

## COMPOSES PHENOLIQUES DES GRIGNONS D'OLIVE PROVENANT D'HUILERIES TRADITIONNELLE ET MODERNE : ESSAI DE PURIFICATION DE L'OLEUROPEINE ET DE L'HYDROXYTYROSOL

Reçu le 14/03/2014 – Accepté le 27/01/2015

MOUZAOUI K., YAZZAG L., MOULTI-MATI F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. [m.biofar@yahoo.fr](mailto:m.biofar@yahoo.fr)

### Résumé

L'industrie oléicole génère deux résidus, margines et grignons. La production mondiale de grignons est estimée à 2,9 millions de tonnes, en Algérie, elle est de 156.10<sup>4</sup> quintaux /an [1]. Ce qui conduit à des pollutions nocives pour la santé humaine et l'environnement d'où l'importance de valoriser ce sous produit doté de composés intéressants. Dans ce contexte, les composés phénoliques totaux (CPT) sont extraits de deux types de grignons, ceux issus de l'huilerie traditionnelle (HTr) et ceux issus de l'huilerie moderne (HM), en utilisant comme solvant d'extraction l'acétate d'éthyle. L'oleuropeine (OL) et l'hydroxytyrosol (HT) sont séparés des CPT et purifiés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les valeurs en CPT obtenus sont significativement différentes entre les deux grignons soit 9,42 mg/kg pour l'HM et 7,64 mg/kg pour l'HTr. Les teneurs en OL sont respectivement de 11,88 µg/kg dans les grignons de l'HM contre 0,21 µg/kg dans les grignons de l'HTr et celles de l'HT sont respectivement de 26,56 µg/kg et 3,38 µg/kg. Ces résultats montrent que le système d'extraction de l'huile influence la concentration en CP présents dans le grignon d'olive.

**Mots clés :** Grignons d'olives ; composés phénoliques ; oleuropeine ; hydroxytyrosol ; huilerie moderne ; Huilerie traditionnelle.

### Abstract

The olive industry generates two residues, vegetable water and pomace. World production of pomace is estimated at 2.9 million tonnes, in Algeria, it is 156.10<sup>4</sup> quintals / year [1]. This leads to harmful pollutants to human health and the environment, hence the importance of valuing this sub product with interesting compounds. In this context, total phenolics (CPT) are extracted from both types of residue, those from conventional oil manufacture (HTr) and those derived from modern oil mill (HM), using as the extracting solvent the ethyl acetate. Oleuropein (OL) and hydroxytyrosol (HT) are separated from the CPT and purified by thin layer chromatography (TLC). The CPT values obtained are significantly different between the two pomace: 9.42 mg / kg for HM and 7.64 mg / kg for HTr. OL contents are 11.88 µg / kg in the pomace of HM against 0.21µg / kg in the pomace of HTr and those of HT are respectively 26.56µg / kg and 3.38 µg / kg. These results show that the oil extraction system influences the concentration of CP present in the olive pomace.

**Keywords:** Oil-cake; phenolic compounds; oleuropein; hydroxytyrosol; modern oil mill; Traditional oil mill.

### ملخص

صناعة الزيتون تولد اثنين من المخلفات المياه الملوثة والنقل. يقدر الإنتاج العالمي من ثقل الزيتون ب 2.9 مليون طن و في الجزائر ب 156.10<sup>4</sup> قنطار / سنة . وهذا يؤدي إلى الملوثات الضارة على صحة الإنسان والبيئة، ومن هنا تأتي أهمية تقييم هذا المنتج الفرعي المتكون من مركبات مثيرة للاهتمام. وفي هذا السياق، يتم استخراج مجموع المركبات الفينولية من نوعين من الثقل، تلك المستمدة من مطحنة الزيتون التقليدية وتلك المستمدة من مطحنة الزيتون الحديثة، وذلك باستخدام اسيتات الإيثيل. يتم فصل الأولوربيين و اللهدروكستروزول من مجموع المركبات الفينولية وتنقيتها بواسطة تقنية الفصل الكروماتوغرافي. قيم مجموع المركبات الفينولية المتحصل عليها تختلف اختلافا كبيرا بين ثقل المطحنتين، تقدر في مطحنة الزيتون الحديثة ب 9.42 ملغ / كغ و في مطحنة الزيتون التقليدية ب 7.64 ملغ / كغ. محتويات الأولوربيين هي 11.88 ميكروغرام / كغ في ثقل المطحنة الحديثة ضد 0.21 ميكروغرام / كغ في ثقل المطحنة التقليدية و بانسبة اللهدروكستروزول تقدر على التوالي ب 26.56 ميكروغرام / كغ و 3.38 ميكروغرام / كغ. تشير هذه النتائج إلى أن نظام استخراج الزيت يؤثر على تركيز مجموع المركبات الفينولية الموجودة في ثقل الزيتون.

