وزارة التعليـــم العالـــي والبحـــث العلمـــي
جامعـــة قاصـــدي مربـــاح ورقلـــة
كليـــة الرياضيات وعلـــوم المـــادة
قســـم الكيمياء

مذكـرة مقدمة لنيل شهادة ماستر أكاديمي

فـرع ـ الكيـمياء

التخصص: كيمياء مطبقة

من إعداد: هناء حريف، صفية رقيبي

بعنـــــــوان

بحث فيتوكيميائي وبيولوجي لمستخلصات بيوتانولية متحصّل عليها من نباتات برية صحراوية

نوقشت علنا يوم:2017/05/20أمام لجنة المناقشة:

دندوقي حسين	أستاذ تعليم عالي	رئيسا
علاوي مسعودة	أستاذ محاضر ب	مناقشة
بوزيان مباركة	أستاذ محاضر أ	مـــــــقررة

السنة الجامعية: 2017 / 2016

وزارة التعليـــم العالـــي والبحـــث العلمـــي

جامعـــة قاصـــدي مربـــاح ورقلـــة

كليـــة الرياضيات وعلـــوم المـــادة

قســـم الكيمياء

مذكـرة مقدمة لنيل شهادة ماستر أكاديمي

فـرع ـ الكيـمياء

التخصص: كيمياء مطبقة

من إعداد: هناء حريف، صفية رقيبي

بعنـــــــوان

Investigation phytochimique et biologique d'extraits butanoliques obtenus de plantes spontanées sahariennes

نوقشت علنا يوم: 20/05/2017 أمام لجنة المناقشة:

دندوقي حسين	أستاذ تعليم عالي	رئيسا
علاوي مسعودة	أستاذ محاضر ب	مناقشة
بوزيان مباركة	أستاذ محاضر أ	مـــــــقررة

السنة الجامعية: 2017 / 2016

أهدي ثمرة هذا العمل إلى أمي صديقتي حبيبتي

و إلى الوالد الكريم وإلى زوجي الغالي

و إلى إخوتي عزوتي و إلى جدّتي الحنونة

وإلى نسائبي وكل أفراد عائلتي

وكل صديقاتي

هناء

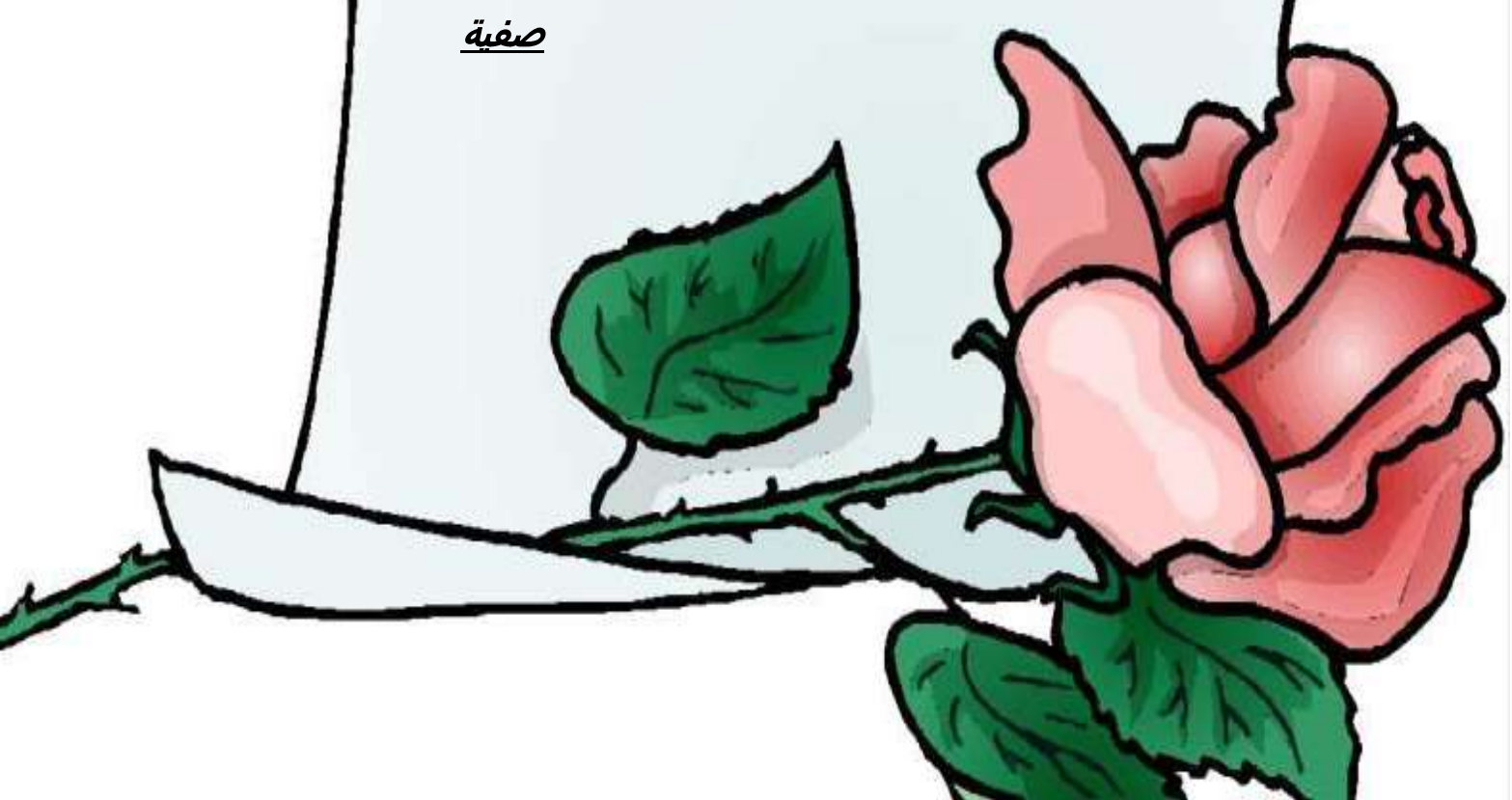
أهدي ثمرة هذا العمل إلى أمي وأبي

وإلى إخوتي و أخواتي الأعزاء

وإلى صديقاتي خاصة حبيبة صليحة وفاء لبنى

وكل أفراد عائلتي

صفية



شكـــــــــر وتقدير

الحمد لله الذي أنار لنا درب العلم والمعرفة وأعاننا على أداء هذا الواجب ووفقنا إلى انجاز هذا العمل

نتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى كل من ساعدنا من قريب أو من بعيد على انجاز هذا العمل وفي ما واجهناه من صعوبات، ونخص بالذكر الأستاذة الكريمة الدكتورة **بوزيان مباركة** التي لم تبخل علينا بتوجيهاتها ونصائحها القيمة التي كانت عونا لنا في إتمام هذه المذكرة وكذا الأستاذ **للأستاذ الدكتور الحاج امحمد محفوظ** الذي لم يبخل علينا بمساعداته توجيهاته و الأستاذة سلوقي نبيلة وكل الأساتذة الكرام ، ونتقدم بالشكر الجزيل **الأستاذ الدكتور دندوقي حسين** الذي منحنا شرف رئاسة لجنة المناقشة **والأستاذة علاوي مسعودة** على قبولها مناقشة هذه المذكرة.

كما نتوجه بجزيل الشكر والعرفان لكل من الدكتورة **عيدان خولة**، ووليد بوسبعة و كل عمال مخبر ميكروبيولوجي في مستشفى تقرت

كما لا يفوتنا أن نشكر كل الزملاء دون استثناء، كما نتوجه بخالص عبارات الشكر والتقدير لكل من قامة بمد يد العون لنا في هذا العمل المنجز.

الطالبتان

حريفة هناء

رقيبي صفية

قائمة الإختصارات

Absorbance	Abs
Chromatographie sur colonne	CC
Chromatographie sur couche mince	CCM
Chromatographie sur papier	Cp
Diméthylsulfoxyde	DMSO
Mueller-Hinton	MH
كسورالمستخلص *Brocchia cinerea*	Fb
كسور المستخلص *Matricaria pubescens*	Fm
Pourcentage d'inhibition	IP%
Concentration Minimal Inhibitrice	CMI
Concentration efficace à inhiber 50 % des radicaux DPPH	EC50
2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl	DPPH
Ferric reducing antioxydant power	FRAP
Equivalente Acide Ascorbique	EAA
2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-1, 3, 5-s- triazine	TPTZ
Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible	UV-Vis

قـــــــــائمة الجــداول

الجدول	العنوان	الصفحة
الجدول (1)	أمثلة عن بعض أقسام المركبات متعددة الفينولات	4
الجدول (2)	أمثلة عن بعض الجذور الحرة النشطة	10
الجدول (3)	أنظمة الطور المتحرك المستعملة CCM	24
الجدول (4)	نتائج CCMباستعمال لأنظمة الطور المتحرك المختارة	25
الجدول (5)	الكسور المتحصل عليها من تجزئة المستخلص البيوتانولي لنبتة *M.pubescens*	26
الجدول (6)	الكسور المتحصل عليها من تجزئة المستخلص البيوتانولي للنبتة *B.cinerea*	26
الجدول (7)	نتائج الكروماتوغرافيا CP للكسور المتحصل عليها من CC	35
الجدول (8)	أقطار الاستجابة لتثبيط البكتيريا (mm) لكل من المستخلصين البيوتانوليين *M.pubescens* و *B.cinerea* وكسورهما	41
الجدول (9)	التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا CMI	45

قائمة الاشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
الشكل (1)	الهيكل الأساسي الفلافونيدات	6
الشكل (2)	بعض أقسام الفلافونيدات	6
الشكل (3)	مخطط الاصطناع الحيوي لبعض أنواع الفلافونيدات	7
الشكل (4)	إرجاع Fe^{+3}-TPTZ إلى Fe^{+2}–TPTZ	12
الشكل (5)	معادلة تثبيط جذرDPPH في وجود مضادات الأكسدة	13
الشكل(6)	صورة مجهرية لبكتيريا *Escherichia coli*	*15*
الشكل(7)	صورة مجهرية لبكتيريا *Staphylococcus eureus*	*16*
الشكل (8)	صورة مجهرية لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*	*16*
الشكل (9)	صورة النبتة *Matricaria pubescens* (Desf.)	19
الشكل (10)	صورة النبتة *Brocchia cineriea* (Vis.)	20
مخطط (11)	مخطط تحضير المستخلصات الخام من النبتة *M.pubescens*	22
مخطط (12)	مخطط تحضير المستخلصات الخام من النبتة *B.cinerea*	23
الشكل (13)	رسم بياني لمردود مستخلص البيوتانول للنبتتين *B.cinerea* و *M.pubescens*	30
الشكل (14)	رسم بياني لكتل كسور مستخلصي النبتتين	31
الشكل (15)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fm1	32
لشكل (16)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fm2	32
الشكل (17)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fm3	32
الشكل (18)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fm4	33
الشكل (19)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fm5	33
الشكل (20)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb2	34
الشكل (21)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb3	34
الشكل (22)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb5	34

الشكل (23)	صور نتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb9	35
الشكل (24)	نسبة تثبيط الجذور الحرة لمستخلص Mp وكسوره في اختبار DPPH	37
الشكل (25)	نسبة تثبيط الجذور الحرة لمستخلص Bc وكسوره في اختبار DPPH	38
الشكل (26)	المنحني القياسي لحمض الاسكوربيك في اختبار FRAP	39
الشكل (27)	نتائج إختبار FRAP لمستخلص Mp وكسوره	39
الشكل (28)	نتائج إختبار FRAP لمستخلص Bc وكسوره	40
الشكل(29)	نتائج الاختبارات المضادة للبكتيريا للمستخلص البيوتانولي وكسوره لكل من Mp و Bc	41
الشكل (30)	رسم بياني لحساسية السلالات الثلاثة للمستخلص البيوتانولي Mp وكسوره	43
الشكل (31)	رسم بياني لحساسية للسلالات الثلاثة للمستخلص البيوتانولي Bc وكسوره	45
الشكل (32)	صور لبعض نتائج إختبار CMI	45

الفهرس الصفحة

مقدمة عامة 1

الجزء النظري

الفصل الأول: دراسة المركبات الفينولية المتعددة

I.1. أمثلة عن المركبات الفينولية المتعددة polyphenols..... 3

I .1.1. تعريف 3

I.1.2. أقسام الفينولية المتعددة 4

I .1.3. مصدر الفينولية المتعددة 4

I.1.4. الفعالية البيولوجية الفينولية المتعددة 4

I .1 .5. أهميتها لدى النبات 5

I.2.الفلافونيدات 5

I. 2 .1. تعريف..... 5

I. 2.2. بعض أقسام الفلافونيدات..... 6

I .3.2. اصطناع الحيوي لبعض أنواع الفلافونيدات..... 7

I.4.2. خواص الفلافونيدات..... 8

الفصل الثاني دراسة الفعالية المضادة للأكسدة

II. الجذور الحرة ومضادات الأكسدة 9

II. 1. الجذور الحرة..... 9

II. 1 .1. تعريف الجذور الحرة 9

II. 1 .2. مصدرها داخل جسم الكائن الحي..... 9

II. 1 .2. 1. المصدر الداخلي للجذور الحرة..... 9

II. 1 .2. 1. المصدر الخارجي للجذور الحرة 9

II.3.1. أنواع الجذور الحرة 9

II.1.3.1. الجذور الحرة النشطة 9

II.2.3.1. الجذور الحرة المستقرة..... 10

II. 2. مضادات الأكسدة 10

II. 2 .1. تعريف 10

II. 2 .2. تصنيفها حسب مصدرها..... 11
II. 3.2. آلية عمل مضادات الأكسدة 11
II.4.2. طرق دراسة الفعالية المضادة للأكسدة 12
II.2. 4. 1. اختبار FRAP الحديد ثلاثي..... 12
II.4.1. 2. اختبار DPPH..... 13

