	0,47	0,33	0,26	0,47	0,25	0,61	طور مائي	قشور جذور
0,35	0,41	0,48	0,59	0,33	0,26	0,47	0,29	0,41	طور عضوي	*Quercus ilex*
0,38	0,45	0,41	0,50	0,33	0,26	0,59	0,25	0,45	طور عضوي	أوراق *Quercus suber*
0,33	0,45	0,41	0,50	0,33	0,26	0,35	0,25	0,93	طور عضوي	أوراق *Quercus coccifera*
0,25	0,27	0,26	0,47	0,33	0,26	0,35	0,25	0,75	طور مائي	قشور ثمار
0,25	0,27	0,26	0,50	0,33	0,26	0,53	0,29	0,77	طور عضوي	*Punica granatum*
0,33	0,36	0,35	0,35	0,33	0,26	0,35	0,25	0,27		Quercetin
0,42	0,41	0,35	0,47	0,33	0,26	0,47	0,29	0,27		Rutin
0,35	0,41	0,39	0,35	0,33	0,26	0,35	0,25	0,73		حمض الغاليك
0,33	0,39	0 ,30	0,53	0,53	0,26	0,41	0,25	0,68		حمض التانيك
0,42	0,39	0,39	0,47	0,33	0,26	0,53	0,29	0,75		حمض الكافييك
0,38	0,41	0,37	0,35	0,44	0,26	0,50	0,29	0,27		Catechin

II-2- تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC):

انطلاقا من نتائج الاختبار السابق، أجرينا اختبار تخافيف الآبار الدقيقة لبكتيريا *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، من أجل تحديد التركيز الأدنى المثبط لبعض المستخلصات النباتية وهي الطور المائي والعضوي لأوراق البلوط *Quercus ilex* والطور المائي لقشور جذور البلوط *Q. ilex* والطور المائي لقشور ثمار *Punica granatum* ومستخلص *Q. coccifera*، وبعض المركبات الفنولية هي: حمض الغاليك وحمض الكافييك وحمض التانيك.

كانت النتائج كما يلي: نمت بكتيريا *Staphylococcus aureus* في كل التخافيف للأطوار المائية لأوراق وقشور جذور البلوط *Q. ilex* وقشور ثمار *P. granatum*، أي أن قيم التراكيز الدنيا المثبطة لهذه المستخلصات أكبر من 500 µغ/مل، في حين لوحظ عـــدم نمـــو هذه البكتيريا مع الطور العضوي لأوراق *Q. ilex* ومستخلص *Q. coccifera* وحمض الغاليك وحمض الكافييك وحمض التانيك وبالتالي قيم MIC الموافقة لها تكون أقل من 0.97 µغ/مل.

III- تأثير مستخلصات النباتات المضاد للأكسدة:

تم اختبار نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضادة للأكسدة باختبار قدرتها على إزاحة الجذور الحرة باستعمال جذر DPPH، وتثبيط أكسدة حمض اللينولييك باختبار β-carotene/حمض اللينولييك.

III-1- تأثير العينات الإزاحي لجذر DPPH:

تم قياس قدرة المستخلصات والمركبات الفنولية على إزاحة الجذور الحرة باستعمال جذر DPPH، ولوحظ تناقص امتصاصية هذا الأخير في طول الموجة 517 نانومتر كلما زاد تركيز العينات. والنتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول 4، حيث تم حساب IC_{50} لهذه المستخلصات والمركبات الفنولية وهي التركيز الموافق لتثبيط 50% من DPPH، وأدنى قيمة لـــ IC_{50} تعكس أحسن فعل وقائي للمركبات. وللمقارنة بين قيم IC_{50} للمستخلصات النباتية والمركبات الفنولية مع BHT تم إنشاء الشكل 20 و21.

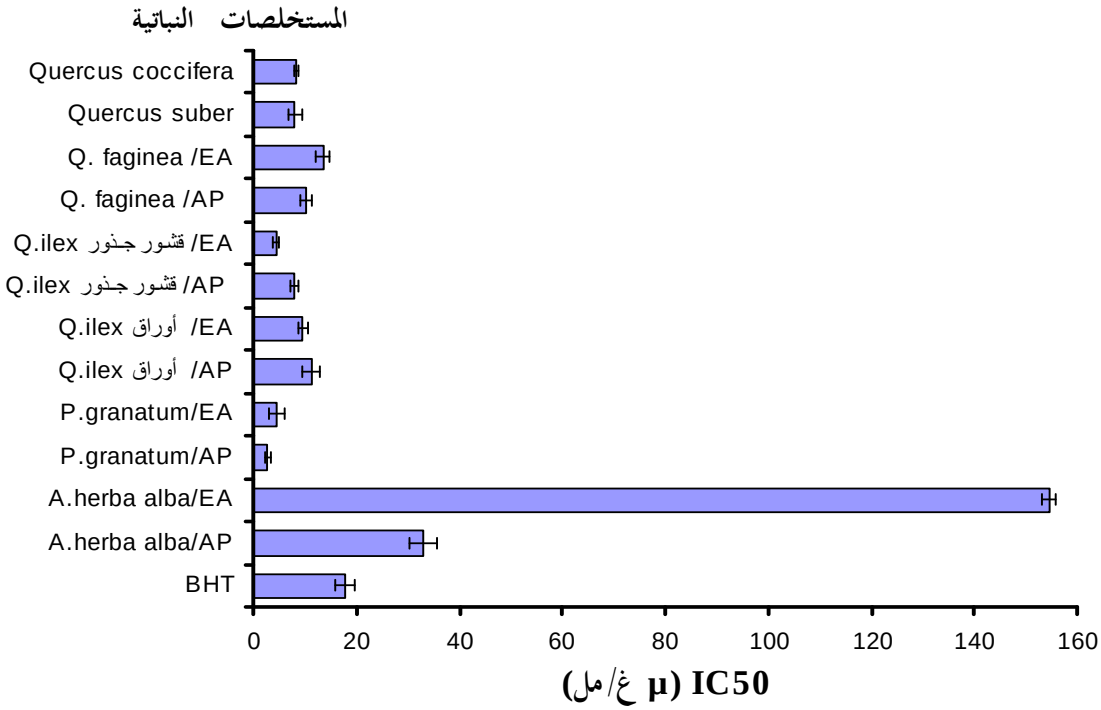
لوحظ أن كل المستخلصات النباتية المدروسة تملك قدرة كبيرة على إزاحة الجذور الحرة، حيث أظهر مستخلص قشور ثمـــار *Punica granatum* قدرته العالية جدا على إرجاع الجذر الحر المستقر DPPH إلى diphenylpicrylhydrazine ذو اللون الأصفر بأحسن قيمة لـــ IC_{50} (2.7 و4.4 µغ/مل للطور المائي والعضوي علي الترتيب) وهي قيم أحسن من قيمة IC_{50} لمادة BHT (17.8 µغ/مل)، وأظهرت كل أنواع *Quercus* نشاطية مضادة للأكسدة أكبر من BHT بحيث تتراوح قيمة IC_{50} لها بين 4.4 و13.5 µغ/مل، في حين نجد أن أوراق *A. herba alba* ذات نشاطية متوسطة (32.9 و154.6 µغ/مل للطور المائي والعضوي على الترتيب) مقارنة مع قيمة IC_{50} لمادة BHT.

كما أظهرت كل المركبات الفنولية نشاطية مضادة للأكسدة عالية جدا وأحسن من BHT وهو مادة مضادة للأكسدة مصنعة، حيث وصلت IC_{50} لحمض الغاليك إلى 2.1 µغ/مل وتراوحت قيم IC_{50} لباقي المركبات الفنولية بين 2.3 و8.6 µغ/مل.

الجدول 4: تركيز المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المثبطة لـــ 50% من جذر DPPH.

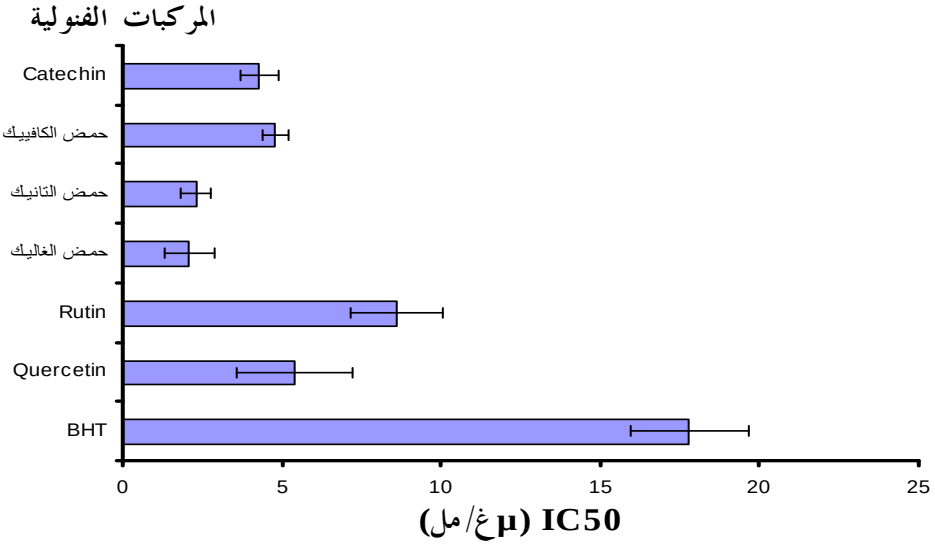
كل قيمة IC_{50} تمثل الوسيط الحسابي لـــ 3 تكرارات ± الانحراف المعياري (SD).

العينات النباتية	طور المستخلص	IC_{50} (µغ/مل)
أوراق الشيح *Artemisia herba alba*	مـــائي	2,61 ± 32,9
	عضـــوي	1,35 ± 154,6
قشور ثمار الرمان *Punica granatum*	مـــائي	0,6 ± 2,7
	عضـــوي	1,53 ± 4,4
أوراق البلوط *Quercus ilex*	مـــائي	1,61 ± 11,2
	عضـــوي	1,01 ± 9,6
قشور جذور البلوط *Quercus ilex*	مـــائي	0,71 ± 7,9
	عضـــوي	0,65 ± 4,4
أوراق شجرة الفلين *Quercus faginea*	مـــائي	1,04 ± 10,2
	عضـــوي	1,28 ± 13,5
أوراق الزان *Quercus suber*	عضـــوي	1,37 ± 8,1
أوراق *Quercus coccifera*	عضـــوي	0,43 ± 8,4
Quercetin		1,85 ± 5,4
Rutin		1,43 ± 8,6
حمض الغاليك		0,77 ± 2,1
حمض التانيك		0,46 ± 2,3
حمض الكافييك		0,42 ± 4,8
Catechin		0,6 ± 4,3
BHT		1,85 ± 17,8



الشكل 20: نتائج تأثير المستخلصات النباتية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة DPPH

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



الشكل 21: نتائج تأثير المركبات الفنولية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة DPPH

III-2- باستعمال اختبار β-carotene/حمض اللينولييك:

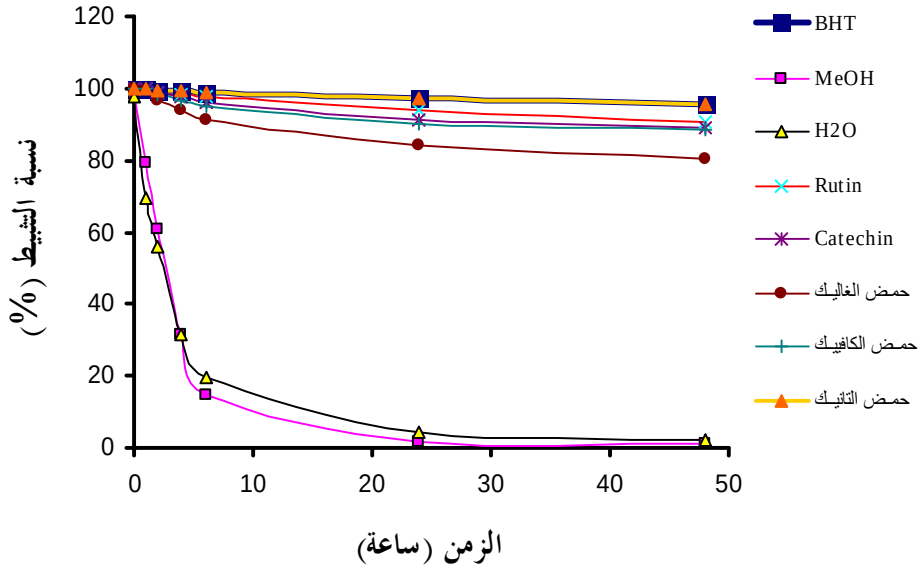
في طريقة β-carotene، تم تقدير درجة أكسدة حمض اللينولييك بقياس نواتج الأكسدة المتمثلة في تشكل روابط الهيدروبيروكسيد الثنائية (diene conjugated hydroperoxide) والمواد العضوية الطيارة التي في نفس الوقت تهاجم β-carotene، مما يؤدي إلى تغير لونها إلى اللون الأصفر.