**الكلمات المفتاحية :** ثقل الزيتون، المركبات الفينولية، الأولوربيين، اللهدروكستروزول، مطحنة الزيتون الحديثة، مطحنة الزيتون التقليدية.



Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques (CP) mais, comme c'est le cas pour la plupart des métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative diffère selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques. Ils se présentent sous différentes structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes qui permet à l'être humain d'en faire usage dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire et la pharmacologie [2].

De plus en plus, les polyphénols captent l'intérêt des chercheurs au vu de leurs bénéfices santé. Leurs propriétés reposent sur leur activité anti-oxydante d'où découle divers effets biologiques : activité anti-microbienne, anti-virale, anti-fongique... [3].

Les CP sont par excellence des inhibiteurs de l'oxydation par piégeage des radicaux libres, ils s'illustrent par leur action protectrice vis-à-vis des érythrocytes sanguins, démontrés au niveau du laboratoire due à leur activité anti-oxydante [4].

Ils ont prouvé leur efficacité dans les huiles de friture contre l'oxydation thermique identifiés comme des antioxydants naturels pouvant être utilisés en agroalimentaire [5, 6].

L'OL, un des composés les plus abondants parmi les CP [7] s'est avéré un antioxydant efficace doté de propriétés, hypoglycémique [8], anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-virale (virus de l'immunodéficience humaine), prévient la maladie d'Alzheimer [9] et est impliqué dans la protection de l'organisme contre certains agents pathogènes responsables de maladies intestinales ou du système respiratoire [10]. Par ses activités antimicrobienne et antifongique, il empêche la croissance d'une gamme de microorganismes [11, 12].

L'HT est un CP simple qui dérive directement de l'hydrolyse de l'oleuropéine. Il a montré divers effets bénéfiques pour la santé humaine dans la prévention de nombreuses maladies. Il protège les pigments maculaires des agressions de l'acroléine de la fumée de cigarette chez les fumeurs [13]. Il exerce aussi des activités antithrombotique telles que l'inhibition de l'oxydation des LDL [14] et l'activation des cellules endothéliales [15]. Comme il peut présenter une activité anti-microbienne qui inhibe le développement des bactéries lactiques [16]. L'étude de l'auto-oxydation des huiles montre que l'HT est le composé le plus actif : le peroxyde d'hydrogène est complètement inhibé par l'ajout d'HT [17].

Ce travail consiste en l'extraction des CPT à partir du grignon d'olive issu d'une huilerie traditionnelle et d'une huilerie moderne dans la région de Kabylie. De mettre au point une méthode de purification de l'OL et HT à partir de ces CPT extraits.

## MATERIEL ET METHODES

### Matière première

Des grignons obtenus à partir des olives provenant de deux huileries situées à Tizi-Ouzou (région de Kabylie) en Algérie, cueillis en janvier 2012 ont été utilisés. Ces grignons proviennent de deux huileries, l'une traditionnelle utilisant le système à trois phases (HTr) et l'autre moderne utilisant le système à deux phases (HM). Dans le premier cas l'extraction se fait par pression sur des scourtins empilés sur le plateau d'une presse ou super presse hydraulique. Sous l'action de la pression, la pâte d'olive dégage un moût huileux, ce dernier se sépare de la phase solide par suite de l'action de drainage exercée par les scourtins, l'huile qui sort des presses peut être séparée des margines par décantation naturelle ou par centrifugation.

Dans le deuxième cas, l'extraction se fait par centrifugation. C'est une technique qui repose sur la différence entre les poids spécifiques de l'huile, de l'eau et du grignon.