الفصل الثاث: الفاعلية ضد البكتيريا

III.1. عموميات حول البكتيريا 14
III. 1. 1. مدخل 14
III. 2.1. خصائص البكتيريا..... 14
III.2. عموميات حول السلالات البكتيرية المستعملة..... 15
III. 2. 1.بكتيريا *Escherichia coli*…… 15
III. 2. 2. بكتيريا *Staphylococcus eureus* ..…….. 15
III. 2. 3. بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 16
III. 3. طريقة تقدير الفاعلية ضد البكتيريا 17
III. 3. 1. الدراسة النوعية 17
III. 3. 2.الدراسة الكمية 17

الفصل الرابع: الأنواع النباتية المدروسة

IV. الأنواع النباتية المدروسة 18
IV.1. نبتة (Desf.) *Matricaria pubescens* 18
IV .1.1. التصنيف النظامي 18
IV 1.2. وصف النبتة 19
IV. 1.3. استعمالاتها التقليدية 19
IV. 2. نبتة (Vis.) *Brocchia cineriea* 19
IV.1.2. التصنيف النظامي 20
IV.2.2. وصف النبتة 20
IV.3.2. استعمالاتها التقليدية..... 21

الجزء العملـــــي

الفصل الأول: المواد والطرق المستعملة

.1.I.المادة النباتية 22
I .2.   طرق الاستخلاص 22
I .3.كروماتوغرافيا طبقة الرقيقةCCM.. 24
I .4.كروماتوغرافيا العمود CC.. 25
I . 5. كروماتوغرافيا الورق 26
I .6.دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة 27
I .6 .1. طريقة عمل اختبار DPPH 27
I .6 .2. طريقة عمل اختبار FRAP.. 27
I .7. دراسة الفعالية ضد البكتيريا 29

الفصل الثاني:النتائج و المناقشة

II .1. مردود الإستخلاص 30
II .2. الفصل الكروماتوغرافي.. 31
II .3. الفاعلية المضادة للأكسدة 36
II .4.الفاعلية المضادة للبكتيريا 40
الخاتمة 49
المراجع 50

مقد مـــــة عامة

طب الأعشاب طريقة قديمة لعلاج الأمراض التي تصيب الإنسان تعود المعالجة بهذه الطريقة إلى أزمنة بعيدة ضاربة في القدم، وربما صاحبت تاريخ الإنسان منذ بداية وجوده على الأرض بحيث كان الإنسان يهتدي في الخواص العلاجية للأعشاب والنباتات التي تعالج الأمراض، فالنباتات التي استعملت للتداوي أطلق عليها اسم النباتات الطبية تعددت استخداماتها فبدأت تدخل في صناعة بعض مواد التجميل والصناعات الغذائية كمواد حافظة ،مكسبات للطعم ، فاتحات للشهية وغيرها من الاستخدامات ذات الأهمية الاقتصادية الكبيرة. [1]

تحتل النباتات الطبية في الوقت الحاضر مكانة كبيرة في الإنتاج الزراعي والصناعي، وتلقى عناية بالغة في الكثير من الدول المنتجة لها. تعتبر النباتات الطبية هي المصدر الرئيسي للعقاقير النباتية أو هي مصدر المواد الفعالة التي تدخل في تحضير الدواء على شكل خلاصات (مواد فعالة أو مواد خام) لإنتاج بعض المركبات الكيميائية التي تعتبر النواة للتخليق الكيميائي في صناعة بعض المواد الدوائية مثل :مادة الكورتيزون و هرمونات الجنس.

تتميز الجزائر بتنوع مناخها وتربتها مما يؤهلها لاحتواء أقاليم نباتية متنوعة مثلا تلك التي في المناطق الجافة وشبه الجافة والتي تحتوي بالإضافة إلى ذلك على نباتات مستوطنة فأغلب هذه النباتات توجد بصورة تلقائية. هذا ما أدى بنا إلى الاهتمام ببعض هذه النباتات الطبية للمناطق الجافة المستعملة في الطب الشعبي نظرا لخصائصها العلاجية وتكلفتها المنخفضة وسهولة الحصول عليها. [2]

تحتوي هذه النباتات على العديد من المركبات الفعّالة فيتمّ الحصول عليها عن طريق استخلاصها من هذه النباتات، كما أن للنباتات الطبية أهمية اقتصادية وصيدلانية وهذا بفضل فعالتها البيولوجية ومن بين أهم المركبات الفعالة نذكر: متعددة الفينولات، الفلافونيدات التي هي معروفة على أنها مضادات للتأكسد ومثبطات للميكروبات... [3]

وفي ظل تطبيق هذه الخصائص المميزة للنبتات الطبية تم استهداف نبتتين صحراويتين طبيتين من نفس العائلة تم دراسة عنهما في مختبرنا و لمواصلة هذا البحث درسنا مستخلص BuOH لنبتتين *Matricaria pubescens* (Desf) و*Brocchia cinerea* (Vis)

وفي عملنا هذا تم فصل مجموعات من المركبات الفينولية وتقدير الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية البيولوجية لها فاقترحنا تقسيم عملنا كالأتي:

I.تجزئة مستخلص بواسطة كروماتوغرافيا العمود.

II. تحليل الكسور باستخدام كروماتوغرافيا الورق.

III .تقدير الفعالية المضادة للأكسدة باستخدام طرقتين FRAP وDPPH .

IV. تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا.

الجزء النظري

الدراسة الببليوغرافية

الفصل الأول

المركبات الفينولية المتعددة

I.1. المركبات الفينولية المتعددة (polyphénols)

I. 1.1. تعريف

هي مركبات موجودة في النباتات الراقية وغير الراقية وهي من نواتج التفاعلات الحيوية وتسمى بالمركبات الحلقية المغلقة لامتلاكها حلقة البنزين وتتميز بمجموعة هيدروكسيل حرة أو مستبدلة مع مجموعات أخرى (ايثر، استر، سكر).

يشترط فيها أن تكون مشتقات غير ازوتية حيث يتم تكوين الحلقة أو الحلقات من أيض حمض الشيكميك (acide Shikimique) أو متعدد الاسيتات (polyacétates).[4،1]

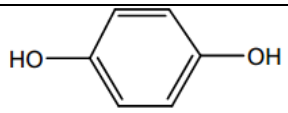
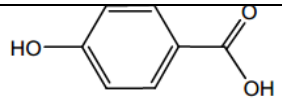
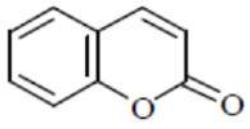
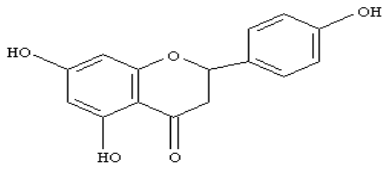
I.2.1. أقسام الفينولية المتعددة

يمكن تقسيم مركبات الفينولية المتعددة الطبيعية تبعا لتواجدها وتعقيداتها وحسب (Harborne / Simmonds) صنّفت الى ثلاث مجموعات :

- ✓ المركبات الفينولية قليلة الانتشار
- ✓ المركبات الفينولية واسعة الانتشار
- ✓ المركبات الفينولية في صورة عديدة الجزيئة (polymères) [5]

تصنف مركبات الفينولية المتعددة أيضا على أساس عدد ذرات الكربون المكوّنة لها، حيث نذكر بعض فئاتها في الجدول (1). [6،7]

الجدول (1): أمثلة عن بعض أقسام المركبات الفينولية المتعددة

عدد الكربون	الصنف	الهيكل الأساسي	مصدر طبيعي
C_6	الفينولات البسيطة		العنب
C_6-C_1	الأحماض الفينولية		الفرولة– التوابل
C_6-C_3	الكومارينات		الجزر– الكزبرة
C_6-C_3-C_6	الفلافونيدات		العنب

3.1. I.مصدر الفينولية المتعددة

توجد المركبات الفينولية في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي وتحديدا الفواكه، حيث يمكن أن تصل إلى ما بين mg/g 500–100 في بعض الفواكه مثل التفاح العنب الكرز والمشروبات (القهوة وشاي...). بينما توجد بصورة أقل في الخضر والحبوب حيث تحتوي بعض الخضر على ما يقارب 100-25 mg/g [8]

4.1.I. الفعالية البيولوجية لمتعددة الفينولات

المركبات الفينولية تمتلك خصائص مضادات الأكسدة فهي قادرة على اقتناص الجذور الحرة كما تعمل على تعزيز الدفاع الذاتي ضد التوتر التأكسدي، تتميز أيضا بقدرتها على خفض نسبة الأيونات المعدنية و لها خصائص: النشاط المضاد للالتهاب، المضاد للفيروسات، المضاد للحساسية ...الخ

[9].وللمركبات الفينولية فاعلية ضد الخلايا السرطانية مثل: سرطان الغدة اللبنية الفأري AMN3 وسرطان عنق الرحم HELA [10،11].

I.1 .5. أهميتها لدى النبات

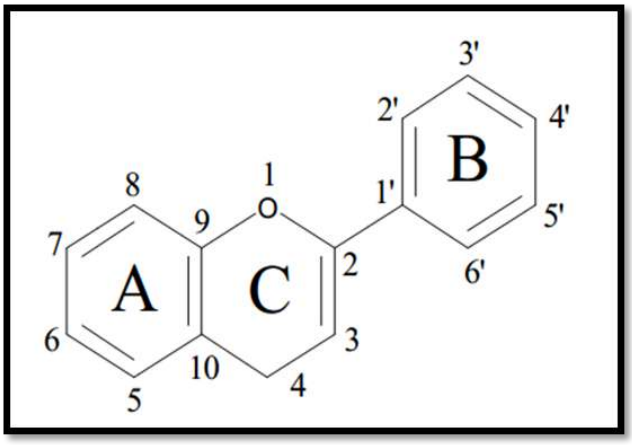
- تعطي بعض الأزهار ألوان زاهية تؤدي إلى جذب الحشرات وحدوث التلقيح.
- تقوم بدور العامل مضاد للأكسدة حيث تعرقل أكسدة الكلوروفيل أو الهرمونات.
- تقوم بدور الإذابة لبعض المواد الحيوية .
- تقوم بدور التثبيت لبعض المواد الحيوية .
- تتدخل في عملية الأكسدة والتنفس.
- تلعب دور مهم في مقاومة الأمراض في بعض النباتات مثل: من عمر ضد التبقع الفطري في البصل ومنع نمو الفطر. [12]

I.2.الفلافونيدات

I. 2 .1. تعريف

مصطلح (Flavonoïde) مشتق من الكلمة اليونانية (Flavus) وتعني اصفر [13] وهي عبارة عن صبغات نباتية موزعة في جميع اجزاء النبات وبشكل أكبر في الجزء الهوائي منه [14]. الفلافونيدات تمثل غالبا المركبات المسؤولة عن اللون الأصفر المميز للأزهار والثمار وأحيانا الأوراق. [4]