لوحظ أن كل المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المدروسة تثبط أكسدة حمض اللنولييك بشكل كبير جدا، وهو الشيء المهم في تحضير الأغذية وحفظها. وهي تثبط هذه الأكسدة بنسب عالية جدا حيث وجد أن أدنى قيمة للنشاطية المضادة للأكسدة النسبية (RAA) هي للطور المائي لأوراق *A. herba alba* والمساوية لـــ 86.3%، وهي نسبة عالية من خلال مقارنتها مع مادة BHT التي اعتبرت أنها تثبط أكسدة حمض اللينولييك بنسبة 100%. وكانت قيم RAA لباقي المستخلصات النباتية عالية وتقارب 95%. كما كانت قدرة المركبات الفنولية على تثبيط أكسدة حمض اللينولييك كبيرة، حيث وصلت قيمة RAA الخاصة بحمض التانيك إلى 98.3%. كما لوحظ أن معظم الأطوار المائية للمستخلصات النباتية المدروسة تثبط أكسدة حمض اللينولييك بنسبة أكبر من الأطوار العضوية ولكن بفارق بسيط. قيم RAA الكاملة مدونة في الجدول 5، أما المنحنيات الخاصة بالمستخلصات والمركبات الفنولية مبينة في الأشكال من 22 إلى 28.

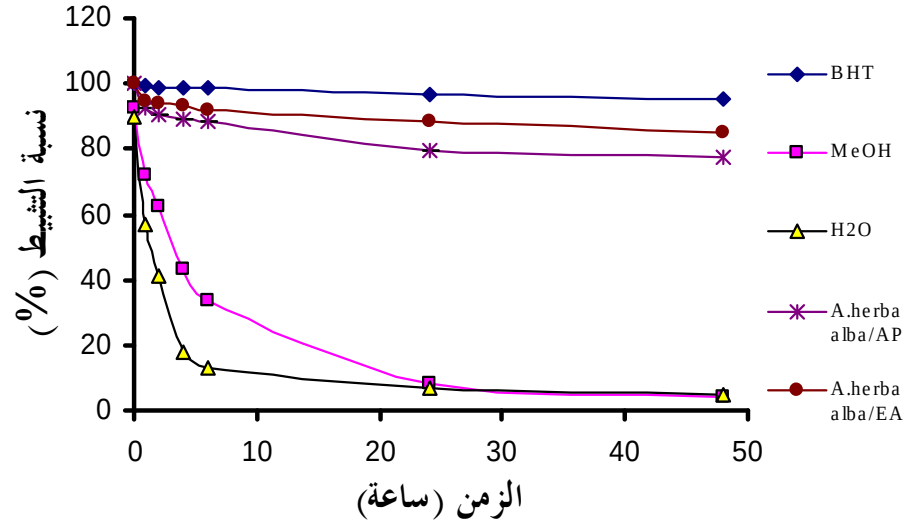
إلا أنه وجد أن الأطوار المائية لكل من *Quercus faginea* وأوراق وقشور جذور *Quercus ilex* تصبح طلائع للمؤكسدات (prooxidant) بعد 48 ساعة من التجربة لكن بشكل بسيط جدا.

الجدول 5: نتائج تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للأكسدة المتحصل عليها بطريقة β-carotene/حمض اللينولييك

العينات النباتية	طور المستخلص	RAA (%)
أوراق الشيح *Artemisia herba alba*	مـــائي	3,91 ± 86,3
	عضـــوي	3,42 ± 91,2
قشور ثمار الرمان *Punica granatum*	مـــائي	1,5 ± 94,2
	عضـــوي	1,35± 93,9
أوراق البلوط *Quercus ilex*	مـــائي	1,71 ± 95,3
	عضـــوي	2,27 ± 95,1
قشور جذور البلوط *Quercus ilex*	مـــائي	1,83 ± 95,7
	عضـــوي	1,9 ± 95,5
أوراق شجرة الفلين *Quercus faginea*	مـــائي	1,11 ± 95,1
	عضـــوي	2,61 ± 96,4
أوراق الزان *Quercus suber*	عضـــوي	2,37 ± 93,05
أوراق *Quercus coccifera*	عضـــوي	3,43 ± 92,01
Rutin		2,5 ± 97,7
حمض الغاليك		3,41 ± 90,9
حمض التانيك		1,53 ± 98,3
حمض الكافييك		2,59 ± 94,6
Catechin		2,25 ± 95,4
BHT		100

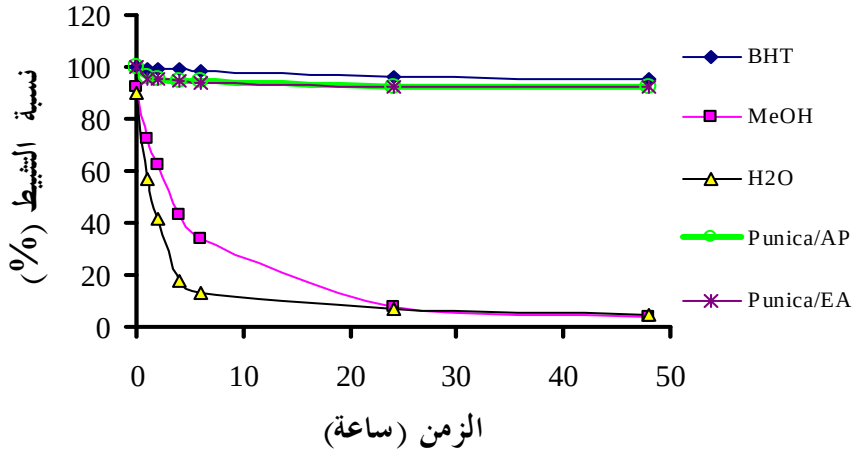


الشكل 22: نشاطية المركبات الفنولية المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك



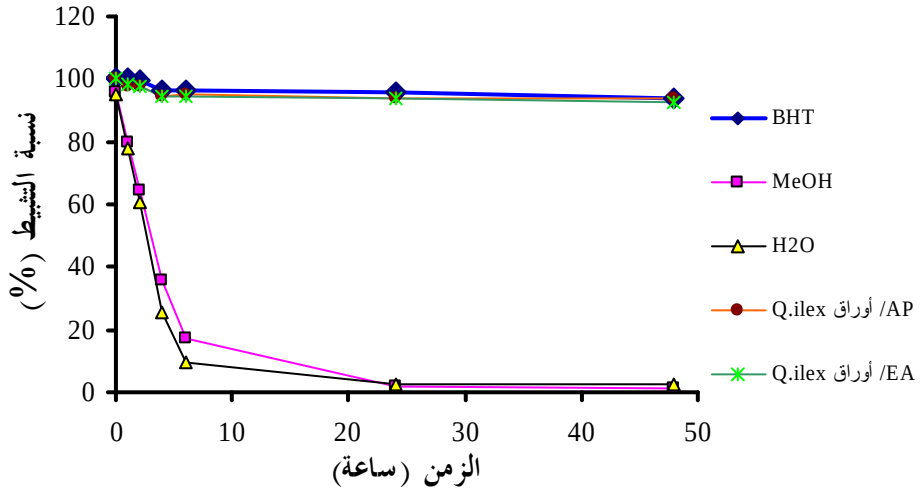
الشكل 23: نشاطية مستخلصات *A. herba alba* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



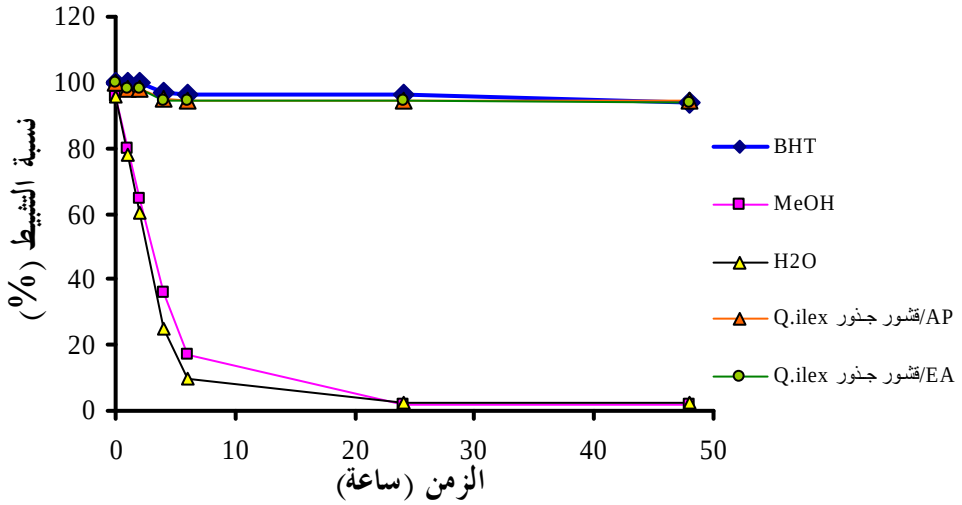
الشكل 24: نشاطية مستخلصات *P. granatum* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