Les grignons sont dénommés selon leur provenance traditionnelle ou moderne.

Les grignons sont tout d'abord séchés à l'air libre, broyés puis répartis en fractions de 50g dans des sacs en plastiques. Ces sacs sont congelés à -4°C jusqu'à leur utilisation.

### Prétraitement des échantillons

Les échantillons de grignons d'olives utilisés ont subi les opérations de séchage et de broyage.

Le séchage consiste à éliminer la teneur en humidité dans les grignons à fin d'avoir un meilleur transfert de matière lors du processus d'extraction et éviter le développement des moisissures [18]. Il est effectué par étalement de la matière première à l'air libre en une couche mince de 1 à 2 cm.

Les échanges de matière sont d'autant plus conséquents que la surface de contact entre le grignon et le solvant est élevé [18] d'où la nécessité de recourir au broyage. Un premier broyage est effectué à l'aide d'un broyeur industriel, puis un deuxième juste avant l'extraction à l'aide d'un broyeur ménager pour diminuer davantage la taille des particules de grignon jusqu'à un diamètre de 0,8 mm.

### Détermination du taux d'humidité relative (Hr%)

Avant séchage des grignons, l'humidité est déterminée en séchant 10g d'échantillon à l'étuve, à 100°C pendant 24h jusqu'à ce que le poids devient constant. L'essai a été répété trois fois pour chaque type d'échantillon et l'humidité est donnée par la formule suivante :

$$Hr(\%) = \frac{M1 - M2}{M1}$$

Où:

M1 (g) représente la masse en grammes de la prise d'essai avant séchage.

M2 (g) représente la masse en grammes de la prise d'essai après séchage.

### Extraction des composés phénoliques des grignons d'olives

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon la méthode de De Marco [19] modifiée pour les grignons d'olive comme suit : en vu d'éliminer les lipides qui peuvent gêner l'extraction des CP on a recouru à une délipidation qui consiste à rajouter un volume de 150 ml de cyclohexane qui est un solvant non polaire, à 50g d'échantillon.

Après une agitation de 10 min à froid, la phase aqueuse contenant les CP est séparée de la phase organique contenant les lipides par filtration avec du papier filtre. L'extraction des CP se fait en ajoutant à l'extrait délipidé, un solvant organique polaire qui est l'acétate d'éthyle d'un volume de 200 ml. Après agitation pendant 10 min, une filtration avec du papier filtre est effectuée. L'extrait phénolique obtenu est séparé du solvant par évaporation sous vide à 40°C au rotavapor. Cet extrait sec est récupéré dans 2ml de méthanol puis conservé dans des tubes fermés, au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation. Trois essais sont effectués pour chaque type de grignons.

### Dosage des composés phénoliques totaux

La concentration des CPT est déterminée par la méthode de Singleton et *al.*, [20], qui consiste en l'oxydation des CP lorsqu'ils sont mis en contact avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

La concentration des CPT est déterminée à partir d'une courbe étalon utilisant l'acide gallique comme standard ; avec une gamme allant de 0,004 à 0,1mg/ml. Les échantillons sont ensuite incubés à l'obscurité pendant une heure à température ambiante. L'absorbance est lue à 760 nm. Les concentrations sont données en équivalent d'acide gallique (mg/g).

### Purification de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol

Pour purifier OL et HT, la CCM est réalisée. Les plaques de gel de silice ont été utilisées comme phase stationnaire et l'acétate d'éthyle comme phase mobile. Des standards d'OL et d'HT sont également utilisés. La révélation des spots est faite sous UV à 254 nm.

Les Rf (rapports frontaux) de l'OL et HT, dans ces conditions de CCM, sont déterminés. Il est de l'ordre de 0,87 pour l'OL et de 0.80 pour l'HT. Grâce à leurs Rf

spécifiques, l'OL et l'HT ont été prélevés et récupérés dans le gel de silice dans un volume total de 500µl de méthanol. Ce mélange est centrifugé à une vitesse de 350g pendant 3 min. Le surnageant contenant le produit purifié est récupéré. La concentration est déterminée par un dosage suivant la méthode précédemment décrite pour le dosage des CPT.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les moyennes et les écarts types des résultats obtenus ainsi que l'analyse statistique par le test de Student sont effectués sur le logiciel Stat Box 6. Les résultats obtenus sont portés sur le tableau 1.