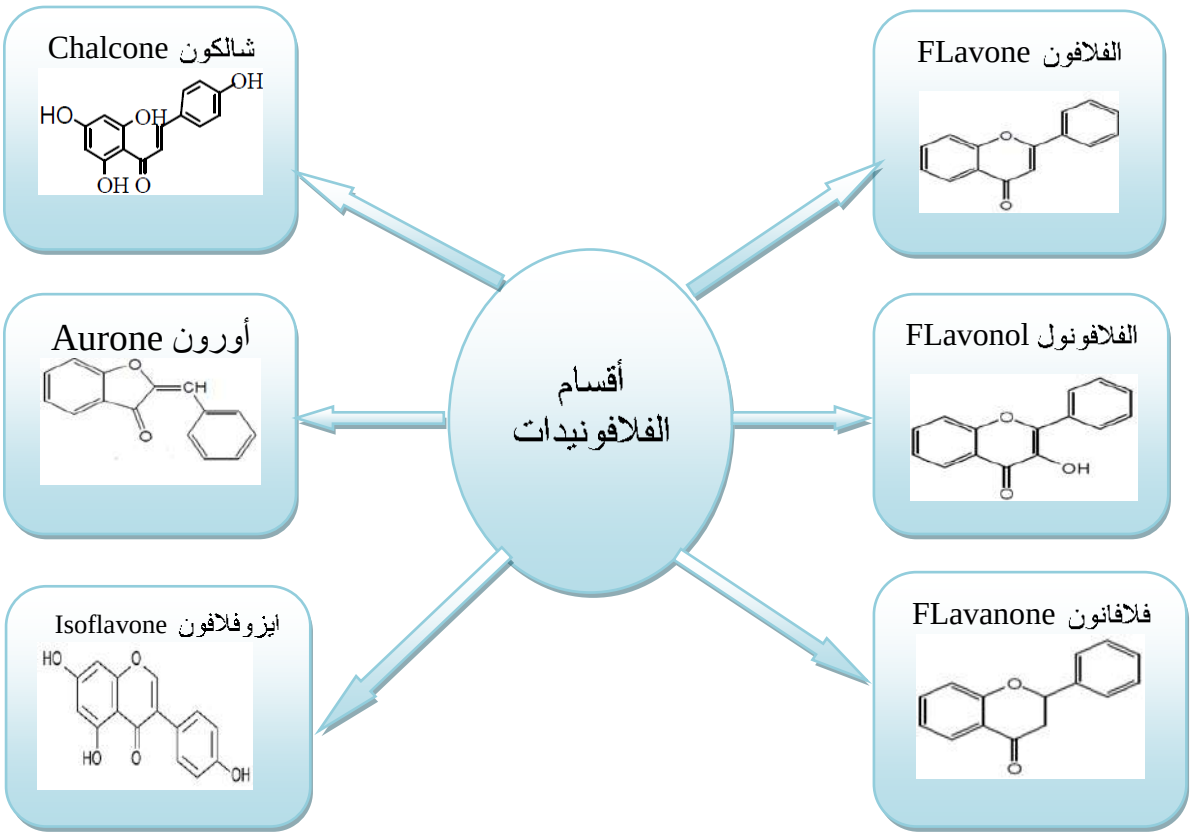
تمثل الفلافونيدات أحد الأقسام الكبرى من منتوجات الايض الثانوي والمنتمية الى عائلة متعدد الفينول [51] حيث تحتوي جميع الفلافونيدات على15 ذرة كربون في هيكلها الأساسي موزعة على ثلاثة حلقات (C/ B /A) المميزة بالبنية C_6-C_3-C_6 ; وأما الحلقة C فقد تكون مفتوحة أو مغلقة كما هو موضح في الشكل (1). [13]



الشكل (1): الهيكل العام للفلافونيدات.

I. 2.2. بعض أقسام الفلافونيدات

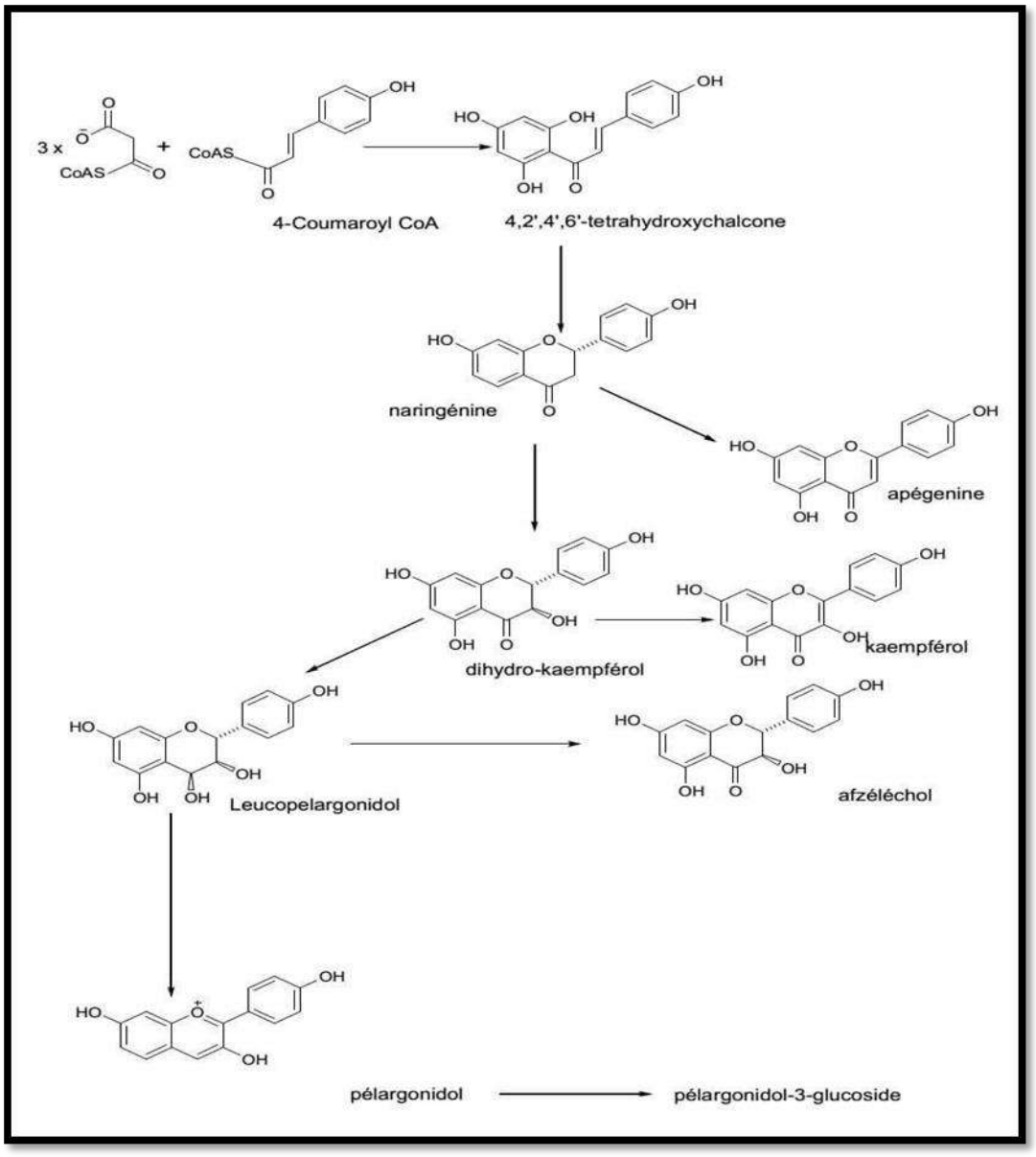
تنقسم الفلافونيدات حسب بنيتها إلى عدة أقسام وذلك تبعا لعدد وموضع وطبيعة المستبدلات التي تكون غالبا عبارة عن مجموعات ميثوكسيل أو جليكوزيد كما هو ملخص في الشكل (2) [16،17،18].



الشكل(2): بعض أقسام الفلافونيدات

I. 3.2.3. الاصطناع الحيوي لبعض الفلافونيدات:

المركبات الفلافونيدية يتم بناؤها إنطلاقا من تشكيل هيكلها الأساسي بدءا بتشكيل الحلقة العطرية (A) من تثبيت ثلاث وحدات من (malonyl-CoA) على حمض بارا كوماريك Acide p- coumarique. أما الحلقة (B) والحلقة غير المتجانسة البيرونية C_3-C_6 فيتم تشكيلهما إنطلاقا من مشتقات حمضية كما موضح في الشكل (34) [16،19]



الشكل (3): مخطط الاصطناع الحيوي لبعض أنواع الفلافونيدات. [16]

I.4.2. خواص الفلافونيدات

لقد تمت دراسة الخواص الفيزيوكيميائية و الخواص البيولوجية للفلافونيدات بشكل واسع ،حيث أثبتت تجارب عديدة ومكثفة أن الفلافونيدات تعتبر مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة تذوب في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم. أما تلك التي تحمل عدد اكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو التي تحتوي على جريئات السكر تتميز بالصفة القطبية و عليه فهي تذوب في المذيبات القطبية مثل الماء، الميثانول، الايثانول .أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل الإيزوفلافونات و الفلافانونات التي تحمل عدد كبير من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلوروفورم و الإيثر.

معظم الفلافونيدات يتم تأينها في ظروف قاعدية قوية [20]. كما لها فاعلية بيولوجية مثل الخاصية المضادة للأكسدة، والفعالية ضد الخلايا السرطانية والفعالية المضادة للبكتيريا ...الخ.

تعد الفلافونات مصدر المعالجة العديد من الأمراض مثل: أمراض الأوعية الدموية والقلبية وبعض أنواع السرطان من خلال عملها كمضادات للأكسدة. تمتلك الفلافونات القدرة على حماية الأنظمة الحيوية من خلال قدرتها على نقل الكترونات الجذور الحرة والتفاعل مع المعادن وتنشيط الأنزيمات المضادة للأكسدة .وقد أجريت دراسات للفلافونات مختلفة لتحديد قابليتها على منع حدوث السرطان المستحث أو علاج هو لوحظ بأنها تمتلك فعالية في تثبيطه.(*in vitro*) [21]

الفصل الثاني

دراسة الفعالية المضادة للأكسدة

II.الجذور الحرة ومضادات الاكسدة

II. 1. الجذور الحرة

II. 1. 1. تعريف الجذور الحرة

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذريةٌ أو جزيئية، تمتلك إلكترونا حرا في مدار التكافؤ و هو السبب في شدة فاعلية هذه الوحدات الكيميائية وفي الواقع تتكون من مجموعة من الشظايا الجزئيةٌ غير قادرة على وجود مستقبل، تتفاعل مع الجزيئات في معظم المناطق المجاورة لها وهذا يشّمل بروتينات، كربوهيدرات، دهون وADN وتتكون هذه الأصناف خاصة في التفاعلات المتعاقبة وبعض التفاعلات الأخرى مثل البلمرة .[22]

II. 2.1. مصدرها داخل جسم الكائن الحي

في الواقع الحياة الخلوية عبارة عن مصدر مستمر لإنتاج مختلف أنواع الجذور الحرة، حيث تكون المركبات الخلوية الأساسية مستهدفة باستمرار من طرف هذه الجذور الحرة، منها المرتبطة بعوامل داخلية ومنها خارجية المنشأ.

II. 2.1. 1. المصدر الداخلي للجذور الحرة

إن نشاط وحركية انتقال الإلكترونات يعتبر من أساسيات توليد الطاقة في التفاعلات الحيوية كالفسفرة التأكسدية على مستوى الميتوكوندري عن طريق إختزال الأوكسيجين الجزيئي خلال التنفس الخلوي، وتشكيل الـــ ATP على مستوى الميتوكوندري ، حيث يمكن أن يؤدي التسرب في الإلكترونات خلال تفاعلات نقلها إلى أكسدة الأكسجين الجزيئي.

II. 2.1. 1. المصدر الخارجي للجذور الحرة

يمكن أن تنتج الجذور الحرة النشطة عند التعرض لمختلف العوامل البيئية الفيزيائية والكيميائية منها: الإشعاعات فوق البنفسجية وتحت الحمراء، الحرارة والتدخين... [1, 23]

II.3.1. أنواع الجذور الحرة

II.1.3.1. الجذور الحرة النشطة

من المعروف أن أنواع الأوكسجين النشطة هي المادة المؤكسدة الرئيسية والهادمة للخلايا والأنسجة الحية تحت ظروف الإجهاد. وهذه الأنواع الأوكسجينية هي موضحة في الجدول (2).

الجدول (2): أمثلة عن بعض الجذورالأكسيجينية الحرة النشطة

جذور	الصيغة
جذر أنيون فوق أكسيد	$O^{\cdot}_2$
جذر هيدروكسيلي	$OH^{\cdot}$
جذر البروكسيل	$ROO^{\cdot}$
جذر الكوكسيل	$RO^{\cdot}$

هذه المواد الأوكسيجينية نشطة وخاصة $O^{\cdot}_2$ و $HO^{\cdot}$مواد مؤكسدة قوية جدا وتقوم سريعا بمهاجمة الجزيئات البيولوجية. [24، 25]

II.2.3.1. الجذور الحرة المستقرة

هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو الساعات أو حتى بالأيام مثل جذر ثلاثي فينيل مثيل (MTP3)، جذر ثلاثي فينيل بكريل هايدرازيل (DPPH)، نستطيع القول أن معظم الجذور الأروماتية التي تشتمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها تكون مستقرة في أغلب الأحيان، فكلما زاد ثبات الجذر الحر قلت فعاليته من الناحية الديناميكية– الحرارية، فإن قلة فعاليته تعود إلى أنه يحتاج طاقة تنشيط عالية نسبيا أثناء التفاعل. ولذلك فإن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة مهمة جدا لصحة وحياة الكائن الحي. [26]

II.2. مضادات الأكسدة

II.2.1. تعريف

مضادات الأكسدة هي مجموعة من العناصر والمركبات لها القدرة على منع أو إبطاء عملية الأكسدة بهدف حماية المركبات الأخرى.