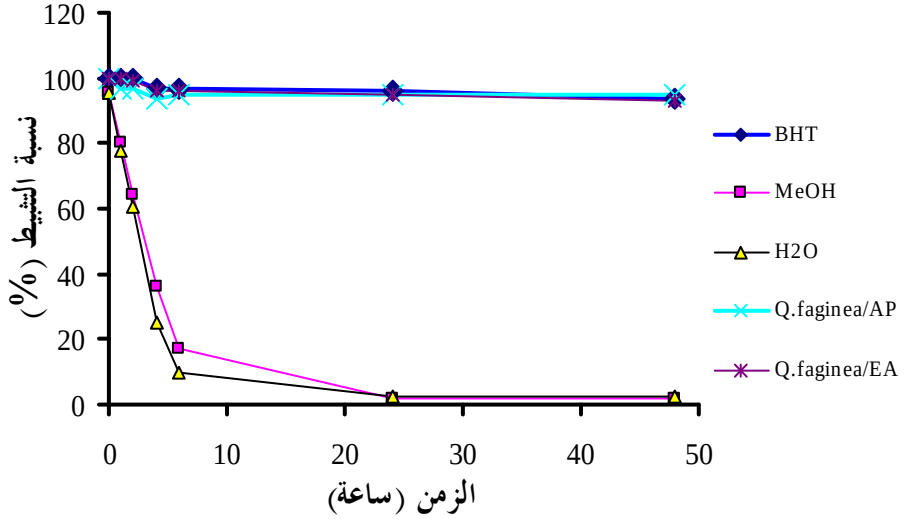
الشكل 25: نشاطية مستخلصات أوراق *Q. ilex* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



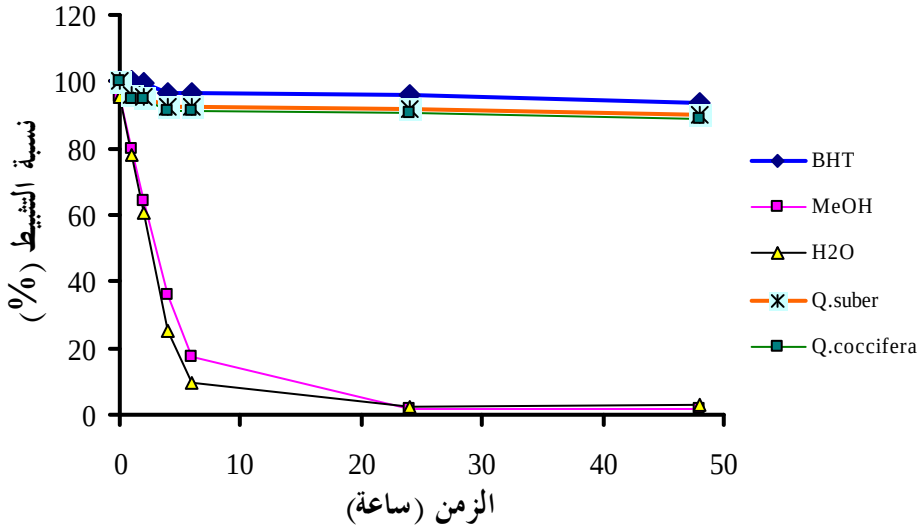
الشكل 26: نشاطية مستخلصات قشور جذور *Q. ilex* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



الشكل 27: نشاطية مستخلصات *Q. faginea* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

AP: الطور المائي، EA: الطور العضوي



الشكل 28: نشاطية مستخلصات *Q. suber* و*Q. coccifera* المضادة للأكسدة باختبار β-carotene/حمض اللينولييك

تمثل كل نقطة من هذه المنحنيات الوسيط الحسابي لـــ 3 قياسات ± الانحراف المعياري (SD)

المناقشة

I- استخلاص وتقدير المركبات الفنولية في المستخلصات النباتية:

تم اسخلاص المركبات الفنولية من النباتات المدروسة باستعمال الأستون (70%)، وهو مذيب كثير الاستعمال في استخلاص المركبات الفنولية (Bruneton، 1993). ومن خلال النتائج المحصل عليها من قياس تركيز عديدات الفنول الكلية في هذه المستخلصات النباتية، تبين أن بعض هذه النباتات تحتوي على كميات معتبرة من عديدات الفنول وقد يرجع التأثير الحيوي لهذه المستخلصات إلى احتوائها على هذه المركبات، وهي تشمل نبات *Punica granatum* وأنواع *Quercus*، في حين يحتوي نبات *Artemisia* على كميات أقل من عديدات الفنول، حيث تم تقدير عديدات الفنول الكلية بطريقتين، اختبار أزرق بروسي المعدل (Graham، 1992) واختبار Folin-Ciocalteu (Waterman وMole، 1994)، اللتان أعطتا قيم مختلفة مع نفس العينة، إلا أنه من الصعب المقارنة بينهما بسبب اعتمادهما على مرجعين مختلفين هما حمض الغاليك بالنسبة لاختبار أزرق بروسي وcatechin بالنسبة لاختبار Folin-Ciocalteu.

تعد الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي مع استعمال جهاز الكشف الطيفي (HPLC-DAD) من أحسن الطرق لفصل المركبات الفنولية الموجودة في المستخلصات النباتية والتعرف عليها. حيث استطاع Khennouf (2005)، باستعمال هذه الطريقة، من التعرف على مكونات أنواع *Quercus* من المركبات الفنولية التي تشمل حمض الغاليك والكاتشين وepicatechin والبروسيانيدين B1 والبروسيانيدين B2 والفلافونولات والفلافانونات. كما قام Ito وآخرون (2002) بعزل دباغ مميهة مستخلصة من *Q. suber* و*Q. coccifera* وتتمثل في مركبات castalagin وpedunculagin وacutissimin B وphillyraeoidin A إضافة إلى المركبات الفنولية المذكورة سابقا.

أما نبات *Artemisia herba alba* فيتكون من حمض البتروليك وحمض الكلوروجنيك والفلافونول والفلافون وapigenin-7-glucoside ومشتقات حمض الهيدروكسي سيناميك (Kim وآخرون، 2004).

كما أظهر تحليل *Punica granatum* بـــ HPLC-DAD، الذي قام به Surveswaran وآخرون (2007) من خلال دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للمركبات الفنولية الموجودة في 133 نوع من النباتات الطبية الهندية، احتواءه على مستويات عالية من الدباغ المميهة (punicalin وpunicalagin) وحمض gallagic وحمض الإيلاجيك وحمض الغاليك.

II- تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للبكتيريا:

من خلال النتائج المحصل عليها من اختبار نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية على الأنواع البكتيرية، تبين أن بعض هذه المستخلصات تملك نشاطية كبيرة على بعض الأنواع البكتيرية وهي تضم خاصة أنواع *Quercus*، أما مستخلصات قشور ثمار *Punica granatum* وأوراق *Artemisia herba alba* فلها نشاطية متوسطة إلى ضعيفة مع أن مستخلصات *P. granatum* لها تأثير كبير على بكتيريا *Staphylococcus aureus*، في حين لوحظ أن كل المركبات الفنولية تملك نشاطية مضادة للبكتيريا خاصة حمض الكافييك وحمض التانيك وحمض الغاليك، وهي عبارة عن أحماض فنولية لها علاقة بتكوين الدباغ المميهة التي تتميز بقدرة عالية على ترسيب البروتينات (De Bruyne وآخرون، 1999).

كما تبين أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* تظهر حساسية كبيرة مع معظم المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية، عكس بكتيريا *Bacillus* التي كانت مقاومة لكل المركبات المدروسة، في حين كانت باقي الأنواع متوسطة الحساسية إلى ضعيفة.

من خلال النتائج نستنتج أن كمية المستخلصات المستعملة في هذه الدراسة (300 µغ لكل قرص) هي كمية قليلة نوعا ما. إلا أنها أظهرت نشاطية لبعض المستخلصات النباتية ضد بعض الأنواع البكتيرية مما يدل على احتواء هذه المستخلصات على مركبات نشطة مثل المركبات الفنولية، أو يعود إلى حساسية الأنواع

البكتيرية المتأثرة بهذه المستخلصات. وهذا ما يمكن ملاحظته بمقارنة هذه النتائج مع نتائج أبحاث أخرى التي كانت موافقة مع البعض وغير موافقة مع البعض الآخر.

تم إثبات أن المستخلصات الميثانولية لأوراق *Quercus ilex* الموجود في تركيا (Güllüce وآخرون، 2004) وقشور *Q. robur* (Andrensek وآخرون، 2004) تملك نشاطية مضادة للبكتيريا والتي يمكن أن تعزى إلى غنى مستخلصات أنواع *Quercus* بالمركبات الفنولية (Ohemeng وآخرون، 1993) مثل الفلافونويدات والدباغ (Zhentian وآخرون، 1999؛ Meng وآخرون، 2001؛ Hideyuki وآخرون، 2002).

درس Berahou وآخرون (2007) تأثير لحاء *Quercus ilex* المضاد للبكتيريا، باستعمال 500 µغ لكل قرص، حيث أثر المستخلص المائي ومستخلص إيثيل الأستات على *Staphylococcus aureus* بقطر 12 و18 مم على الترتيب، وهي نتيجة مقاربة لما تحصلنا عليه فيما يخص الطور المائي لقشور جذور *Quercus ilex* الذي كان قطر منطقة تثبيطه لهذه البكتيريا يساوي 13.5 مم. كما وجد أنه يؤثر على بكتيريا *Escherichia coli* بقطر 12 و16 مم وعلى بكتيريا *Klebsiella pneumonie* بقطر 7 و10 مم لكل من المستخلصين المائي وإيثيل الأستات على الترتيب. وهي غير موافقة لما تحصلنا عليه مع البكتيريا الأولى ومقاربة نوعا ما للنتائج التي تحصلنا عليها مع النوع البكتيري الثاني. ويرجع هذا إلى الاختلاف في التركيز المستعمل في الدراستين. أما قيم MIC على *Staphylococcus aureus* فكانت 256 و128 µغ/مل بالنسبة للمستخلص المائي ومستخلص إيثيل الأستات على الترتيب، وهي أحسن من القيم التي تحصلنا عليها التي كانت مساوية لـ 500 µغ/مل.

درس Mathabe وآخرون (2006) النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلص الأستوني لجذور نبات *Punica granatum* بطريقة الآبار على الوسط الصلب باستعمال 1 مغ لكل بئر، ووجد أن هذا المستخلص يؤثر على بكتيريا *Staphylococcus aureus* وكان قطر منطقة التثبيط 29.3 مم، وهي نتيجة أقل مما تحصلنا عليه ويعود هذا الاختلاف إلى كمية المستخلص المستعملة. كما كان تثبيطه لبكتيريا *Escherichia coli*

وبكتيريا *Salmonella typhi* بقطر 11.7 و16 مم على التوالي وهي نتائج موافقة تقريبا لنتائج دراستنا. أما قيمة MIC لهذا النبات على بكتيريا *Staphylococcus aureus* فوصلت إلى 78 µغ/مل وهي أحسن من القيمة التي تحصلنا عليها (أكبر من 500 µغ/مل).

كما وجد Ahmad وBeg (2001) أن المستخلص الكحولي لثمار *Punica granatum* يظهر نشاطية ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus*، وأظهر المستخلص الميثانولي لقشور ثمار *Punica granatum* نشاطية مضادة لكل الكائنات الدقيقة المختبرة المتمثلة في: *Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli* و*Klebsiella pneumonie* و*Proteus vulgaris* و*Bacillus subtilis* و*Salmonella typhi* (Prashanth وآخرون، 2001). نفس النشاطية أظهرها المستخلص الميثانولي والمائي لأوراق *Punica granatum* ضد الأنواع البكتيرية المدروسة التي تشمل كل من *Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli* و *Proteus vulgaris* و*Bacillus subtilis* و*Enterobacter aerogenes* (Ghosh وآخرون، 2008). وتشير عدة دراسات إلى أنه تم عزل دباغ غاليكية وإيلاجيكية جديدة من قشور ثمار *Punica granatum* وهي المركبات الأساسية المسؤولة على النشاطية المضادة للبكتيريا لهذا النبات (Hussein وآخرون، 1997؛ Machado وآخرون، 2003؛ Vidal وآخرون، 2003).