**Tableau 1 :** Humidité relative en % des grignons d'olives issus des deux huileries moderne et traditionnelle.

Huileries	Humidité relative en % des grignons	Analyse statistique
HM	55,83 ± 0,066	$t_{\text{observé}} = 124,05$ $t_{\text{technique}} = 4,27$
HTr	47,55 ± 0,094	

L'humidité des grignons d'olives issus de l'HM est supérieure à celle des grignons d'olives issus de HTr, la différence est significative. Cette différence est expliquée par le fait que :

- Le système à deux phases nécessite plus de quantité d'eau par rapport au système à trois phases [21].
- Les grignons issus du système à deux phases sont en mélange avec les margines contrairement au système à trois phases qui sépare ces deux résidus.

### Quantification des CPT

Les concentrations moyennes des CPT extraits sont données par le tableau 2. Le séchage et le broyage effectués pour les grignons permettent d'avoir un meilleur transfert de matière et d'augmenter la surface de contact entre le grignon et le solvant ce qui favorise l'extraction des CP.

**Tableau 2 :** Concentrations moyennes (mg/kg) des CPT extraits des grignons issus des deux systèmes HM et HTr.

Type de grignons	Concentration moyenne en CPT (mg/kg)	Analyse statistique
issus de l'HM	9,42± 0,26	$t_{\text{observé}} = 6,58$ $t_{\text{technique}} = 4,27$
issus de l'HTr	7,64±0,38	

La concentration des CPT des grignons issus de l'HM avec une moyenne de 9,42 mg/kg est significativement supérieure à celle trouvée dans les grignons issus de HTr avec une moyenne de 7,64 mg/kg. Les concentrations des CPT trouvées dans les deux cas (système à deux et à trois

phases), sont supérieures à celle trouvée par [22] soit 2,8 mg/kg en utilisant les mêmes conditions opératoires.

Cependant, les concentrations sont légèrement inférieures lorsque les CPT sont extraits par le méthanol (10,8 mg/kg) rapportées par le même auteur et celle apportée par [23] de l'ordre de 11,8 mg/kg.

De plus, elles sont inférieures à celles présentes dans les margines à une concentration variant de 25 à 35 mg/kg apportée par [24], et à celle trouvée par [22], de 125 mg/kg.

L'écart des valeurs trouvées entre les deux types d'échantillons peut être expliqué par la différence entre les types de grignons utilisés. En effet, les grignons les plus riches en CPT à savoir ceux provenant du système à deux phases contrairement à ceux issus du système à trois phases, sont des grignons humides car ils contiennent en plus de la peau, la pulpe et le noyau, des margines, ce qui laisse supposer que cette teneur élevée est due à la présence de ces dernières.

La différence entre les valeurs trouvées et celles apportées par la bibliographie peut être expliquée par la nature du matériel de départ, conditions de conservation (congélation) et la méthode d'extraction adoptée.

En effet, la variabilité de la teneur en CPT est largement dépendante de plusieurs facteurs : cultivar, degré de maturation [25], des conditions climatiques, géographiques [26], de l'état physiologique et l'âge de la plante [27].

De plus, d'après [28], le rendement d'extraction dépend de la polarité du solvant utilisé, qui détermine la quantité, la qualité des CP extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal. L'acétate d'éthyle est un solvant très sélectif pour les molécules de bas et moyen poids moléculaire [29]. De plus, ce solvant exerce un haut pouvoir d'extraction par rapport aux autres solvants [30].

### **Purification de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol**

En utilisant la CCM, l'oleuropéine et son dérivé qui est l'hydroxytyrosol ont pu être identifiés sous la lumière UV à partir du contenu des extraits phénoliques obtenus à partir des grignons d'olive en référence aux standards d'oleuropéine et d'hydroxytyrosol et de leurs Rf.