توجد مضادات الأكسدة على شكل منتجات الأيض الثانوي كما توجد بصورة طبيعية في الخضراوات والفواكه والحبوب ومعظم الأعشاب الطبية، ولذا زاد الاهتمام بمضادات الأكسدة في السنوات الأخيرة بسبب قدرتها

على تحصين الجسم كما تقي الجسم من أمراض العصر الشائعة وتتعدد وظائف مضادات الأكسدة لتغطي معظم حاجات الإنسان من الوقاية كما تثبط عمل الجذور الحرة. [25]

II. 2. 2. تصنيفها

تصنف مضادات الأكسدة حسب آلية تفاعلها إلى:

- مضادات أكسدة أولية
- مضادات أكسدة ثانوية

وحسب مصدرها إلى أربع انواع:

- مضادات الأكسدة الذاتية
- مضادات الأكسدة الطبيعية
- مضادات الأكسدة الصناعية
- مزائج مضادات الأكسدة

II. 3. 2. آلية عمل مضادات الأكسدة

تعمل مضادات الأكسدة الأولية على إعاقة وقطع تفاعلات انتشار السلسلة وبالتالي تبطئ عملية الأكسدة لتعود فتتسارع عند نفاذه. وتعد متعددة الفينولات من أهم مضادات الأكسدة خاصة تلك التي تحمل زمرتي هيدروكسيل أو زمرة هيدروكسيل ومستبدل في المواقع أورتو أو بارا وهي فعالة بالتراكيز المنخفضة وبالدسم الحيوانية أكثر من الدسم النباتية.

$$RH + R'^{\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + R'H$$

$$R'^{\cdot} + O_2 \longrightarrow R'OO^{\cdot}$$

$$ROOH \longrightarrow R'OO^{\cdot} + H^{+}$$

$$ROOH \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{-}$$

$$2ROOH \longrightarrow RO^{\cdot} + ROO^{\cdot} + H_2O$$

$$R'OO^{\cdot} + RH \longrightarrow R'OOH + R^{\cdot}$$

يحدث التأكسد بسرعة عالية وبطاقة تنشيط منخفضة جدا ولذلك يكون تركيز جذور الألكيل بيروكسي $ROO^{\cdot}$ أعلى بكثير من جذور الألكيل R وذلك في جميع المنظومات الغذائية الحاوية على الأوكسجين.

تقوم المركبات الفينولية بدور المستقبلات للجذور الحرة المتشكلة في مرحلة البدء وذلك من خلال التنازل عن H ليشكل جذر الفينوكسيل المستقر بسبب صيغه الحدية.

تسلك آلية التأكسد آلية جذرية، تتفاعل مضادات الأكسدة الفينولية مع الهيدروبيروكسيدات ويجب الأخذ بعين الإعتبار إمكانية تشكل الجذور الحرة بالتفاعلات المحفزة ضوئيا أو إنزيميا أو بوجود معادن، كما تزيد الرطوبة، الحرارة، الضوء وزيادة عدم الإشباع سرعة التأكسد. [27]

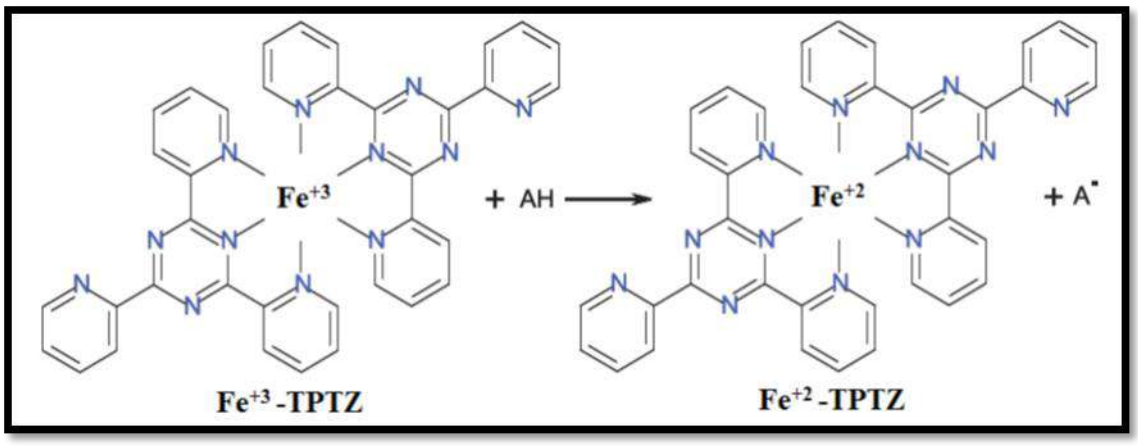
2.II .4.طرق دراسة الفعالية المضادة للأكسدة

هي قياس قدرة المستخلص أو المركب على تثبيط الجذور الحرة أو إيقاف عملية الأكسدة وتقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق منها: اختبارFRAP، اختبارDPPH .

2.II .4. 1.اختبار ثلاثي الحديد FRAP

يعتبر اختبار إرجاع أيونات الحديديك مباشرا وسريعا، وهو يستعمل أساسا لقياس مدى قدرة مضادات الأكسدة غير الإنزيمية ويستعمل هذا الاختبار لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات المدروسة في وسط حمضي يعتمد على الإرجاع والذي يعطي في وجود الحديد الثلاثي لون أزرق فاتح، يمكن قياس الامتصاصية ب جهازUV-Visعند طول موجة 593nm.

[28,26]

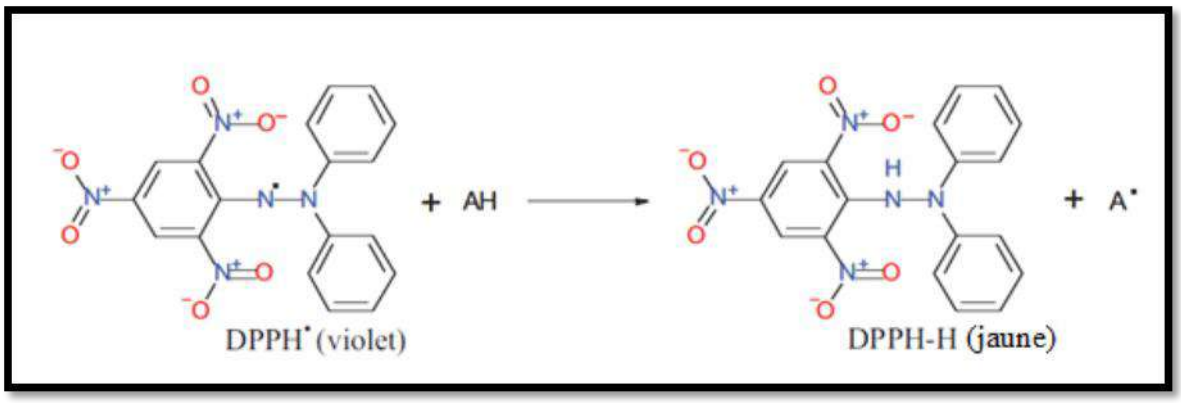


الشكل (4): إرجاع المعقد Fe^{+3}-TPTZ إلى Fe^{+2}-TPTZ بمضاد للأكسدة

2.II .4. 2. اختبار DPPH

يعد هذا الاختبار من أهم وأكثر الإختبارات إستخداما، ويحدد قدرة مضادات الأكسدة على تثبيط الجذور الحرة. ثنائي بكريلهايدرازيل (diphenylpirylhydrazyl: $DPPH^{\cdot}$) هي مادة صلبة لونها بنفسجي مسود. يشتق هذا الجذر الحر من جزيئة DPPH-H ثنائي فنيل بكريل هايدرازيل diphenylpcryhydrazin وهي مادة صلبة لونها اصفر.

ويعتمد مبدأ هذا التفاعل على التغير اللوني للجذر الكاشف ال $DPPH^{\cdot}$ من اللون البنفسجي الداكن إلى اللون الأصفر الفاتح ويستخدم لهذا الغرض مطيافية UV-Vis وتقاس الامتصاصية عند 517 و التفاعل موضح في الشكل (5) [1،29]



الشكل (5): معادلة تثبيط جذرDPPH في وجود مضادات الجذور الحرة.

الفصل الثالث

الفعالية المضادة للبكتيريا

III. الفاعلية ضد البكتيريا

III.1. عموميات حول البكتيريا

III. 1.1. مدخل

إن كلمة ميكروب تستعمل لوصف الكائنات الدقيقة(microorganismes) التي لا يمكن ملاحظة بذيتها إلا بواسطة المجهر و هي تشمل الفيروسات،البكتيريا،الفطريات وبعض الطحالب.

في سنة 1859 تمكن الكيميائي الفرنسي باستورمن التعرف على هذه الكائنات والتأكيد على ماهيتها، حيث اكتشف البكتيريا الهوائية واللاهوائية من خلال تجاربه على التخمر، واكتشف أيضا طعومها وارتبط اسمها بعملية البسترة لقتل الكائنات الحية المجهرية المتواجدة في السوائل وقد أثبت أيضا أن البكتيريا كائن حي والكائن الحي لا يتولد إلا من كائن حي آخر.

أما العالم الألماني روبرت كوخ فقد ساهم في اكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض، حيث ارتبط اسم البكتيريا بكثير من الأمراض التي تسببها، لكن الاكتشافات الحديثة والتقدم السريع الذي حدث في العلوم التطبيقية أظهرت أن البكتيريا تلعب دورا هاما في كثير من الصناعات الغذائية والدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية وكذلك معالجة المياه العتمة والمعالجة الحيوية لمخلفات المزارع ولها استخدامات في إنتاج الطاقة وغاز الميثان. [30]

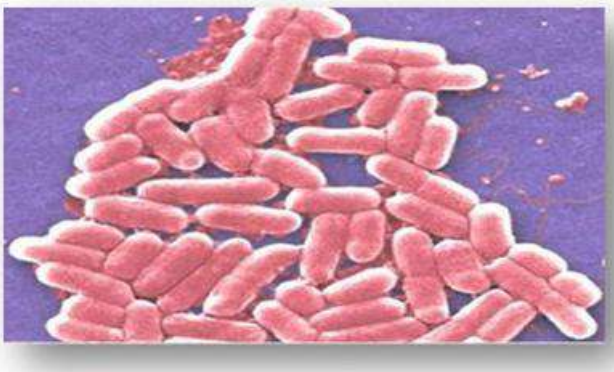
III. 2.1. خصائص البكتيريا

البكتيريا كائنات دقيقة مجهرية بدائية النوى، تتميز البكتيريا ببساطة التركيب إذ تتركب من جدار وغشائين خلويين يحيطان بالسيتوبلازم، والبكتيريا كائنات دقيقة الحجم يتراوح حجمها بين 0.3 – 2 ميكرون، تحتوي خلية البكتيريا على غلاف قاس متماسك ومتمم للبكتيريا وهو المسؤول عن حماية شكل الخلية وهناك أنواع أخرى تحتوي على حافظة خارجية حول الغلاف تدعى Capsule، أمّا درجة الحرارة المناسبة لنمو البكتيريا تتراوح بين 45-37°C بحيث يمكنها التكاثر خلال مدة وجيزة إلى أعداد كبيرة. [31]

III.2. تعريف البكتيريا المستعملة

III. 2. 1. بكتيريا *Escherichia coli*

هي بكتيريا عصوية، سالبة الغرام قولونية إختيارية التهوئة، تندرج ضمن عائلة الأمعائيات، ذات أبعاد من 1 إلى 3 ميكرومتر، توجد عادة في أمعاء الثدييات، وبعض السلالات أكثر ضررا فمنها تسبب الالتهابات المعوية، والتهابات الأعضاء التناسلية أو البولية وكذا الإسهال الحاد القاتل. تتكاثر بسرعة كبيرة للغاية عند درجة حرارة الجسم37C°، تشكل سلاسل وتتحرك بواسطة الأسواط.[32]



الشكل (6) : صورة مجهرية للبكتيريا*Escherichia coli*

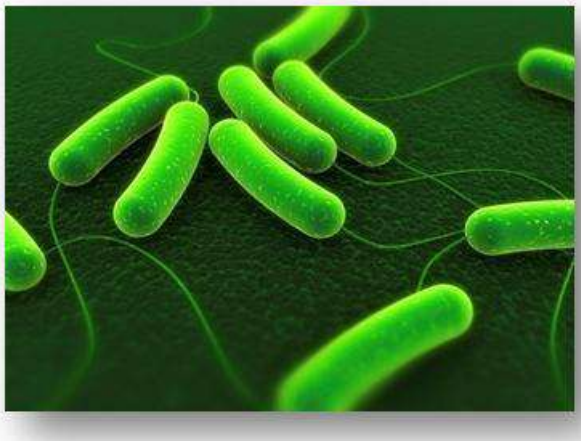
III. 2. 2. بكتيريا: *Staphylococcus eureus*

المكورات العنقودية الذهبية هي نوع من البكتيريا إيجابية الغرام تنتمي إلى جنس المكورات العنقودية،سميت بذلك لأنها تبدو وكأنها قذيفة ،ترتبط في مجموعات على شكل عنقود العنب قطرها حوالي1 ميكرومتر،غير متحركة، لاهوائية اختيارية تعد من البكتيريا المسببة للأمراض للإنسان .إذ يمكن أن تسبب التهابات الجلد أوالتهاب الأذن الوسطى،كما يمكن أن تؤدي إلى تسمم الدم،وهي أيضا مسؤولة عن عدوى المستشفيات ،والتسمم الغذائي.[33]

الشكل (7): صورة مجهرية للبكتيريا *Staphylococcus eureus*

III. 2. 3.بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

هي بكتيريا سالبة الغرام تنتمي لجنس الزائفة عصوية الشكل لها سوط قطبي واحد يجعلها قادرة على الحركة، هوائية اختيارية. تتواجد هذه البكتيريا في التربة والمياه والنباتات والجلد هي من مسببات الأمراض الانتهازية لدى الإنسان والنباتات [34]



الشكل (8): صورة مجهرية للبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

III. 3. طريقة تقدير الفاعلية ضد البكتيريا

يتم تقييم الفاعلية ضد البكتيريا لأي مادة طبيعية أو كيميائية على الأحياء الدقيقة بنوعين من الدراسة، نوعية وكمية.