وجد Navarro وآخرون (1996) أن قيمة MIC للمستخلص الميثانولي لقشور ثمار *Punica granatum* على سلالة *Staphylococcus aureus* كانت مساوية لـــ 620 µغ/مل وهي قيمة موافقة لما تحصلنا عليه مع الطور المائي لقشور ثمار *Punica granatum* أي أكبر من 500 µغ/مل.

هناك أبحاث قليلة تهتم بدراسة النشاطية المضادة للبكتيريا لمستخلصات *Artemisia*، حيث وجد Rabe وvan Staden (1997) أن المستخلص المائي لنبات *Artemisia afra* لا يملك أي نشاطية على الأنواع البكتيرية المختبرة وهي *Staphylococcus aureus* و*Staphylococcus epidermidis* و*Escherichia coli* و *Bacillus*

subtilis و*Klebsiella pneumonie*، في حين أظهر المستخلص الميثانولي لهذا النبات تأثير ضعيف على بكتيريا *Staphylococcus aureus*. نفس النتيجة تحصل عليها Alanís وآخرون (2005) بدراسة النشاطية المضادة للبكتيريا لنوعين من جنس *Artemisia* هما: *Artemisia absinthium* و*Artemisia ludoviciana*. حيث أظهر المستخلص الميثانولي لهذين النوعين نشاطية ضعيفة على بعض السلالات البكتيرية المدروسة المتمثلة في سلالتين من *Escherichia coli* وأربع سلالات من *Shigella* وسلالتين من *Salmonella*، في حين أظهر المستخلص المائي تأثير ضعيف على هذه السلالات. في حين أثبت Juteau وآخرون (2002) أن الزيت الأساسي الموجود في الجزء الهوائي لنبات *Artemisia annua* يثبط نمو الخمائر مثل: *Candida albicans* و*Saccharomyces cerevisiae* وبكتيريا *Enterococcus hirae*. هذا ما يؤدي بنا إلى الاعتقاد أن نشاطية أنواع *Artemisia* تعود إلى الزيوت الأساسية الموجودة بها، فهي تعتبر من النباتات الغنية بالزيوت الأساسية (Heinrich وآخرون، 1998؛ Kim، 2003).

درست نشاطية المركبات الفنولية المضادة للبكتيريا في الكثير من الأبحاث، حيث وجد Puupponen-Pimiä وآخرون (2001) أن الفلافونويدات مثل catechin وrutin وquercetin لا تؤثر على نمو *Escherichia coli*. أما Rauha وآخرون (2000) فلاحظوا أن quercetin يؤثر على كل الأنـــواع البكتيرية المختبرة (*Staphylococcus aureus* و*Staphylococcus epidermidis* و*Bacillus subtilis* و *Micrococcus luteus* و*Escherichia coli* و*Pseudomonas aeruginosa*)، في حين لم يظهر كل من rutin وحمض الغاليك وحمض الكافييك أي تأثير. ومن خلال نتائج دراستنا تبين أن حمض الغاليك وحمض الكافييك يملكان نشاطية كبيرة على بكتيريا *Staphylococcus aureus*، كما يؤثران على أنواع أخرى بنسب مختلفة مثل: *Enterobacter agglomerans* و*Citrobacter freundii* و*Serratia marcescens*. إضافة إلى التأثير الذي أظهره حمض الكافييك على بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* وبكتيريا *Salmonella typhi*.

III- تأثير المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضاد للأكسدة:

تم اختبار نشاطية المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المضادة للأكسدة بطريقتين، اختبار DPPH واختبار β-carotene/حمض اللينولييك. يفسر انخفاض امتصاصية DPPH بتغير لونه من اللون البنفسجي إلى اللون الأصفر وذلك بسبب قدرة العينات على إزاحة هذا الجذر من خلال إعطائه ذرة هيدروجين. أظهرت كل هذه المواد نشاطية مضادة للأكسدة عالية وقدرة كبيرة على إزاحة الجذور الحرة. ويبدو أن نشاط المستخلصات النباتية متعلق نسبيا بـــما تحتويه من المركبات الفنولية مثل الفلافونويدات والأحماض الفنولية والدباغ، حيث أظهرت النشاطية المضادة للأكسدة لمحتواها من المركبات الفنولية الكلية بعض الاختلافات، وذلك من خلال مقارنة الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية وما تحتويه من المركبات الفنولية، فعلى سبيل المثال يحتوي نبات *Punica granatum* على أكبر كمية من المركبات الفنولية وأعطى أعلى قدرة على إزاحة الجذور الحرة، في حين أبدت أنواع *Quercus* قدرة أكبر منه في تثبيط أكسدة حمض اللينولييك. كما أظهر نبات *Artemisia herba alba* نشاطية مضادة للأكسدة أقل من الأنواع الأخرى لأنه يحتوي على تراكيز أقل من المركبات الفنولية. ورغم أنه أثبتت بعض الدراسات وجود علاقة بين النشاطية المضادة للأكسدة ومحتوى المستخلصات النباتية من المركبات الفنولية، إلا أن هناك عوامل أخرى مهمة يجب أن تؤخذ بعين الاعتبار مثل طبيعة وبنية هذه المركبات (Heim وآخرون، 2002). كما أظهرت المركبات الفنولية المدروسة قدرتها على إزاحة الجذور الحرة ونشاطية مضادة للأكسدة كبيرة، حيث تم تأكيد دور المركبات الفنولية في إزاحة الجذور الحرة في العديد من الدراسات (Dueñas وآخرون، 2006؛ Katalinic وآخرون، 2006؛ Thériault وآخرون، 2006).

هناك عدة أبحاث تدرس العلاقة الموجودة بين المحتوي الفنولي لمختلف المواد النباتية ونشاطيتها المضادة للأكسدة، ففي الوقت الذي وجد فيه بعض الباحثين أنه توجد علاقة بين المحتوى الفنولي والنشاطية المضادة

للأكسدة، البعض الآخر لم يجد هذه العلاقة. حيث صرح Adom وLiu (2002) بوجود علاقة بين المحتوى الفنولي والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الذرة والقمح والشوفان والأرز. كما وجد Velioglu وآخرون (1998) العلاقة الكبيرة الموجودة بين المحتوى الفنولي والنشاطية المضادة للأكسدة لمنتجات الحبوب. في حين لم يجد Zielinski وKozlowska (2000) أي علاقة بين المحتوى الفنولي والنشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات المائية لنبات الحنطة السوداء *Fagopyrum esculentum* ونبات الشيلم *Secale cereale*.

وقد ثبت أن المركبات الفنولية المستخلصة من نبات *Punica granatum* تملك خصائص مضادة للأكسدة في عدة دراسات (Noda وآخرون، 2002؛ Negi وآخرون، 2003؛ Kulkarni وآخرون، 2004؛ Sudheesh وVijayalakshmi، 2005؛ Li وآخرون، 2006).

كما درست النشاطية المضادة للأكسدة لأنواع *Quercus*، حيث أثبت McCune وJohns (2002) قدرة لحاء نوعين من هذا النبات هما *Quercus alba* و*Quercus rubra* على إزاحة الجذور الحرة باستعمال جذر DPPH، حيث كانت قيمة IC_{50} للنوع الأول مساوية لـ 8.17 µغ/مل والنوع الثاني تساوي 11.55 µغ/مل، وهي موافقة لما تحصلنا عليه حيث تراوحت قيم IC_{50} لأنواع *Quercus* التي درسناها بين 4.4 و13.5 µغ/مل، وقد يعود ذلك إلى غنى أنواع *Quercus* بالمركبات الفنولية (Ohemeng وآخرون، 1993) مثل الفلافونويدات والدباغ (Zhentian وآخرون، 1999؛ Meng وآخرون، 2001؛ Hideyuki وآخرون، 2002).

لاحظ Juteau وآخرون (2002) أن الزيت الأساسي الموجود في الجزء الهوائي لنبات *Artemisia annua* يملك نشاطية مضادة للأكسدة ضعيفة. عكس El-Massry وآخرون (2002) الذين أثبتوا أن الزيت الطيار الموجود في نبات *Artemisia judaica* يملك نشاطية مضادة للأكسدة عالية وقدرة كبيرة على إزاحة

الجذور الحرة. في حين أظهرت مستخلصات نبات *Artemisia herba alba* في هذه الدراسة قدرة كبيرة على تثبيط أكسدة حمض اللينولييك وتأثير متوسط في إزاحة الجذور الحرة.

كما وجد McCune وJohns (2002) أن قيمة IC_{50} لمركب quercetin باستعمال جذر DPPH كانت مساوية لـــ 6.09 µغ/مل وهي مقـــاربة للنتيجة التي تحصلنا عليها (5.4 µغ/مل)، وقيمة IC_{50} لحمض التانيك تساوي 5.81 µغ/مل وهي أقل من القيمة التي تحصلنا عليها (2.3 µغ/مل).

الخاتمة:

بهدف دراسة التأثير المضاد للبكتيريا والمضاد للأكسدة لمستخلصات نبات الشيح *Artemisia herba alba* وقشور ثمـــار الرمان *Punica granatum* وبعض أنواع البلوط: *Quercus ilex* و*Quercus faginea* و*Quercus coccifera* و*Quercus suber* وبعض المركبات الفنولية، تم استعمال طريقة الانتشار في الوسط الصلب باستعمال الأقراص واختبار تخافيف الآبار الدقيقة من أجل تحديد التركيز الأدنى المثبط. واستخدمت طريقتي DPPH وβ-carotene/حمض اللينولييك لدراسة التأثير الإزاحي للجذور الحرة والقدرة على تثبيط أكسدة حمض اللينولييك على التوالي.

أثبتت نتائج هذه الدراسة أن بعض هذه المستخلصات النباتية تملك نشاطية كبيرة على بعض الأنواع البكتيرية وهي تضم خاصة أنواع *Quercus*، أما مستخلصات قشور ثمار الرمان *Punica granatum* وأوراق الشيح *Artemisia herba alba* فلها نشاطية أقل، رغم أن مستخلصات *P. granatum* لها تأثير كبير على النوع البكتيري *Staphylococcus aureus*، في حين تملك كل المركبات الفنولية نشاطية مضادة للبكتيريا. بينما أظهرت كل المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية المختبرة في هذه الدراسة نشاطية مضادة للأكسدة عالية وقدرة كبيرة على إزاحة الجذور الحرة.

ومما سبق يمكن تفسير استخدام هذه النباتات في الطب التقليدي لعلاج الإصابات الناتجة عن العدوى بالأنواع البكتيرية. وإمكانية الاستفادة منها لتطوير مواد صيدلانية مضادة للبكتيريا. أما النتائج المحصل عليها من التأثير الإزاحي للجذور الحرة للمستخلصات النباتية فتطرح إمكانية استعمالها كمضادات أكسدة طبيعية يمكن الاستفادة منها في تطوير مواد حافظة للأغذية وواقية من نشوء وتطور بعض الأمراض مثل الأمراض الوعائية القلبية وبعض الأمراض المزمنة الأخرى مثل داء السكري وارتفاع الضغط الدموي الشرياني.

قائمة المراجع

المراجع باللغة العربية:

هيكل م س، عمر ع ع. النباتات الطبية والعطرية: كيمياؤها، إنتاجها، فوائدها. الطبعة الثانية. الناشر منشأة المعارف بالإسكندرية (مصر) 1993.