Les concentrations moyennes de l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol trouvées sont représentées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Concentrations moyennes de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol purifiés ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

	HM	HTr	Analyse statistique
Concentration moyenne d'OL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	11,88±0,0196	0,21 ± 0,085	$t_{\text{observé}} = 94,48$ $t_{\text{technique}} = 4,27$
Concentration moyenne de HT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	26,56 ± 0,52	3,38 ± 0,24	$t_{\text{observé}} = 69,47$ $t_{\text{technique}} = 4,27$

Les concentrations en oleuropéine trouvées dans les extraits phénoliques totaux des grignons issus des deux systèmes sont très faibles. Dans les grignons de HTr, la valeur est de 0,21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  contre 11,88  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dans les grignons de l'HM. Les valeurs sont très inférieures à celles trouvées dans les feuilles de l'olivier (60 à 90 mg/g de feuilles sèches) [31], qui sont le siège de la biosynthèse des CP. Par contre, les concentrations en HT sont plus importantes que celles de l'oleuropéine mais restent quand même faibles par rapport à la quantité des extraits phénoliques totaux et aussi à sa quantité trouvée dans les feuilles fraîches (2,3 g/100g) rapporté par [32].

Comme l'HT est un dérivé de l'OL, les faibles teneurs de ces derniers sont dues en grande partie à son hydrolyse. Ce qui est confirmé par la présence d'une quantité non négligeable d'hydroxytyrosol.

### **CONCLUSION**

Il ressort de ces expériences que les grignons d'olives sont une source non négligeable de CP, il serait intéressant de chercher des moyens de valorisation notamment par l'extraction des polyphénols. Un calcul simple, l'Algérie qui rejette  $156.10^4$  Qt/an dans la nature, peut produire plus de  $9 \text{ mg} \times 156.10^4$  soit une moyenne de 1469 Kg de CP.

Il serait utile de trouver des méthodes d'extraction faciles à mettre en œuvre. Ces méthodes doivent fournir un bon rendement d'extraction. Le solvant doit être choisi selon sa polarité et le plus approprié à la nature du CP à extraire et qui ne poserait pas un nouveau problème de pollution.

Une incitation gouvernementale est plus que souhaitable de manière à encourager la valorisation du grignon d'olive sous ses différents aspects, diminuant ainsi un peu soit peu leur effet polluant sur l'environnement tout en dégageant une plus value économique non négligeable.