III. 3. 1. الدراسة النوعية

تتمثل في حساسية الكائن الدقيق للمادة المضادة له ولهذا الغرض تستعمل العديد من الطرق أهمها التي تعتمد على انتشار المادة المختبرة داخل وسط الزرع الصلب والطريقة المستعملة بشكل واسع في ذلك هي طريقة الأقراص المنتشرة.

III. 3. 2.الدراسة الكمية

هي تقدير التركيز الأدنى المثبط CMI للمادة المختبرة ويعرف على انه أصغر تركيز من المادة المختبرة الذي يثبط كل نمو للكائن الدقيق. [32]

الفصل الرابع

الأنواع النباتية المدروسة

IV. الأنواع النباتية المدروسة

Matricaria pubescens (Desf.) و *Brocchia cinerea* (Vis.)

نبتتان بريتان غير سامتان تتواجدان في صحراء المغرب، الجزائر، تونس وليبيا تنتميان إلى نفس العائلة Asteraceae. يستخدم سكان المنطقة هاتين النبتتين في الطب التقليدي والغذاء. [35]

IV.1. نبتة *Matricaria pubescens* (Desf.)

هذا النوع ينتمي إلى عائلة Asteraceae لها عدة أسماء من منطقة إلى أخرى تسمى (القرطوفة) في ورقلة وواد سوف، (ايناسنين) في منطقة الطاسيلي، (الوزوازة) و (القرطوفة خضراء) في منطقة بشار. [35،36]

IV .1.1. التصنيف النظامي [36،37]

المملكة	Plante
الشعبة	Angiospermes
تحت الشعبة	Angiospermes
القسم	Dicotylédones
تحت القسم	Gamopétales
الرتبة	Astérales
العائلة	Asteraceae
الجنس	Matricaria
النوع	*Matricaria pubescens* (Desf.)

IV 2.1. وصف النبتة

الشكل (9): صورة للنبتة *Matricaria pubescens* (Desf.)

هي نبات سنوي لا تدوم طويلا مرحلة إزهاره في مارس وفبراير، نادرا ما يتجاوز طولها 20سم تتميز بأوراق صغيرة خضراء داكنة وخشنة لها ازهار كروية الشكل صفراء زاهية يتروح قطرها 5-8 mm . [35،36]

IV. 3.1. إستعمالاتها التقليدية

تستخدم هذه النبتة في منطقة واد ريغ ضد الحمى وألام البطن، وضد لدغ العقارب والثعابين وتستخدم كذلك كبهار في الأطعمة. [36،38]

IV. 2. نبتة *Brocchia cinerea* (Vis.)

هذا النوع شائع في منطقة ورقلة وفي مناطق الصحراء في شمال افريقيا ومعروفة بتطبيقاتها العلاجية والغذائية التقليدية، يطلق عليها في بعض المناطق اسم الشيحية. [17]

1.2.IV. التصنيف النظامي : [35،36،17]

المملكة	Plante
الشعبة	Spermaphyte
تحت الشعبة	Angiospermes
القسم	Dicotylédones
تحت القسم	Astéridées
الرتبة	Astérals
العائلة	Asteraceae
الجنس	*Brocchia*
النوع	*Brocchia cinerea* (Vis.)

2.2.IV.وصف النبتة

الشكل (10): صورة للنبتة *Brocchia cinerea* (Vis.)

ينمو هدا النبات في الظروف الصحراوية يقاوم الجفاف، وهو نبات عشبي يتميز بأوراق مبيضة صوفية سميكة تقسم من 3 الي 4 فصوص يتراوح طول سيقانها من 10 الي 40 سم ورؤوس أزهارها قطرها 10-6 mm وهي سمراء في البداية وصفراء عند النضج [35.36]

3.2.IV. إستعمالاتها التقليدية

هي نبتة طبية محلية تضاف إلى الشاي للرائحة وتستعمل ضد الصداع ولمعالجة إضطرابات الجهاز الهضمي (الإسهال. عسر الهضم) وكذالك لمعالجة السعال [36،38]

IV. 3. بعض دراسات السابقة حول النبتتين

النبتة (Desf.) *Matricaria pubescens*

تحتوي هذه النبتة Mp على العديد من المركبات منها benzoyle، cinnamoyle [39] ويتكون زيتها العطري أساسا من herniarine بنسبة (16.92%) [35]، وبفضل هذه المركبات هذه النبتة لديها نشاط مضاد للأكسدة وقد أثبت من خلال دراسات سابقة للنشاط المضاد للأكسدة من خلال نتائج اختبار DPPHلمستخلص AcOEt أعطى نسبة (53.29%) ونسبة (90%) للمستخلصين البتانولي و خلات الإيثيل ، وأما إختبارFRAP لمستخلص AcOEt أعطى قيمة مهمة، وأثبت أن مستخلص الميثانول اقل من فاعلية خلات الايثيل.[39]

وتمتلك هذه النبتة أهمية بيولوجية حيث لديها نشاط ضد بعض السلالات البكتيرية لمستخلصاتها وزيوتها، ويمكن استعمال زيتها العطري كمادة حافظة للتمور والزبدة .[37]

النبتة (Vis.) *Brocchia cinerea*

تحتوي النبتة Bc على عدة مركبات و تتموضع هذه الأخيرة في الأوراق و الجذور و أكثر المركبات وفرة هي الفلافونيدات .وكذا غنية بالتربينات مثل thujone بنسبة % 55.4[17 .35] وهذا ما جعلها تكتسب نشاط مضاد للأكسدة مهمة وذلك من خلال نتائج الإختبارات المضادة للأكسدة التي أجريت سابقا مثل إختبار DPPHلمستخلصات البتانولية و خلات الاثيل [35] بالإضافة لمستخلص AcOEt الذي قدّر نشاطه ب 16.1%. [40]

ومن الناحية البيولوجية لها نشاط ضد البكتيريا، وتتميز بخصائص ضد السمية حيث يساهم المستخلص الميثانولي لنبتة في انخفاض تراكيز المعايير الدهنية [41.17]

الجزء العملي

الفصل الأول

المواد والطرق المستعملة

I. المواد و الطرق المستعملة

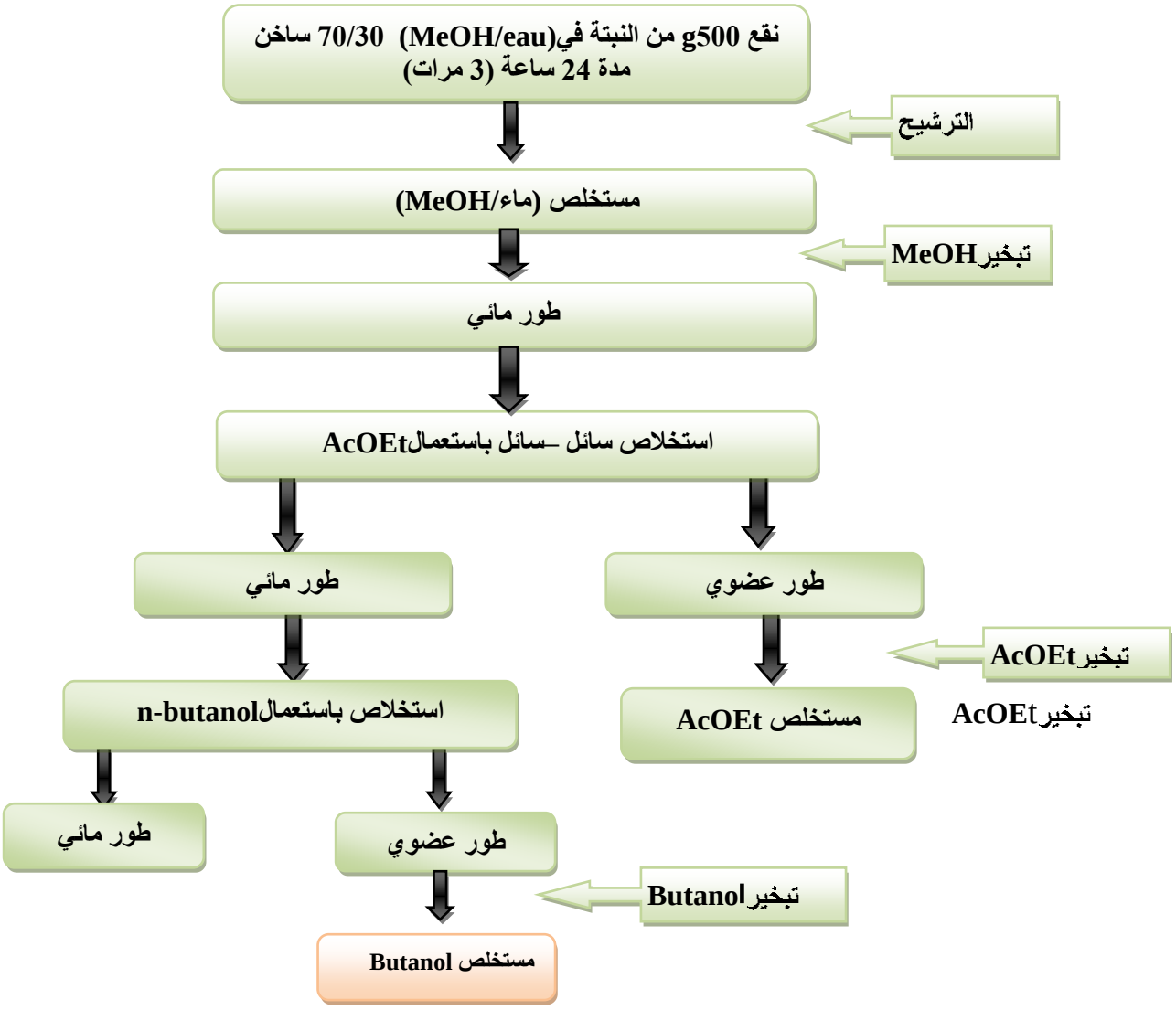
I .1. المادة النباتية

تم جني النبتتين خلال فصل الربيع في مرحلة الإزهار، الأولى *M.pubescens* من سطيل بضواحي مدينة بسكرة، والثانية *B.cinerea* من شمال شرق مدينة ورقلة.