المراجع باللغات الأجنبية:

Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F and Hamada FMA. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res* 2003; **48**: 461-465.

Adom KK and Liu RH. Antioxidant activity of grains. *J Agr Food Chem* 2002; **50**: 6182-6187.

Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD and Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 2005; **113**: 423-433.

Ahmad I and Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol* 2001; **74**: 113-123.

Alanís AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J and Ceballos GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 2005; **100**: 153-157.

Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A and Bora U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int* 2008; **41**: 1-15.

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC and Bahia FM. Walnut (Juglans regia) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem* 2008; **106**: 1014-1020.

Andrensek S, Simonovska B, Vovk I, Fyhrquist P, Vuorela H and Vuorela P. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom. *Int J Food Microbiol* 2004; **92**: 181-187.

Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F and Özkan H. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm Biol* 2006; **44** (4): 247-252.

Balls AK, WS Hale and TH Harris. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem* 1942; **19**: 279-288.

Bauer AW, Kirby MDK, Sherris JC and Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493-496.

Benchaabane A and Abbad A. Les plantes médicinales commercialisées à Marrakech. Traces du Présent, Marrakech 1997; 74.

Ben Salem H, Ben Salem I and Ben Saïd MS. Effect of the level and frequency of PEG supply on intake, digestion, biochemical and clinical parameters by goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.)-based diets. *Small Ruminant Res* 2005; **56**: 127-137.

Benzie IFF and Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol* 1999; **299**: 15-27.

Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M and Gadhi CA. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *J Ethnopharmacol* 2007; **112**: 426-429.

Borgardt SJ and Pigg KB. Anatomical and developmental study of petrified *Quercus* (fagaceae) fruits from the middle miocene, Yakima Canyon, Washington, USA. *Am J Bot* 1999; **86** (3): 307-325.

Boriky D, Berrada M, Talbi M, Keravls G and Rouessa F. Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* 1996; **43** (1): 309-311.

Bors W, Michel C and Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 1997; **6** (4): 399-402.

Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; **28**: 25-30.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; **56** (11): 317-333.

Bruneton J. Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In: "Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales". Technique et Documentation-Lavoisier (Paris) 1993; Chap. **3**: 199-383.

Cai Y, Luo Q, Sun M and Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; **74**: 2157-2184.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 564-582.

Croft K. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann NY Acad Sci* 1998; **20**: 435-442.

Cushnie TPT and Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* 2005; **26**: 343-356.

Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Saha BP and Pal M. Studies on antidiarrhoeal activity of Punica granatum seed extract in rats. *J Ethnopharmacol* 1999; **68**: 205-208.

Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994; **264** (5157): 375-382.

De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H and Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem Syst Ecol* 1999; **27**: 445-459.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**: 47-95.

Dueñas M, Hernández T and Estrella I. Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chem* 2006; **98**: 95-103.

Dutta BK, Rahman I and Das TK. Antifungal activity of Indian plant extracts. *Mycoses* 1998; **41**: 535-536.

Dziedzic SZ and Hudson BJF. Polyhydroxychalcones and flavanones as antioxidant for edible oils. *Food Chem* 1983; **12**: 205-209.

Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR and Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States: Prevalence, costs, and patterns of use. *N Engl J Med.* 1993; **328**: 246-252.

El-Massry KF, El-Ghorab AH and Farouk A. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chem* 2002; **79**: 331-336.

Fernandez MA, Garcia MD and Saenz MT. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J Ethnopharmacol* 1996; **53**: 11-14.

Feuerstein I, Müller D, Hobert K, Danin A and Segal R. The constituents of essential oils from *Artemisia herba-alba* population of Israel and Sinai. *Phytochemistry* 1986; **25**: 2343-2347.

Fiala ES, Sodum RS, Bhattacharya M and Li H. (−)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine. *Experientia* 1996; **52** (9): 922-926.

Forkmann G. Biosynthesis and biodegradation of polyphenols. In: "Polyphenolic phenomena". Ed. Scalbert A. INRA (Paris) 1993; Chap. **2**, PP: 65-71.

Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshiba T, Hatano T, Ito H and Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol* 2004; **48** (4): 251-261.

Gautam R, Saklani A and Jachak SM. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J Ethnopharmacol* 2007; **110**: 200-234.

Gharzouli K, Khennouf S, Amira S and Gharzouli A. Effects of aqueous extracts from Quercus ilex L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba alba* Asso leaves on ethanol–induced gastric damage in rats. *Phytpther Res* 1999; **13**: 42-45.

Ghosh A, Das BK, Roy A, Mandal B and Chandra G. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med* 2008; **62**: 259-262.

Ghoshal S, Prasad BNK and Lakshmi V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol* 1996; **50**: 167-170.

Gilani AH and Janbaz KH. Protective effect of *Artemisia scopria* extract against acetaminophen induced hepatocytotoxicity. *Gen Phamacol* 1993; **24**: 1455-1458.

Glazer AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 161-168.

Graham HD. Modified Prussian Blue assay for total phenols. *J Agr Food Chem* 1992; **40**: 801-805.

Groussard C. Stress oxydatif et exercice anaérobie (Oxidative stress and anaerobic exercise). *Sci Sport* 2006; **21**: 62-67.

Güllüce M, Adigüzel A, Ögütçü H, Sengül M, Karaman I and Sahin F. Antimicrobial effects of *Quercus ilex* L. extract. *Phytother Res* 2004; **18**: 208-211.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 1-93.

Harborne JB. The Flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, UK, 1994.

Haslam E. Polyphenol complexation. In: "Polyphenolic phenomena". Ed. Scalbert A. INRA, Paris 1993; Chap. **2**, PP: 23-31.

Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H and Yoshida T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* 2002; **59**: 749-758.

Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N and Guessous Idrissi N. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Therapeutique* 2000.

Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; **13** (10): 572-584.

Heinrich M, Robles M, West JE, Ortiz de Montellano BR and Rodriguez E. Ethnopharmacology of mexican asteraceae (compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**:539-65.

Hidalgo PJ, Marín JM, Quijada J and Moreira JM. A spatial distribution model of cork oak (*Quercus suber*) in southwestern Spain: A suitable tool for reforestation. *Forest Ecol Manag* 2008; **255**: 25-34.

Hideyuki I, Koji Y, Tae-Hoon K, Khennouf S, Gharzouli K and Yoshida T. Dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*. *J Nat Prod* 2002; **65**: 339-345.

Hoffmann BZ and Herrmann K. Phenolic species: Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) and absinthe (*Artemisia absinthium* L.). *Z Lebensm Unters F* 1982; **174**: 211-215.

Hogg S. Control of Microorganisms in: "Essential Microbiology". John Wiley & Sons Ltd (England) 2005; chap. **5**, PP: 353-368.

Huanga THW, Penga G, Kotaa BP, Lia GQ, Yamaharab J, Roufogalisa BD and Li Y. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharm* 2005; **207**: 160-169.

Hufford CD, Jia Y, Croom EM, Muhammed JI, Okunade AL, Clark AM and Rogers RD. Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*. *J Nat Prod* 1993; **56**: 1878-1889.

Hugo WB and Russell AD. Antimicrobial agent in: "Pharmaceutical microbiology". Blackwell Science Ltd (London) 6th Ed 1998. Chap **2**, PP: 91-92.

Hussein SAM, Barakat HH, Merfort I and Nawwar MA. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry* 1997; **45**: 819-823.

Ito H, Yamaguchi K, Kim TH, Khennouf S, Gharzouli K and Yoshida T. New dimeric and trimeric hydrolysable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*. *J Nat Prod* 2002; **65**: 339-345.

Jafri MA, Aslam M, Javed K and Singh S. Effect of *Punica granatum* Linn. (Flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2000; **70**: 309-314.

Jørgensen LV. Flavonoids and other naturally occuring antioxidants: physico-chemical aspects of their antioxidant mode of action. Ph.D.Thesis 1998; The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

Juteau F, Masotti V, Bessière JM, Dherbomez M and Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* 2002; **73**: 532-535.

Kanchanapoom T. Aromatic diglycosides from Cladogynos orientalis. *Phytochemistry* 2007; **68**: 692-696.

Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M and Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem* 2007; **100**: 584-589.

Katalinic V, Milos M, Kulisic T and Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 2006; **94**: 550-557.

Kaur G, Jabbar Z, Athar M and Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 2006; **44**: 984-993.

Khennouf S. Gastroprotective properties of polyphenolic compounds from *Quercus* species in rats and mice. Doctoral thesis. Ferhat Abbas, Setif, Algeria 2005.

Kim SC. The study of feed development with wormwood (*Artemisia montana Pampan*) silage. Doctoral thesis. Gyeongsang National University, Jinju, Korea 2003.

Kim TH, Ito H, Hatano T, Taniguchi S, Khennouf S and Yoshida T. Chemical constituents of *Artemisia herba alba* Asso. *J Nat Med* 2004; **58** (4): 165.

Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I and Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem Pharm Bull* 1985; **33**: 2028-2034.

Kulkarni AP, Aradhya SM and Divakar S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem* 2004; **87**: 551-557.

Lee H, Wang HW, Su HY and Hao NJ. The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4;5-f]quinoline. *Mutagenesis* 1994; **9 (2):** 101-106.

Lee SJ, Chung HY, Lee IK and Yoo ID. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 1999; **31**: 815-822.

Lewis N, Yamamoto E. Tannins and Their place in plant metabolism. In: Chemistry and significance of condensed tannins. Eds. Hemingway R, Karchesy J. Plenum Press, New York 1989; PP: 23-46.

Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J and Roufogalis BD. Roufogalis. *Punica granatum* flower extract, a potent α-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J Ethnopharmacol* 2005; **99**: 239-244.

Lim YY and Murtijaya J. Antioxidant properties of Phyllanthus amarus extracts as affected by different drying methods. *Food Sci Technol* 2007; **40**: 1664-1669.

Lule SU and Xia W. Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Rev Int* 2005; **21**: 367-388.

Lumaret R, Tryphon-Dionnet M, Michaud H, Sanuy A, Ipotesi E, Born C and Mir C. Phylogeographical Variation of Chloroplast DNA in Cork Oak (*Quercus suber*). *Ann Bot-London* 2005; **96**: 853-861.

Machado TB, Pinto AV, Pinto MCFR, Leal ICR, Silva MG, Amaral ACF, Kuster RM and Netto-dosSantos KR. In vitro activity of Brazilian medicinal plants naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Ag* 2003; **21**: 279-284.

Marco JA and Barberá O. Natural products from the genus *Artemisia* L. In: Studies in natural products chemistry, Atta-ur-Rahman (Ed), Vol **7**. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1990; PP: 201-264.

Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. In: "Methods in Plant Biochemistry", Vol **1**, Plant Phenolics. Eds. Dey PM, Harborne JB. Academic Press, London, UK 1989; PP: 197-235.

Marrif HI, Ali BH and Hassan KM. Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba* (Asso) in rabbits and mice. *J Ethnopharmacol* 1995; **49**: 51-55.

Maskan M. Production of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics. *J Food Eng* 2006; **72**: 218-224.

Mathabe MC, Nikolova RV, Lall N and Nyazema NZ. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *J Ethnopharmacol* 2006; **105**: 286-293.

Max J. Secondary metabolism. Oxford Chemistry Series, Clardon Press, Oxford 1978.

McCune LM and Johns T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol* 2002; **82**: 197-205.