## REFERENCES

- [1]-Ministère De L'Agriculture Et Du Développement Rural «MADR». Le Renouveau Agricole et Rural en marche. Revue et Perspectives. Mai 2012. www.minagri.dz.
- [2]-Macheix J.J., Fleuriet A. & Sarni-Manchado P. Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, (2006), pp.390-399.
- [3]-Senani N. & Moulti-Mati F. (2012). Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété *chamlal (olea europea)* sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. *Tunisian Journal Medicinal Plants and Natural Products*, Vol.8, N°1, pp.44-48.
- [4]-Nadour M., Michaud P. & Moulti-Mati F. Antioxidant activities of polyphenols extracted from olive (*Olea europaea*) of *chamlal* variety. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.167, N°6, (2012), pp.1802-1810.
- [5]-Moulti-Mati F. & Ouarezki H. Etude du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques totaux des olives vertes de la variété *Chamlal* sur deux huiles végétales (d'olive et de tournesol). *Congrès international sur la Santé et l'Agro-Alimentaire, Qualité, Sécurité, Innovation*, Sidi Fredj, Alger, 02-03 Décembre (2009).
- [6]-Mokrani A., Louaileche H. Composés bioactifs et activité antioxydante de quelques variété d'oignon. Laboratoire de Biochimie Appliquée. Département des Sciences Alimentaires. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abderrhmane Mira de Bejaia. In : Congrès international de nutrition. Oran, Algérie, (2011), pp. 133.
- [7]-Henry S. L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Pharmacie. Université HENRI POICARE-NANCY1. France, (2003), pp.30.
- [8]-Al-Azzawei H.-F. & Alhamadani M.-S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, N°78, (2006), pp. 1371-1377.
- [9]-Benlemleh M. & Ghanam D. Polyphénols d'huile d'olive, Trésors santé! Medicatrix macro pietteur editeur. ISBN 978-2-87211-117-6. www.medicatrix.be, (2012), pp111.
- [10]-Bisignano G., Tomiano A., Lo Cascia R., Crisafi G., Uccella N. & Saija A. On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol.51, N°8, (1999), 971-974.
- [11]-Dermeche S. & Moulti-Mati F. Dépollution des margines par adsorption et valorisation des supports d'adsorption par culture de *Phanerochaete chrysosporium*. Edité par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Ferhat Abbas-Sétif. *17èmes Journées Nationales de microbiologie*, Sétif, 20-21 Novembre (2011), pp.88-92.
- [12]-Debib A., Meddah B., Tir-Touil A. Antimicrobial activity *in vitro* of the virgin olive oils phenolic against resistant humane pathogens. Laboratoire LRSBG, Université de Mascara. In : Congrès international de nutrition. Oran, Algérie, (2011), pp.152.
- [13]-Liu Z., Sun L., Zhu L., Jia X., Li X., Jia H., Wang Y., Weber P., Long J., Liu J. Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Neurochemistry*, Vol.103, N°6, (2007), pp.2690-2700.
- [14]-Visioli F., Belleme G., Montedoro G. & Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vivo* by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, Vol.117, N°1, (1995), pp.25-32.
- [15]-Carluccio M.A., Siculella L., Massaro M., Scoditti E. & Storelli E. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, Vol.23, N°4, (2003), pp.622-629.
- [16]-Medina E., Romero C., Brenes M., García P., De Castro A., García A. Profile of anti-lactic acid bacteria compounds during the storage of olives which are not treated with alkali. *European Food Research and Technology*, Vol.228, N°1, (2008), pp.133-138.
- [17]-Fadel F., Fattouch S., Tahrouch S., Lahmar R., Benddou A. & Hatimi A. The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*). *J. Mater. Environ. Sci.* Vol.2, N°3, (2011), pp.285-292.
- [18]-Moussaoui R. (2007). Valorisation des sous produits de l'huile d'olive : grignons, margines. Thèse de Doctorat en Chimie, Département des Sciences, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.
- [19]-De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, Vol.104, N°2, (2007), pp.858-867.
- [20]-Singleton V.R., Orthofer R. & Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, N°299, (1999), pp.152-178.

- [21]-**Isma K.** Industrie oléicole : Valorisation des sous produits de l'activité oléicoles. In : Produire plus propre. Centre National des Technologies de production plus propre, N°8, (2011), pp.6-7.
- [22]-**Ünal K.** Polyphénols, O-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et les margines. *OLIVAE*, N° 51, Avril (1994), pp.34-35.
- [23]-**Zaidi F., Hassissene N., Allouache H., Kichou M., Ourdani S., Rezki K., Bellal M. M., Grongnet J.F. & Youyou A.** Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Médecine Vétérinaire.*, Vol.160, N°2, (2009), pp.67-73.
- [24]-**Ait Baddi C., Cegarra J., Merlina G., Revel J.C. & Hafidi M.** Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*, Vol.165, N°1, (2009), pp.1119-1123.
- [25]-**Boudhrioua N., Bahloul N., Ben Slimane I. & Kechaou N.** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Corps and Products*, Vol.29, N°2, (2009), pp.412-419.
- [26]-**Mylonaki S., Kiassos E., Makris D.P & Kefalas P.** Optimization of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chemistry*, Vol.392, N°5, (2008), pp.977-985.
- [27]-**De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V. & Ranalli G.** Isolation of hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, Vol.266, N°4, (2008), pp.653-659.
- [28]-**Sineiro J., Franco D., Rubilar M., Sanchez M., Jerez M., Pinelo M., Costoya N. & Núñez M.J.** Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, Vol.7, N°8, (2008), pp.3210-3216.
- [29]-**Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. & Stockmann R.** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, N°4, (2005), pp.823-837.
- [30]-**Allouche N., Feki I. & sayadi S.** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.52, N°2, (2004), pp.267-273.
- [31]-**Lomenech H.** L'olivier: Intérêt dans les produits cosmétiques. Thèse de Docteur en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, France. Université de Nantes. France, (2010), pp.51-81.
- [32]-**Fodhil-bouhjr H., (2011).** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Faculté des Sciences, Département de Chimie, Spécialité Chimie, Option Chimie de l'Environnement, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.