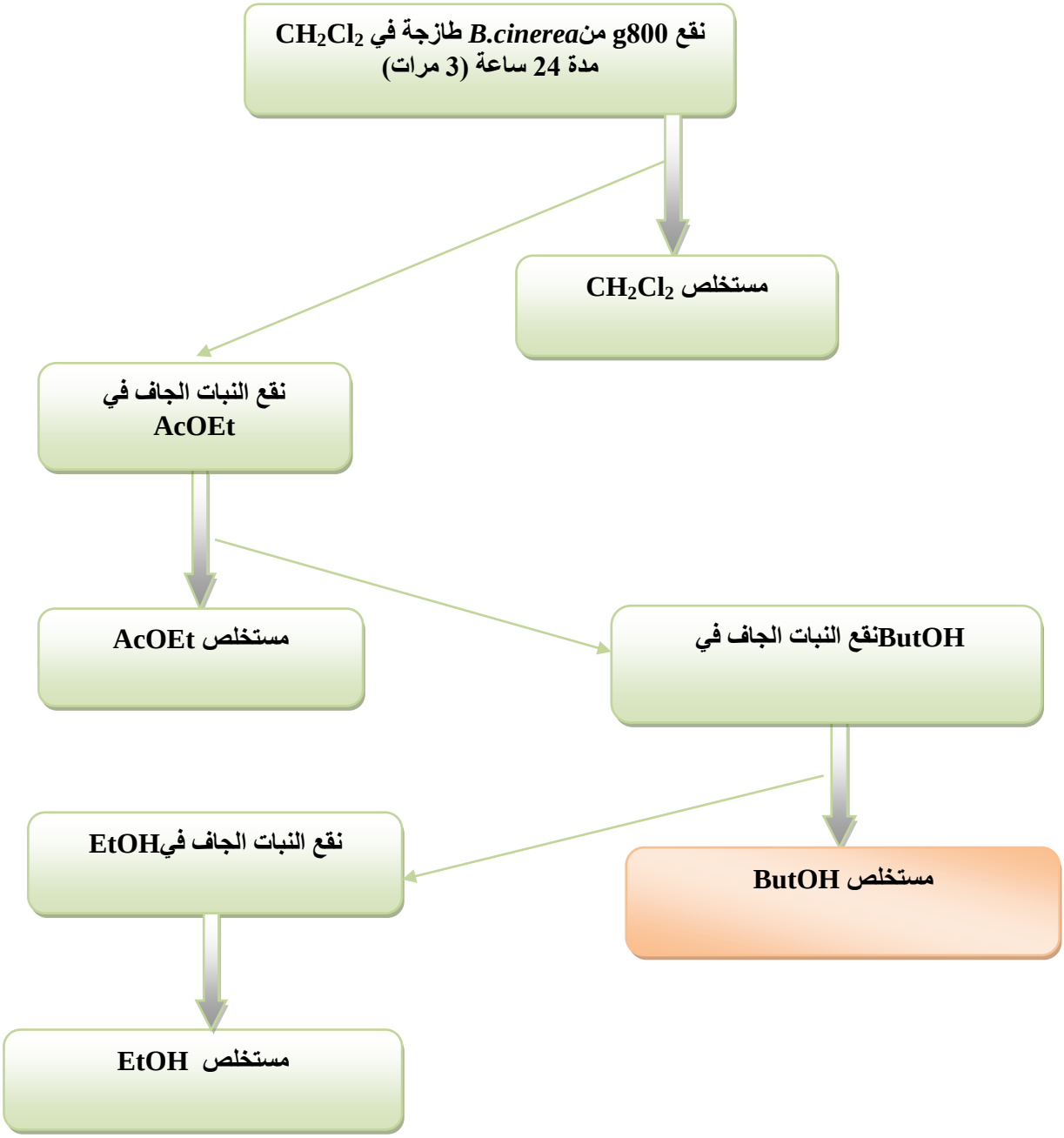
تم تجفيف النبتة *M.pubescens* في الظل في وجود التهوئة ثم تمّ سحقها، أما *B.cinerea*فبعد قطفها تم تقطيعها إلى قطع جد صغيرة ثمّ استعملت مباشرة.

I .2. طرق الإستخلاص:

تم تحضير مستخلص البيوتانول لكل من النبتتين *M.pubescens*و *B.cinerea* بطريقتي إستخلاص مختلفتين حسب الدراسة [41] و الموضحة في الشكلين 11و12على التوالي



الشكل 11: مخطط تحضير المستخلصات الخام *M.pubescens*



الشكل12: مخطط تحضير المستخلصات الخام من النبتة *B.cinerea*

I .3. كروماتوغرافيا طبقة الرقيقة CCM

تمّ استعمال هذه الطريقة من أجل:

- التعرف على التركيبة الكيميائية للعينة.
- التعرف على تركيبة الطور المتحرك الواجب استعمالها للفصل بواسطة CC.

[42]

I .3. 1. طريقة العمل

: لتحقيق هذا الجزء من العمل استعملنا :

- طور ثابت:gel de silice

طور متحرك: تمّ اختبار عدة أنظمة من المذيبات العضوية، فنذكر على سبيل المثال:

الجدول (3): أنظمة الطور المتحرك المستعملة

النظام	EtOH/Etp	$EtOH/CH_2Cl_2$	acétone/Etp	EtOH/AcOEt	EtOH /acéton	Eau/ EtOH
النسبة	50/50	50/50	75/25	50/50	50/50	50/50
	70/30	70/30	50/50	70/30	3070	--

في نهاية الاختبار تعرض طبقة CCMإلي مصباح UV-Vis تحت طول الموجي 365nm و 254nm وتوضح البقع باستخدام بخار NH_3بالإضافة إلى إظهارها تحت مصباح UV تحت طول الموجي 365nmو 254nm.

من خلال نتائجCCM الجدول (3) اختير النظام المكوّن من $EtOH/CH_2Cl_2$ لتجزئة مستخلصي البيوتانول للنبتتين.

الجدول (4):نتائجCCM للأنظمة المختارة

M.P	B.C
بخارNH_3+ مصباح UV-Vis $EtOH/CH_2Cl$	بخارNH_3+مصباحUV-Vis $EtOH/CH_2Cl$

I. 4. كروماتوغرافيا العمود CC

تستعمل تقنية كروماتوغرافيا العمود لفصل مخاليط المواد الكيميائية، فهي طريقة أساسية في الدراسة الكيميائية للنبتات فتسمح لنا بتبسيط المستخلصات الطبيعية إلى كسور.[43]

في هذه الدراسة تم استخدام flash chromatographieلتجزئة مستخلصي BuOH فقد استخدمت هذه الطريقة بتطبيق ضغط ضعيف على رأس العمود.

I .4. 1. طريقة العمل:

على ضوء نتائج CCM الاختبار، تمّ اختيار نظام CH_2Cl_2/EtOH لتجزئة g2 من مستخلص BuOH لكل واحدة من النبتتين *M.pubescens* و *B.cinerea*

بعد الانتهاء من إعداد العمود وذلك بملئه بالطور الثابت gel de silice نضع كتلة موزنة من مستخلص على رأس العمود ويتمّ التمليص باستعمال 200 مل من الطور المتحرك من النظام الذي تم تحديده CH_2Cl_2/EtOH بنسب مختفلة. ومع إضافة 200 مل H_2O/EtOH بالنسبة *B.cinerea*

- حالة*M.pubescens*:

الجدول (5): الكسور المتحصل عليها من تجزئة المستخلص البيوتانولي لنبتة *M.pubescens*

الكسور	Fm1	Fm2	Fm3	Fm4	Fm5
EtOH	%20	%40	%60	%80	%100

- حالة*B.cinerea*:

الجدول (6): الكسور المتحصل عليها من تجزئة المستخلص البيوتانولي لنبتة*B.cinerea*

الكسور	FB1	FB2	FB3	FB4	FB5	FB9
EtOH	%5	%20	%40	%60	%80	50 /50 H_2O/EtOH

I . 5. كروماتوغرافيا الورق(CP)

كروماتوغرافيا الورق هي تقنية معتمدة في المخبر من أجل فصل المخاليط المعقدة، وتستخدم هذه التقنية في حالة فصل كميات صغيرة و/أو كبيرة ويمكن التنبؤ من خلالها على أنواع الفلافونيدات [39]

I . 5. 1.طريقة العمل

في هذا العمل تستعمل CP ثنائي البعد من أجل شرح التركيبة الفلافونويدية لمختلف الكسور المتحصل عليها من المستخلصين. لهذا الغرض تم إستعمال أوراقWathman N°1 المبللة بالماء كطور ثابت بعد تجفيفها والطور المتحرك حسب:

- البعد الأول: $4/1/5BuOH/AcOH/H_2O$
- البعد الثاني: $AcOH/H_2O$ 15%

يتم الكشف عن البقع بواسطة مصباح UV تحت طول الموجي UV 254nm, 365nm وتوضيح البقع باستخدام الكاشف بخار NH_3بالإضافة إلى إظهارها تحت مصباحUV تحت طول الموجيUV 254nm , 365nm.[39]

I . 6. دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة

حاليا يتم تقيّيم النشاط المضاد للأكسدة للعيينات المدروسة بواسطة عدّة اختبارات. وقد اخترنا في هذا العمل اثنان هما: اختبارDPPH الذي يقيس قدرة المستخلص على تثبيط الجذور الحرة والثاني المسمّى اختبارFRAP والذي يقدّر قدرة العيّنة على ارجاع المعادن.

I .1.6. طريقة عمل اختبارDPPH

تم تحضير محلول DPPH بتركيز M(6.10^{-6}) المحضر في الايثانول، تقرأ إمتصاصية DPPH في غياب المستخلص ونسجّل Acont، وبعد ذلك تم أخذ 2900 µ L من محلول DPPH المحضر في الايثانول يضاف إلى 100L µ من العينة بتراكيز مختلفة وبعد حفظ المحلول مدة 30 min في الظلام نقرا الامتصاصية A_{ech} عند الطول الموجيnm 517، ويتم حساب نسبة التثبيط %IPبدلالة الامتصاصات السابقة وفق العلاقة التالية.[41]

$$\%IP = (Abs_{cont} - Abs_{Ech}) / Abs_{cont} \times 100$$

I .6. 2. طريقة عمل اختبارFRAP

حُضّر محلول FRAPإنطلاقا من المحاليل التالية: محلول موقي (PH =3.6)، محلول ثلاثي كلوريد الحديد ($FeCl_3$-$6H_2O$)، ومحلول TPTZ.

يضاف 150 µ L من العينة أو محلول حمض الأسكوربيك إلى 2850µL من محلول FRAP حديث التحضير ويحفظ الخليط في درجة حرارة 37C° في الظلام لمدة 30 min
نقرأ بمطيافية UV-Vis في طول موجي 593 nm إمتصاصية المحاليل المحضرة التي تسمح برسم المنحنى العياري الذي يستنتج منه التراكيز المكافئة من حمض الأسكوربيك لعيناتنا. [45]

I .7. دراسة الفعالية ضد الميكروبية

I .7. 1. الفعالية ضد البكتيريا طريقة العمل

حضرت أقراص بقص أوراق الترشيح رقم 3 عل يشكل أقراص ذات أقطار5 mm ثم وضعها داخل الفرن في درجة حرارة 120ºC لمدة 30min للتعقيم وحضرت محاليل المستخلصات والكسور وذلك بوزن 15mg من المستخلص أو الكسر وإذابته في 3 ملمن DMSO وحضر الوسط الزراعي (الجيلوزي المغذي)MH، بإذابته في حمام مائي ثمّ يسكب بكميات محددة في علب بيتري حوالي 18ml في كل علبة ،ثم وزعت على كامل العلبة بشكل متجانس، وبعدها تركت لتجفف ثم تقلب وتحضن مقلوبة لمدة 24h عند درجة 37C° ويتم زرع البكتيريا في علب بيتري المحضرة مسبقا ثم تقلب وتحضن مقلوبة لمدة 24h عند درجة 37C° من اجل إستعمال بكتيريا جديدة ،تتم عملية زرع البكتيريا دوما في وجود لهب موقد بنزن لتفادي انتشار البكتيريا في الجو،ويتم كذلك تحضير المعلق الميكروبي بأخذ جذمة من البكتيريا المزروعة سابقا وغمسها في أنبوب إختبار يحوي5مل من الماء الفيزيولوجي ،ثم بواسطة عود قطني تم غمره في المعلق الميكروبي تتم عملية زرع البكتيريا في علب بيتري المحضرة مسبقا بعدها نضع الأقراص المغمورة بمحلول العينة (المستخلصات و كسور المستخلصات) بعدها تترك العلب للتجفيف ثم تقلب ،في الأخير تتم عملية الحضن وذلك لتدخل علبة بيتري مقلوبة داخلا لحاضنة وتحضن مقلوبة لمد ة 24hعند درجة 37C°.[46].

I . 7. 2 تحديد التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا

تحديد التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا CMI وذلك من خلال تحضير سلسلة من التراكيز المخففة و هذا بتحضير ثلاث تمديدات من المحلول الأم ذي التركيز 5 mg/ml والتي هي على التوالي 2.5, 1.25,0.625mg/ml

تتم هذه الطريقة في وسط صلب وذلك بأخذ1 mg/ml من المحلول ووضعه في علبة بيتري و إضافة 10مل من MH المذاب وتغطية طبق بيتري وتحريك للتجانس العينة مع MH وتركها لتجف وقلب علبة بيتري وحضنها مد 24 hعند درجة 37ºC، وبعد ذلك تحضير المعلق الميكروبي ووضع 10ميكروليتر منه في العلب المحضرة مسبقا وتركها لتجف ثم قلبها وحضنها مد 24 hعند درجة 37C º .[32]

الفصل الثاني
النتائج و المناقشة

II.1مردود الاستخلاص

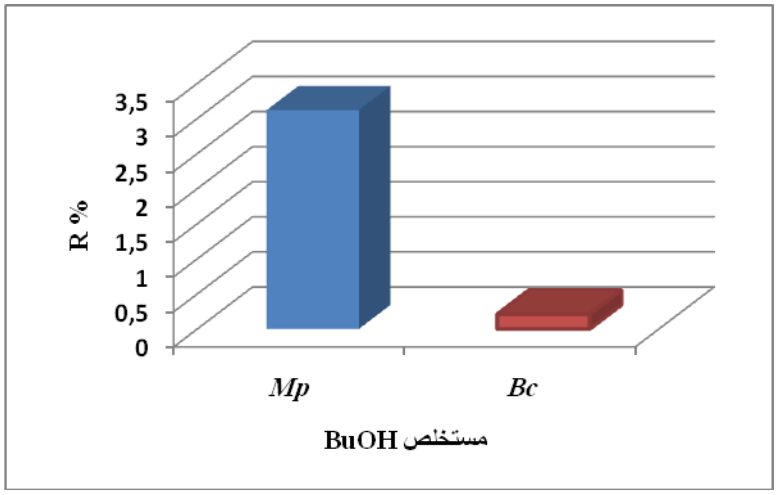
II.1.1. حالة النبتة *M. Pubescens*

من خلال الاستخلاص نبتة *M.pubescens* تم الحصول على مردود مستخلص BuOHالذي قدّر ب 3.12%وقد لوحظ أنّ لون مستخلص BuOH كان بنيا غامقا .