Mehansho H, Butler G and Carlson D. Dietary tannins and salivary prolin-rich proteins: interaction induction and defence mechanisms. *Annu Rev Nutr* 1987; **7**: 423.

Meng Z, ZhouY, Lu J, Sugahara K, Xu S and Kodama H. Effect of five flavonoïd compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. *Clin Chim Acta* 2001; **306**: 97-102.

Middleton EJR, Kandaswami C and Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 673-751.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V and Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; **84**: 407-412.

Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB and Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; **27:** 152-159.

Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M and Terao J. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr* 2002; **132**: 1956-1961.

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M and Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on l,l-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Bio Med* 1996; **21** (6): 895-902.

Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR and Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001; **33**: 2-16.

Navarro V, Villarreal M, Rojas G and Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol* 1996; **53**: 143-147.

Negi PS, Jayaprakasha GK and Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003; **80**: 393-397.

Netzel M, Netzel G, Tian Q, Schwartz S and Konczak I. Native Australian fruits - A novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2007; **8**: 339-346.

Niemetz R and Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 2005; **66**: 2001-2011.

Noda Y, Kaneyuki T, Mori A and Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. *J Agr Food Chem* 2002; **50**: 166-171.

Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP and Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg Med Chem Lett* 1993; **3**: 225-230.

Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 2005; **66**: 2012-2031. Review

Pio CA, Silva PA, Cerqueira MA and Nunes TV. Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmos Environ* 2005; **39**: 1817-1827.

Prashanth D, Asha MK and Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 2001; **72**: 171-173.

Price MP and Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agr Food Chem* 1977; **25:** 1268-1273.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A and Oksman-Caldentey KM. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol* 2001; **90**: 494-507.

Rabe T and van Staden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol* 1997; **56**: 81-87.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H and Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 2000; **56**: 3-12.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**; 1231-1237.

Rey Benayas JM, Navarro J, Espigares T, Nicolau JM and Zavala MA. Effects of artificial shading and weed mowing in reforestation of Mediterranean abandoned cropland with contrasting *Quercus* species. *Forest Ecol Manag* 2005; **212**: 302-314.

Ricci D, Giamperi L, Bucchini A and Fraternale D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia* 2006; **77**: 310-312.

Rice-Evans C and Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methodes Enzymol* 1994; **234**: 279-293.

Rodríguez Vaquero MJ, Alberto MR and Manca de Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007; **18**: 93-101.

Salah SM and Jäger AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 145-149.

Salido S, Valenzuela LR, Altarejos J, Nogueras M, Sánchez A and Cano E. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem Syst Ecol* 2004; **32**: 265-277.

Salunkhe DK, Chavan JK and Kaddam SS. Dietary tannins. Consequences and remidies. CRC Press Bocca Raton, 1990.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA and Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agr* 1998; **76**: 270-276.

Scalbert A, Monties B and Janin G. Tannin in wood, comparison of different estimation methods. *J Agric Food Chem* 1989; **37**: 1324-1329.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V and Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Res* 2002; **36**: 177-187.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI and Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; **18**: 567-579.

Segal R., Feuerstein I and Danin A. Chemotypes of *Artemisia herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. *Biochem Syst Ecol* 1987; **15**: 411-416.

Service RF. Antibiotics that resist resistance. *Science* 1995; **270** (5237): 724-727.

Sestili P, Martinelli C, Ricci D, Fraternale D, Bucchini A, Giamperi L, Curcio R, Piccoli G and Stocchi V. Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems. *Pharmacol Res* 2007; **56**: 18-26.

Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M and Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 2007; **18:** 800-805.

Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS, Googoolye K and Aruoma OI. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebanaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicol In Vitro* 2008; **22**: 45-56.

Sudheesh S and Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Punica granatum*, potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia* 2005; **76**: 181-186.

Sun HD, Qiu SX, Lin LZ, Wang ZY, Lin ZW, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Fong HH, Cordell GA and Farnsworth NR. Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *J Nat Prod* 1996; **59**: 525-527.

Surveswaran S, Cai YZ, Corke H and Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 2007; **102**: 938-953.

Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH and Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *J Ethnopharmacol* 2007; **110**: 105-117.

Taylor RSL, Edel F, Manandhar NP and Towers GHN. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1996; **50**: 97-102.

Thériault M, Caillet S, Kermasha S and Lacroix M. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chem* 2006; **98**: 490-501.

Tutin TG, Persson K and Gutermann W. *Artemisia* L. In: "Flora Europaea". Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Eds), vol. **4**. Cambridge University Press, Cambridge 1976; PP: 178-186.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L and Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits and vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem* 1998; **46**: 4113-4117.

Vermerris WI and Nicholson R. Chemical properties of phenolic compounds in: "Phenolic compound biochemistry". Springer 2006; Chap. **2**, PP: 35-61**.**

Vidal A, Fallarero A, Peña BR, Medica ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y and Vuorela PM. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol* 2003; **89**: 295-300.

Villar del Fresno AM. Pharmacognosy of the future. *Fitoterapia* 1998; **69** (55): 7-8.

Waterman PG and Mole S. In: "Analysis of phenolic plant metabolites". Eds. Lawton JH, Likens GE. The methods in ecology series. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK; 1994.

Wilkinson JM. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts in: "Modern phytomedicine turning medicinal plants into drugs". Eds. Ahmad I, Aqil F, Owais M. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (Weinheim) 2006; chap: **8**, PP: 157-169.

Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R and Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Food Hum Nutr* 2004; **59**: 113-122.

Zielinski H and Kozlowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J Agr Food Chem* 2000; **48**: 2008-2016.

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M and Benjelloun. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* 1997; **58**: 45-54.

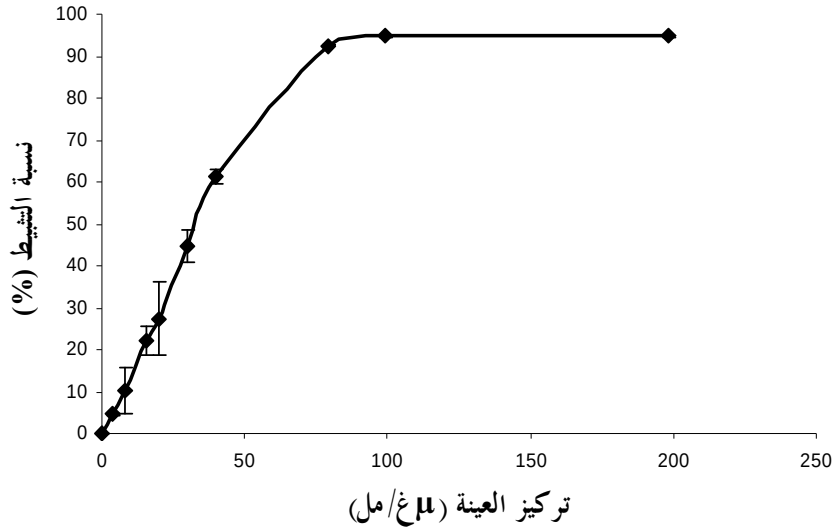
Zhao H, Fan W, Dong J, Lu J, Chen J, Shan L, Lin Y and Kong W. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem* 2008; **107**: 296-304.

Zhentian L, Jervis J and Helm RF.*C*-Glycosidic ellagitannins from white oak-heartwood and callus tissues. *Phytochemistry* 1999; **51**: 751-756.

الملحق

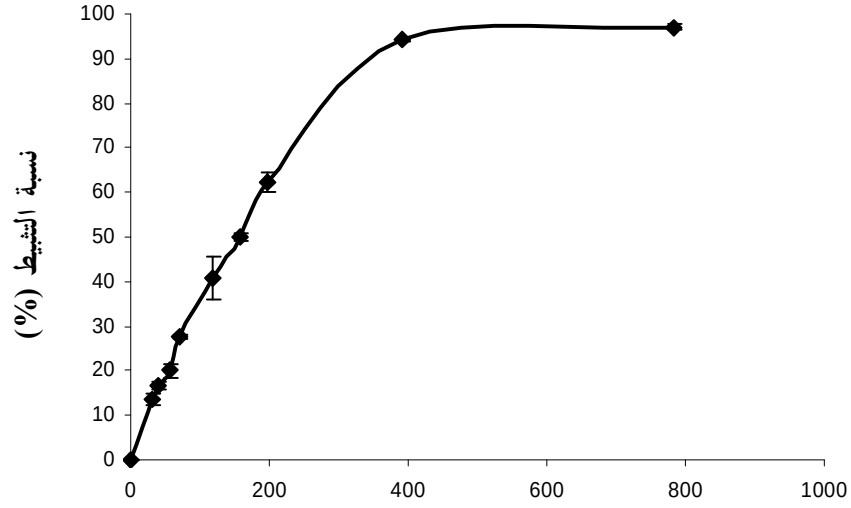
- نتائج اختبار DPPH:

1- المنحنى الخاص بالطور المائي لـــ *Artemisia herba alba*:



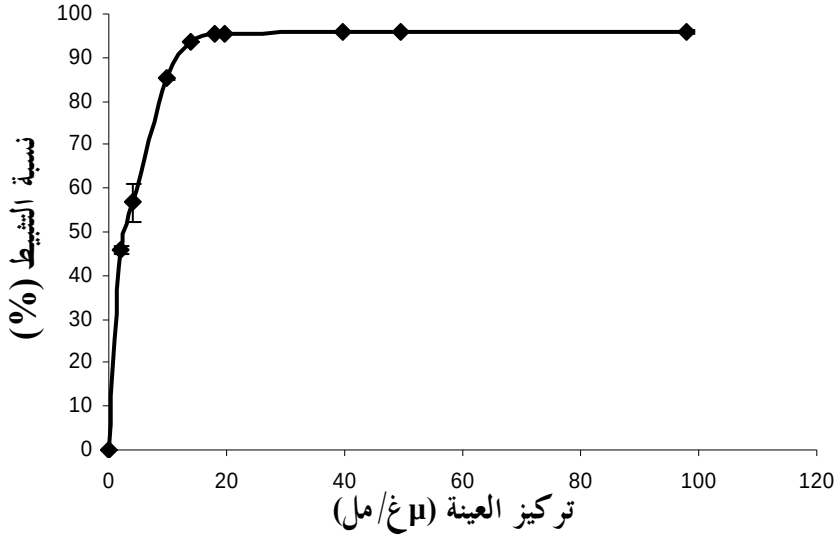
IC_{50} = 32,9 ± 2,61 µغ/مل

2- المنحنى الخاص بالطور العضوي لـــ *Artemisia herba alba*:



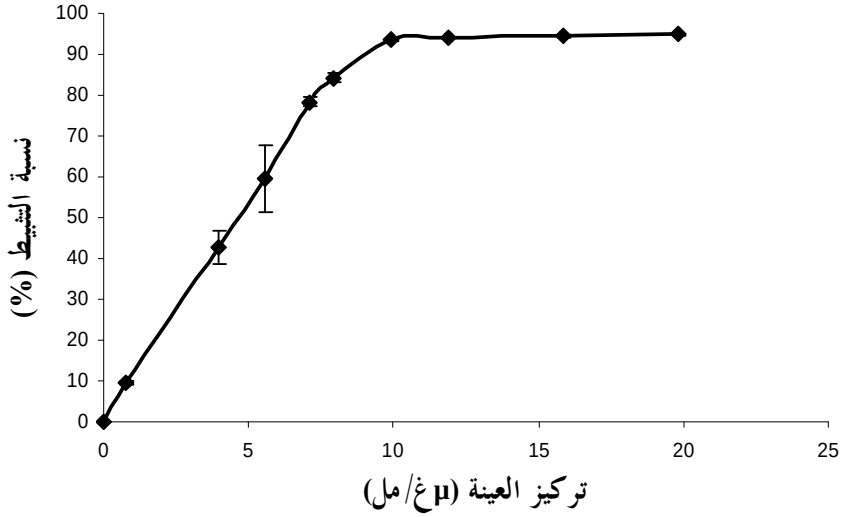
IC_{50}= 154,6 ± 1,35 µغ/مل

3- المنحنى الخاص بالطور المائي لـــ *Punica granatum*:



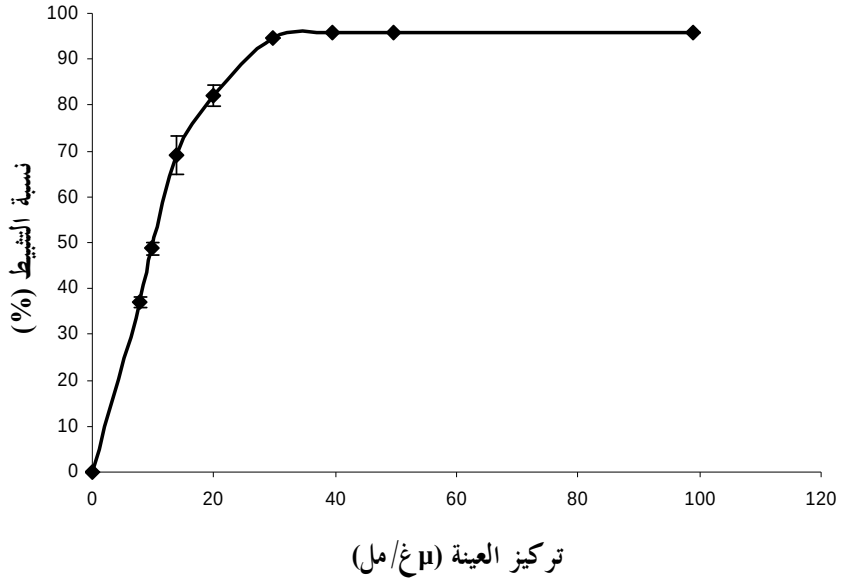
IC_{50} = 2,7 ± 0,6 µغ/مل

4- المنحنى الخاص بالطور العضوي لـــ *Punica granatum*:



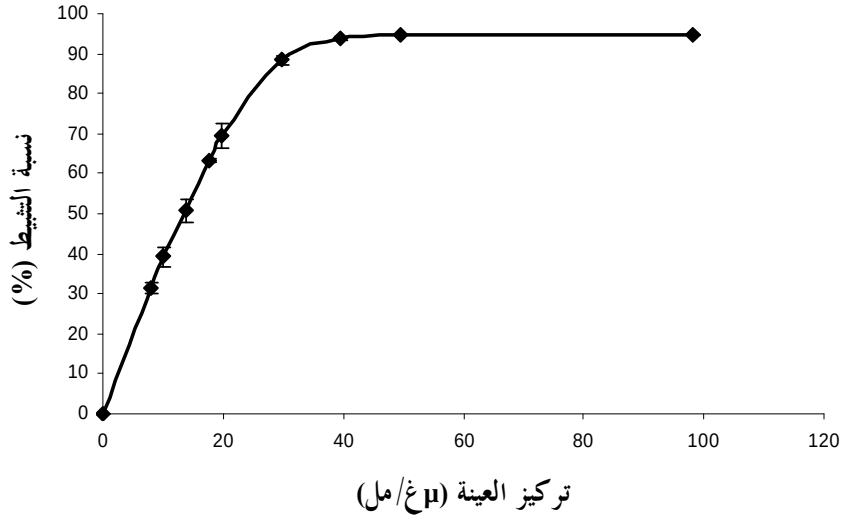
IC_{50} = 4,4 ± 1,53 µغ/مل

5- المنحنى الخاص بالطور المائي لـــ *Quercus faginea*:



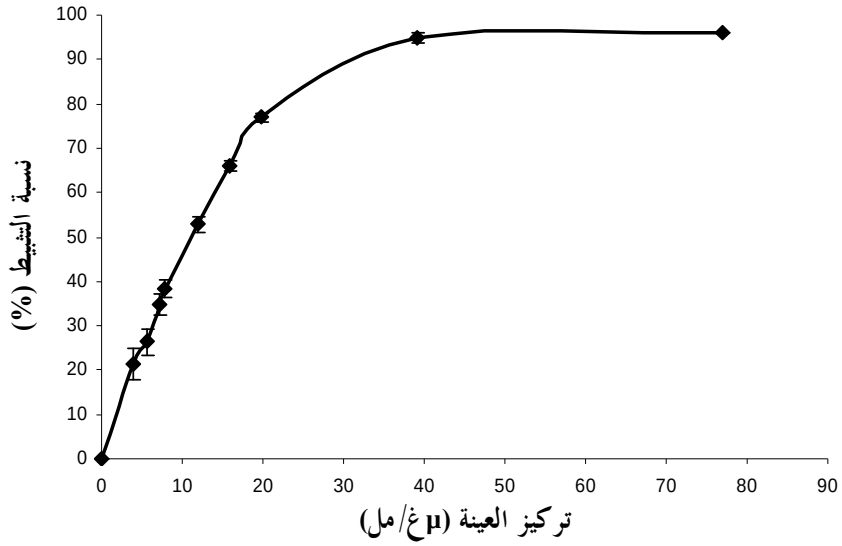
IC_{50} = 10,2 ± 1,04 µغ/مل

6- المنحنى الخاص بالطور العضوي لـــ *Quercus faginea*:



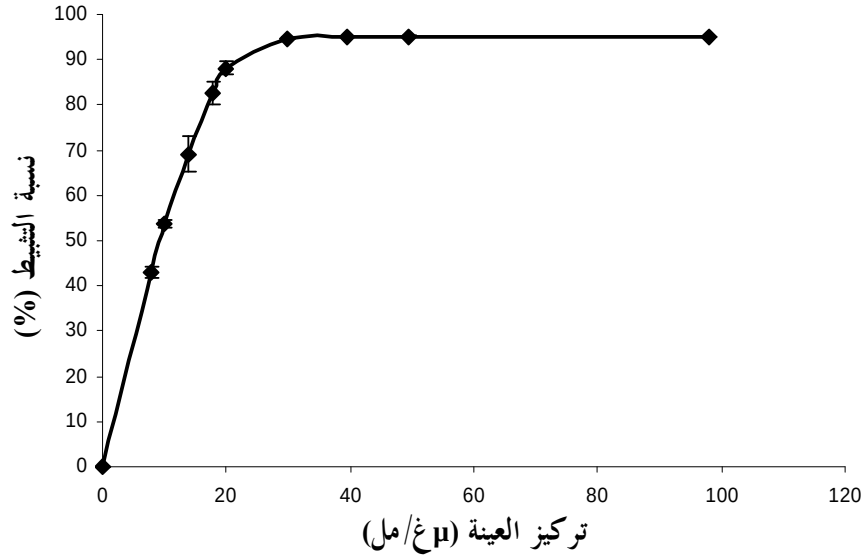
IC_{50} = 13,5 ± 1,28 µغ/مل

7- المنحنى الخاص بالطور المائي لأوراق *Quercus ilex*:



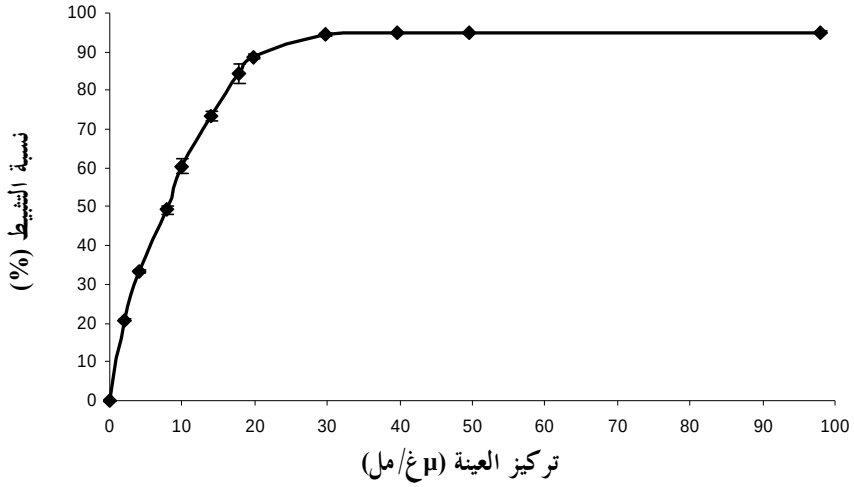
IC_{50} = 11,2 ± 1,61 µغ/مل

8- المنحنى الخاص بالطور العضوي لأوراق *Quercus ilex*:



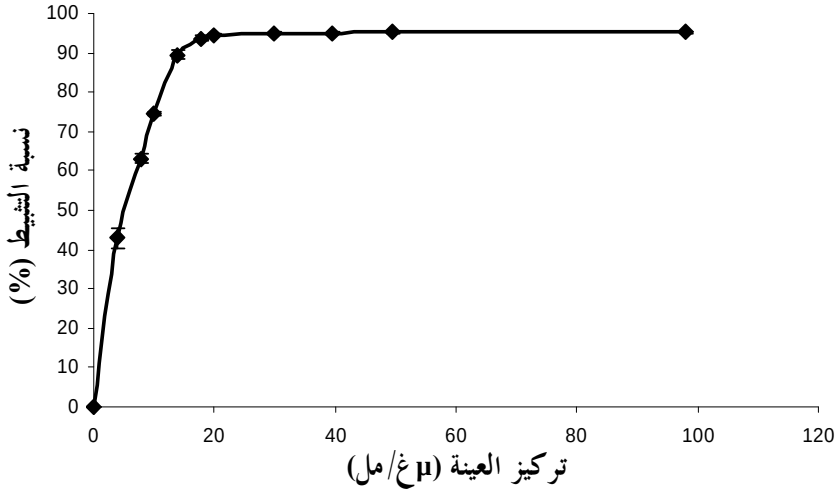
IC_{50} = 9,6 ± 1,01 µغ/مل

9- المنحنى الخاص بالطور المائي لقشور جذور *Quercus ilex*:



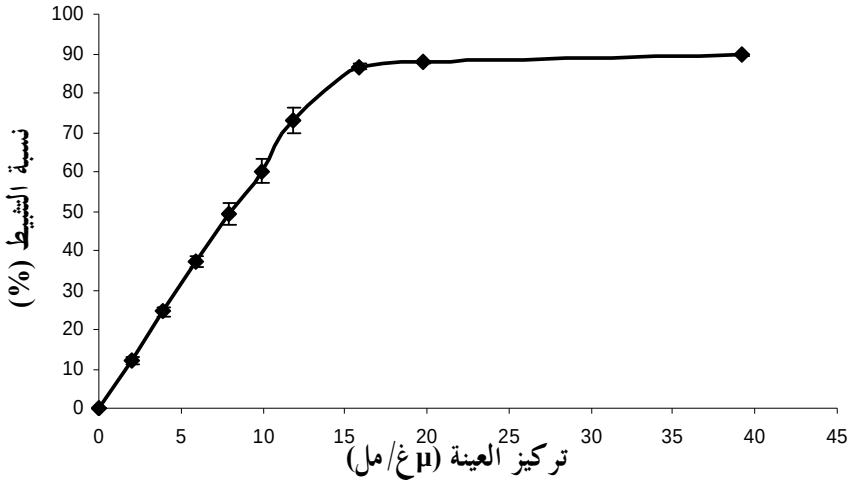
IC_{50} = 7,9 ± 0,71 µغ/مل

10- المنحنى الخاص بالطور العضوي لقشور جذور *Quercus ilex*:



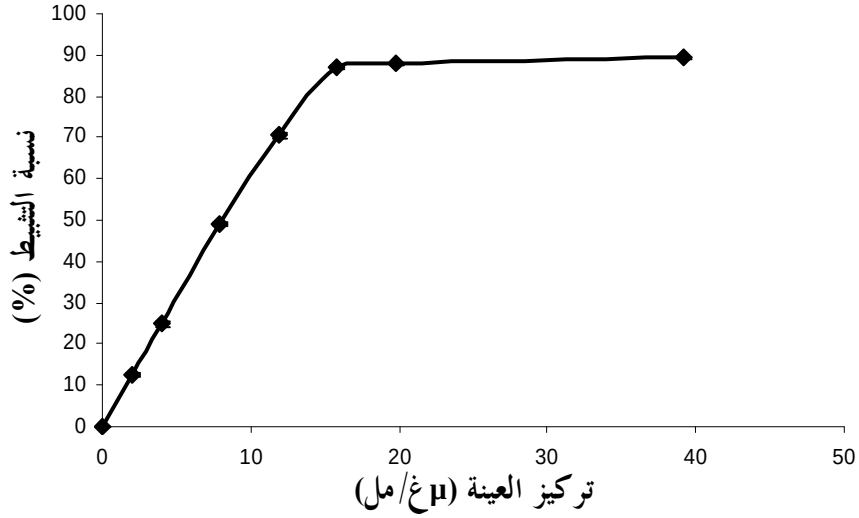
IC_{50} = 4,4 ± 0,65 µغ/مل

11- المنحنى الخاص بالطور العضوي لـــ *Quercus suber*:



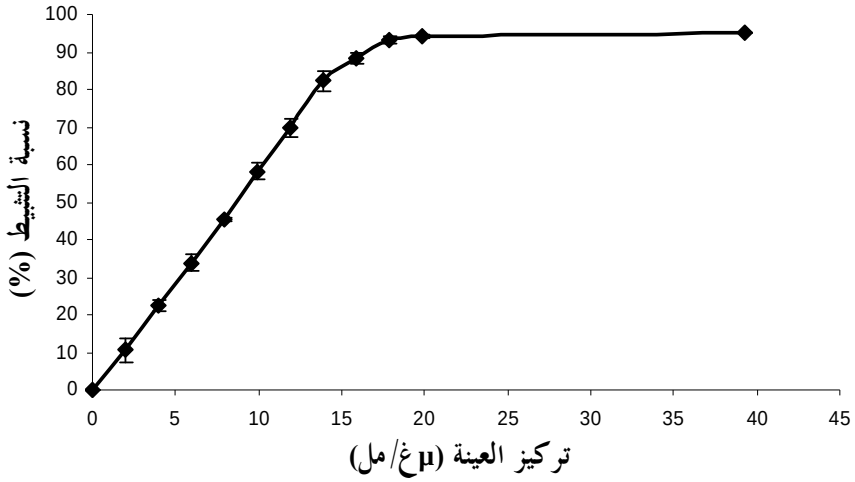
IC_{50} = 8,1 ± 1,37 µغ/مل

12- المنحنى الخاص بالطور العضوي لـــ *Quercus coccifera*:



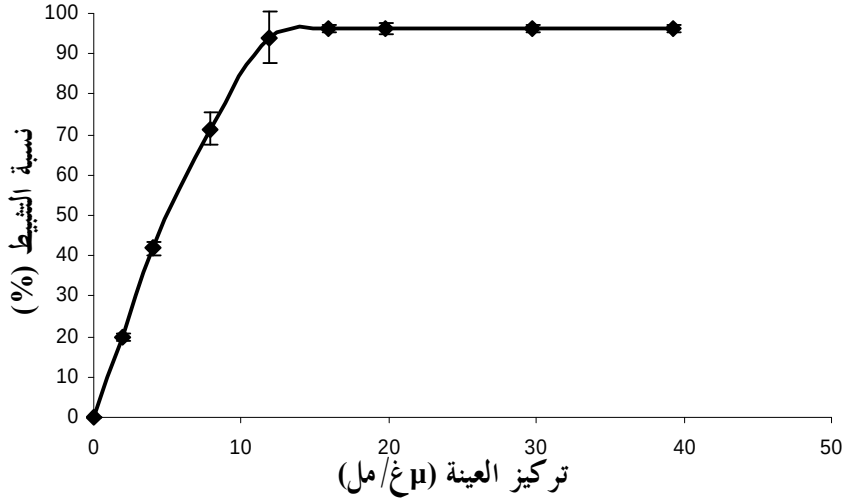
IC_{50} = 8,4 ± 0,43 µغ/مل

13- المنحنى الخاص بـــ Rutin:



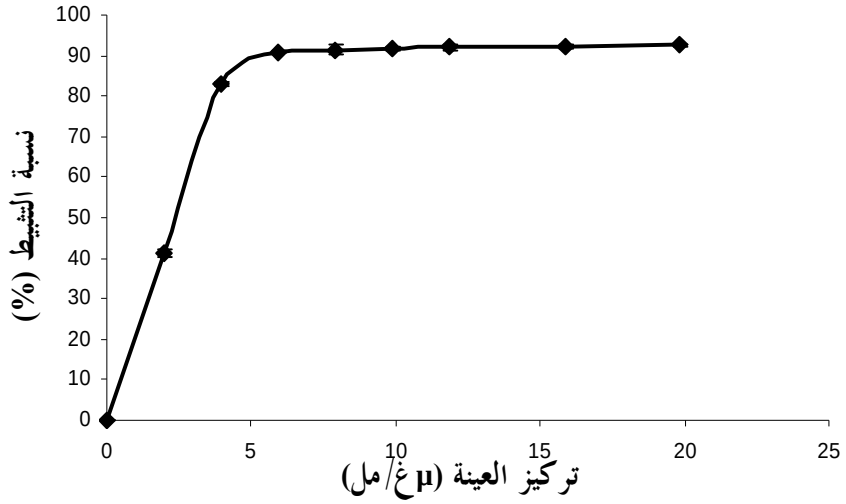
IC_{50} = 8,6 ± 1,43 µغ/مل

14- المنحنى الخاص بـــ Quercetin:



IC_{50} = 5,4 ± 1,85 µغ/مل

15- المنحنى الخاص بحمض التانيك:

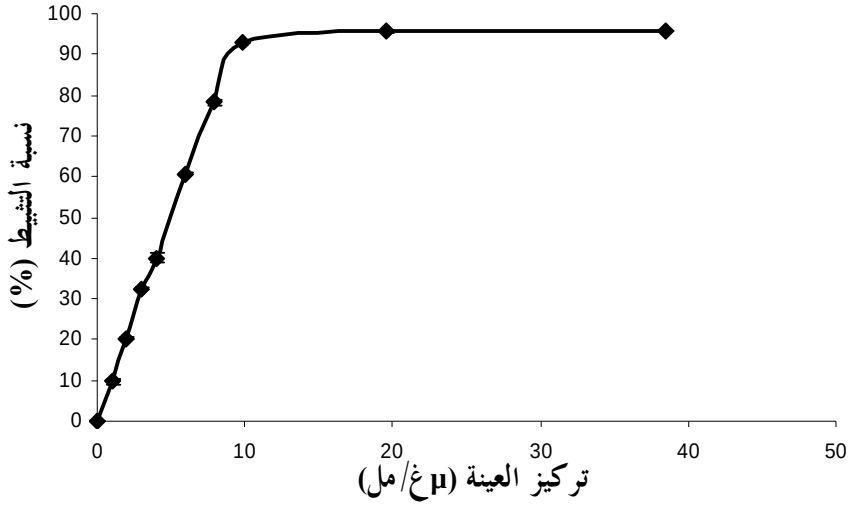


IC_{50} = 2,3 ± 0,46 µغ/مل

16- المنحنى الخاص بحمض الغاليك:

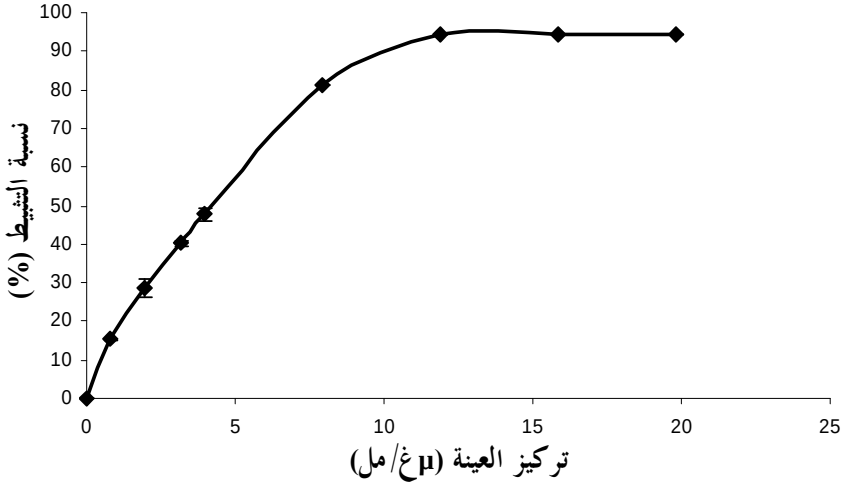
IC_{50} = 2,1 ± 0,77 µغ/مل

17- المنحنى الخاص بحمض الكافييك:



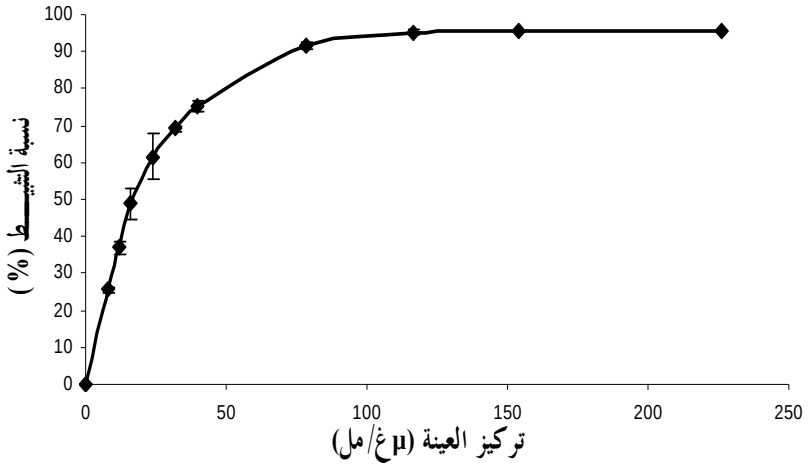
IC_{50} = 4,8 ± 0,42 µغ/مل

18- المنحنى الخاص بـــ Catechin:



IC_{50} = 4,3 ± 0,6 µغ/مل

19- المنحنى الخاص بـــ BHT:



IC_{50} = 17,8 ± 1,85 µغ/مل

تمثل كل نقطة من هذه المنحنيات الوسيط الحسابي لـــ 3 قياسات ± الانحراف المعياري (SD).