تم الحصول على مردود مهم في المذيب الاعلى قطبية BuOH وهذا قد يفسر وجود مركبات فينولية قطبية والتي قد تكون الجليكوزيدات الفينولية في نبتة *M. pubescens*

II.1.2. حالة النبتة *B. Cinerea*

تعرضت نبتة *B. cinerea* لسلسلة من المذيبات المتعاقبة مختلفة القطبية وقد كانت قيم المردودية متباينة. أما BuOH والذي قدر ب 0.21% أظهر قيمة ضئيلة نسبيا مقارنة بالنتيجة السابقة .

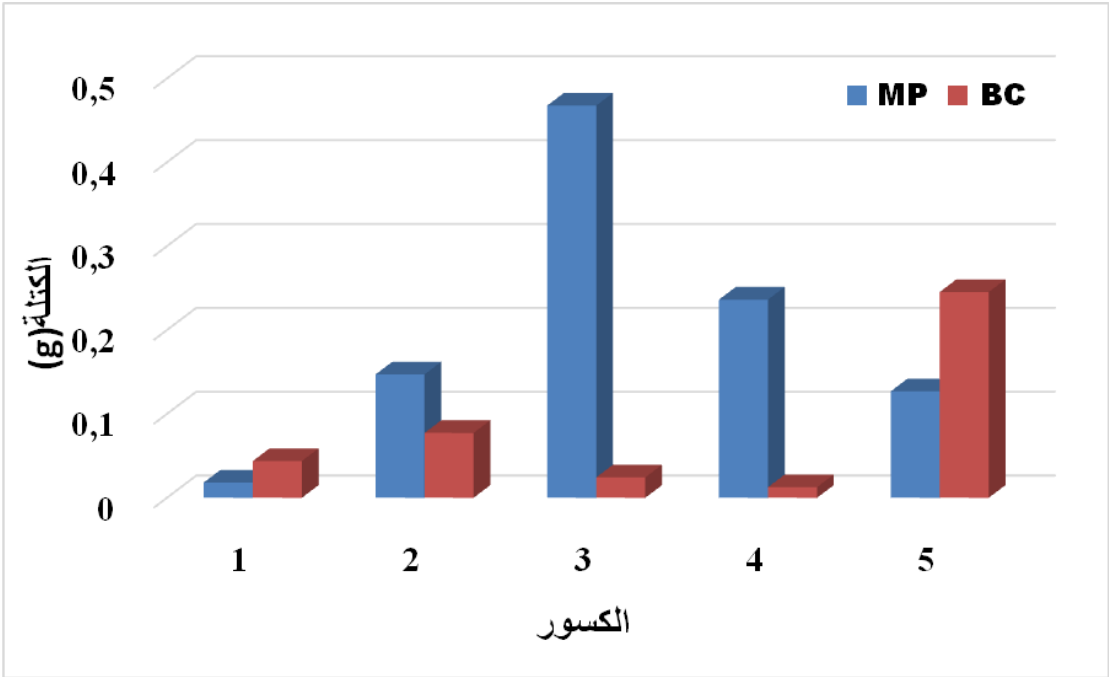


الشكل(13):رسم بياني لمردود مستخلصي BuOHالنبتتين.

II .2. الفصل الكروماتوغرافي

II.2.1.نتائج التجزئة

من خلال نتائج الإختبارات CCMالتي أجريت على مستخلصيBuOH لنبتين تم إختيار النظام CH_2Cl_2/EtOH لتجزئة كما هو موضح في الشكل (14) فقد نتج خمس كسور لكل من النبتتين.



الشكل (14): رسم بياني لكتلة كسور المستخلص البيوتانولي للنبتتين

الرسم البياني يوضح أنّ نتائج كتل الكسور ل Mpاكبر من كتل كسور Bc .

حيث أنّ مستخلص Mpأعطى قيمة مهمة في كتلة الكسر Fm3يقدر ب0.45g والكسر Fm4 أعطى0.23g

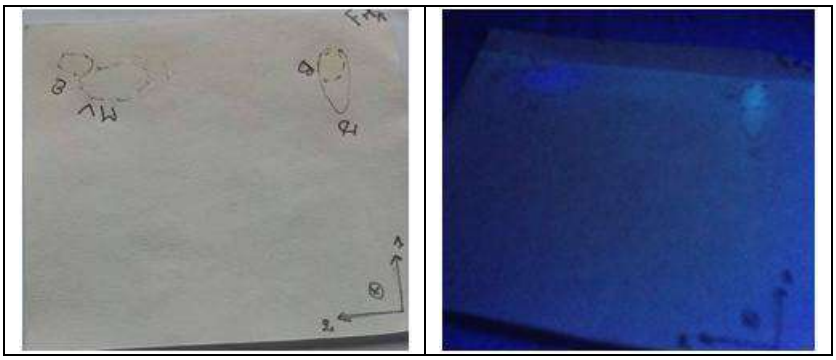
أما بالنسبة ل Bc أعطي إرتفاع في كتلة الكسر Fb5 يقدر ب 0.2g أما بقي الكسور كانت اقل من 0.08g.

2.2.II. تحليل كرومتوغرفيا CP للكسور

تم تحليل الكسور التي تحصلنا عليها من مستخلص BuOH بواسطة الكرومتوغرافيا الورق CP ثنائية البعد باستعمال الورق Wathman N°1المشبع بالماء كطور ثابت بعد تجفيفه والطور المتحرك حسب البعدين:

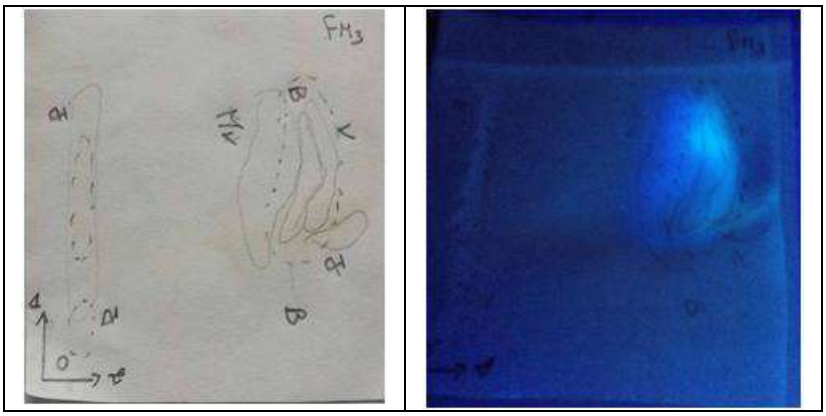
- ✓ البعد الاول: $BuOH/AcOH/H_2O$ 4/1/5
- ✓ البعد الثاني: $15\%\ AcOH/H_2O$
- ✓ تم الكشف وتوضيح البقع بواسطة بخار $UV+NH_3$

ونتائج الفصل الكروماتوغرافي لكسور مستخلص النبتة *Mp* موضح في الاشكال التالية: (15،16، 17، 18،19)

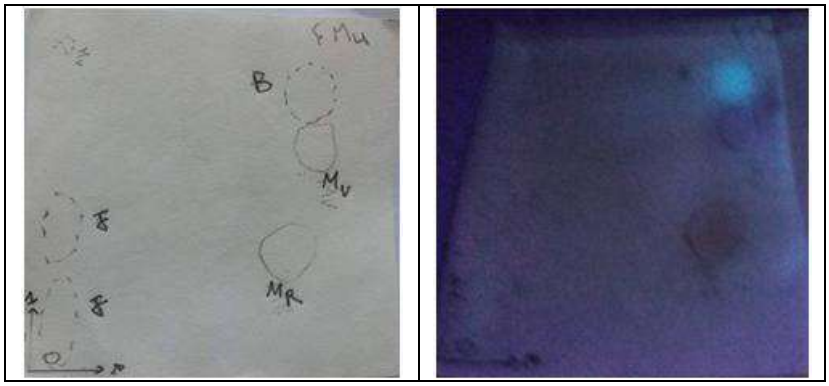


الشكل (15): صور لنتائج الكروماتوغرافياالورقيةللكسرFm1.

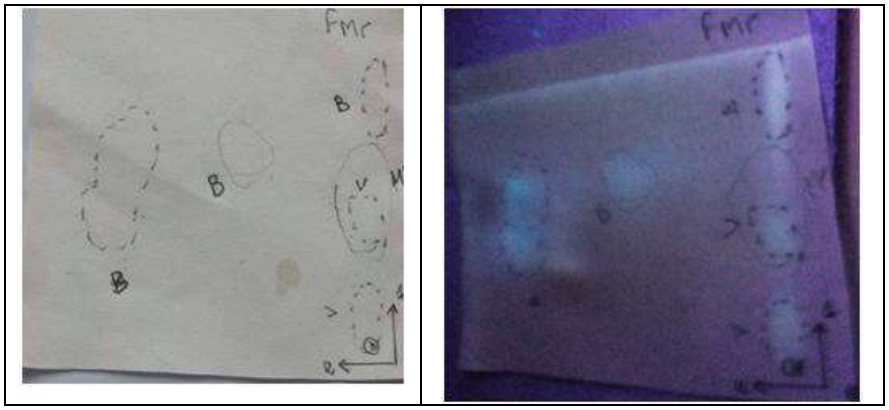
الشكل(16) : صور لنتائج الكروماتوغرافياالورقية للكسرFm2



الشكل (17):صور لنتائج الكروماتوغرافيا الورقية للكسرFm3

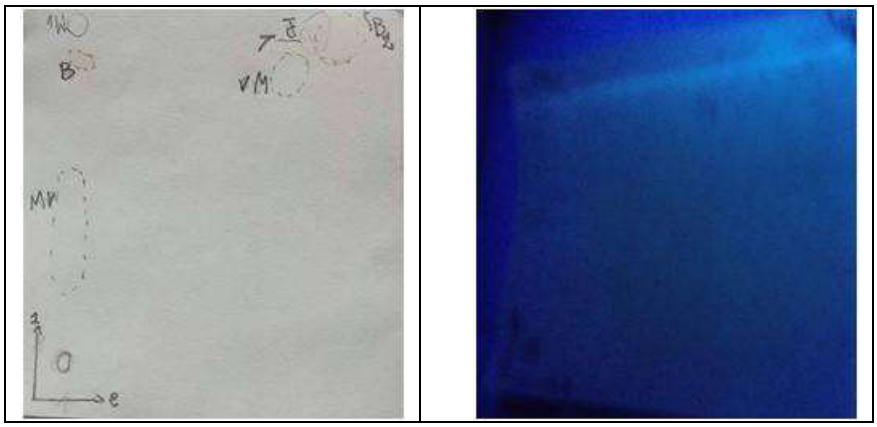


الشكل (18):صور لنتائج الكروماتوغرافياالورقيةللكسر Fm4

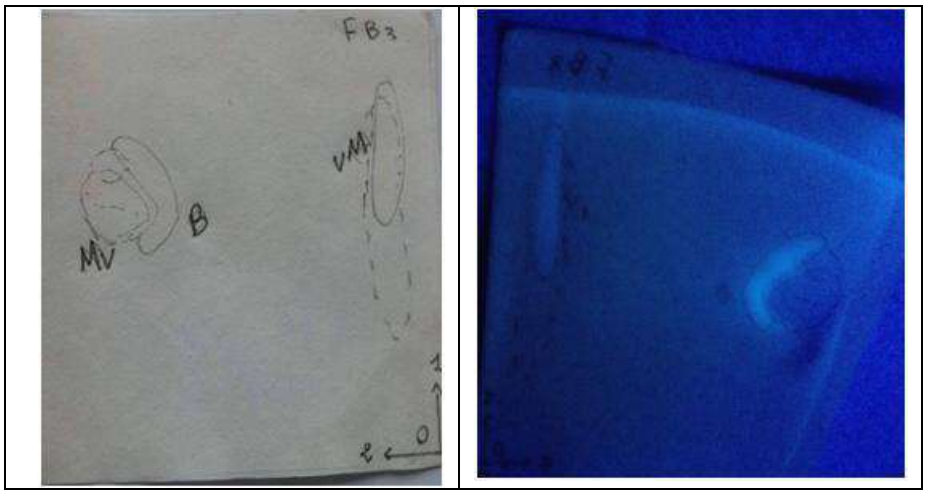


الشكل (19): صور لنتائج الكروماتوغرافياالورقيةللكسرFm5

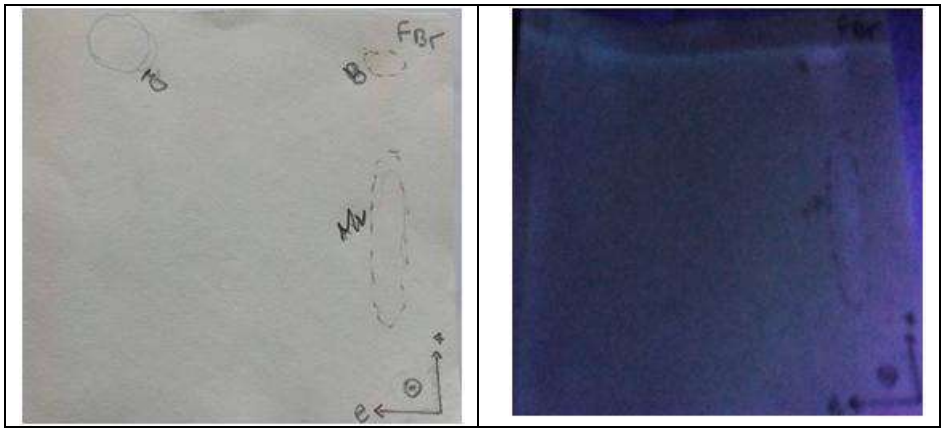
أما عملية الفصل الكروماتوغرافي لكسور مستخلص النبتة *Bc* موضح في الاشكال (22،21،20،23).



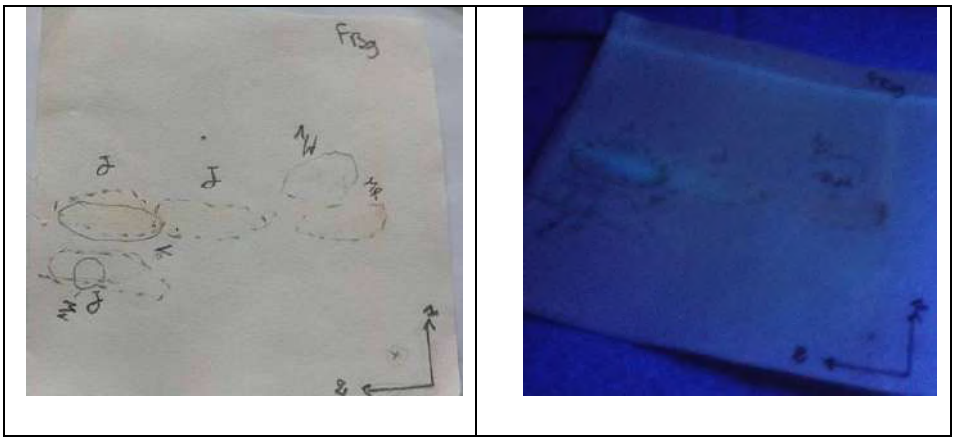
الشكل (20):صور لنتائج كروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb2



الشكل (21): صور لنتائج كروماتوغرافيا الورقية للكسر Fb3



الشكل (22):صور لنتائج كروماتوغرافيا الورقية للكسرFb5



الشكل (23): صور نتائج الكروماتوغرفيا الورقية للكسر Fb9

تم الكشف عن نتائج الكروماتوغرافيا الورقية CP للكسور تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية مع الإظهار ببخار NH_3، فتمّ تحديد بقع مختلفة الألوان منها البنفسجي، الأزرق المخضر، الأصفر والبني وهذا ما يفسر من جهة إمكانية فصل للمركبات تحت هذه الشروط الكروماتوغرافية، ومن جهة أخرى ظهور هذه الألوان عادة ما ينبّئ بوجود مركبات فلافونيدية حسب بكل لون. [44.15]

فاستنادا على المعلومات المرجعية [47]، يمكن أن يرفق لكل لون من ألوان البقع المحدّدة على الكروماتوغرامات ، نوع من أنواع الفلافونيدات كما هو موضح في الجدول رقم (7)

وأيضا من خلال النتائج المتحصّل عليها وإعتمادا على الدراسات السابقة [17.44] يمكن القول إن لكسور تحتوي على أنواع مختلفة من المركبات الفلافونيدية.

الجدول (7): نتائج الكروماتوغرافيا CP للكسور المتحصل عليها من CC

اللون	الكسور	نوع المركب المتوقع
بنفسجي **Mauve**	Fm1, Fm2, Fm , Fm4 Fb2, Fb3, Fb5, Fb9	Flavone, isoflavone, Dihydroflavonol, Chalcone
اصفر **jaune**	Fm1, Fm2, Fm3, Fm4 Fb2, Fb3, Fb5, Fb9	Flavone, Flavonol, Aurone, ChalconeFlavanone, Dihydroflavonol
بني **Marron**	Fm2, Fm4 Fb9	Flavone, Flavonol, Chalcone, Tannins condensés
اخضر **Verte**	Fm3, Fm5 Fb9, Fb2	Aurone
ازرق **Bleue**	Fm1, Fm3, Fm4,Fm5 Fb2,Fb5	Flavone, Flavonol

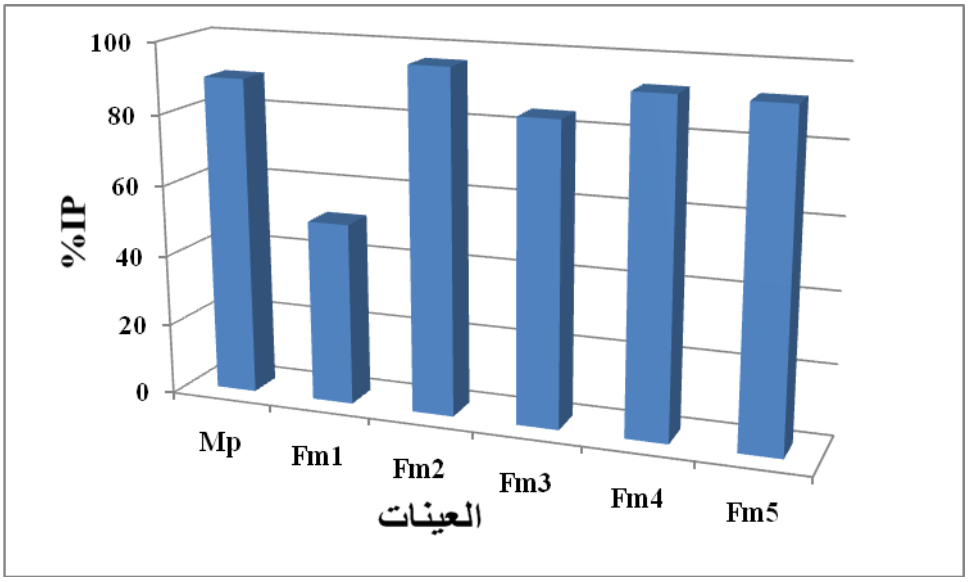
II.3.نتائج قياس النشاط المضاد للأكسدة

II .1.3.نتائج اختبار DPPH

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصي ل BuOH لنبتتين *Mp* و *Bc* وكسورهما بطريقة DPPH ، وحسبت نسبة تثبيط الجذور الحرة بالعلاقة :

$$\%IP = (Abs_{cont} - Abs_{Ech}) / Abs_{cont} \times 100$$

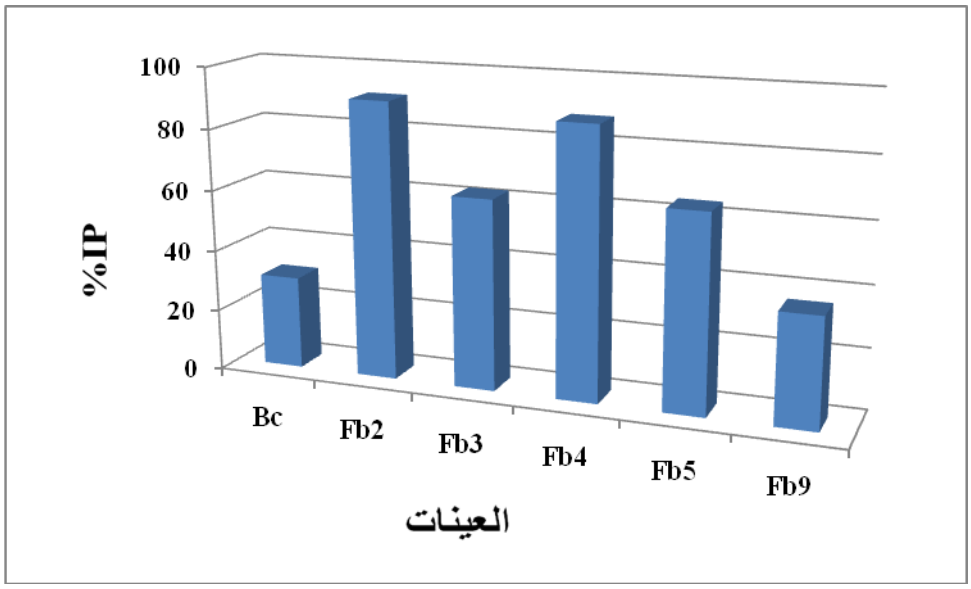
يوضح الرسم البياني في الشكل (24) نسبة تثبيط الجذور الحرة DPPH من قبل مستخلص *Mp* وكسوره.



الشكل (24): نسبة تثبط الجذور الحرة لمستخلص *Mp* وكسوره في اختبار DPPH

أظهرالرسم نسب تثبيط مرتفعة جدا لمستخلص النبتة *Mp* وكسوره، تقريبا كلها تجاوزت90%ما عدا الكسرFm1الذي أعطى نسبة منخفضة (51%).للتذكير ، لقد تمّ الحصول على هذا الكسر ب 80%من CH_2Cl_2 وبالتالي فإنه لا تحتوي ربما على نسبة مهمة من المركبات الفينولية (فلافونيدات) التي نرجع لها فعالة تثبيط الجذور الحرة في عيّناتنا.

حسب الرسم البياني في الشكل(25)، فقد لوحظت نسبة تثبط منخفضة لمستخلص BuOH للنبتة *Bc* حيث لم تتجاوز % 33.45رغم من أن كسوره أعطت نسبا مرتفعة وخاصة Fb2(90.92%) وFb4(88.08%) ويمكن أن يرجع ذلك إلى وجود المركبات النشطة في هذه الكسور و/أو إلى الفعل التازري فيما بينها.



الشكل (25): نسبة تثبط الجذور الحرة لمستخلص *Bc* وكسوره في إختبار DPPH

للتحرر من أثر التركيز على تقدير القدرة التثبيطية للجذور الحرّة، تم تحديد التركيز المثبّط ل50% من الجذور الحرة للمستخلصات والذي يعبّر عنه ب EC50، فكلما كانت قيمة هذا الأخير صغيرة كانت فاعلية المستخلص المضادة للجذور الحرة كبيرة. [48.40]

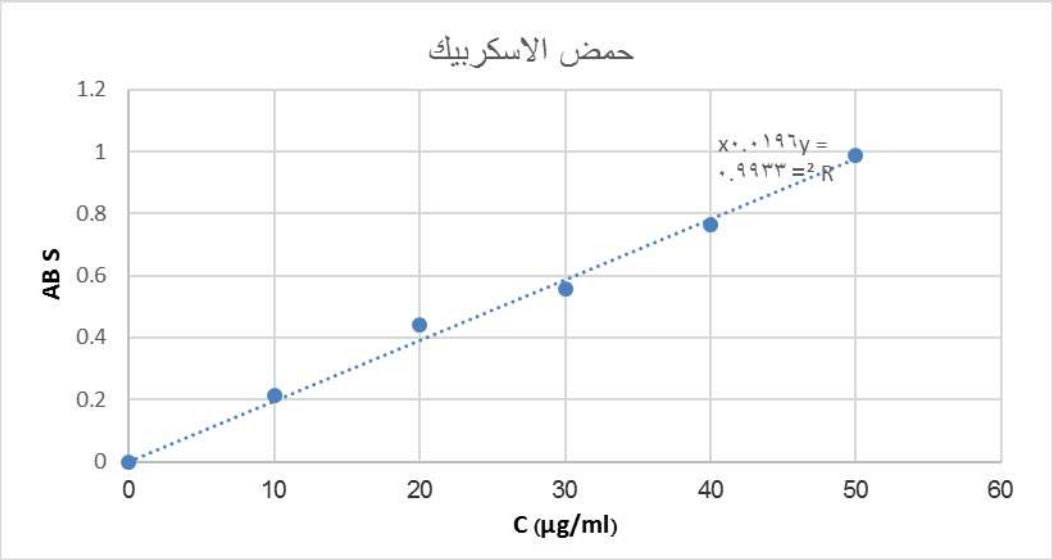
أعطيت قيمة EC50لمستخلص BuOH ل *Mp* 1.45mg /ml أما مستخلص *Bc* أعطى قيمة كبيرة تقدر ب 7.75mg /ml، يعتبر حمض الاسكوربيك مركب قياسي في النشاط المضاد للاكسدة تم قياس قيمة EC50 له في الظروف العملية ف أعطى قيمة ك 0.47mg /ml.[40]

عموما من خلال نتائج المتحصل عليها واستنادا لدراسات السابقة حول النبتتين [35.40] فان لمستخلصي BuOH لنبتتين لهما نشاط لتثبط الجذور الحرة إلا أن مستخلص *Mp* أكثر فاعلية مقارنة مع مستخلص *Bc*

II.2.3.نتائج اختبار FRAR

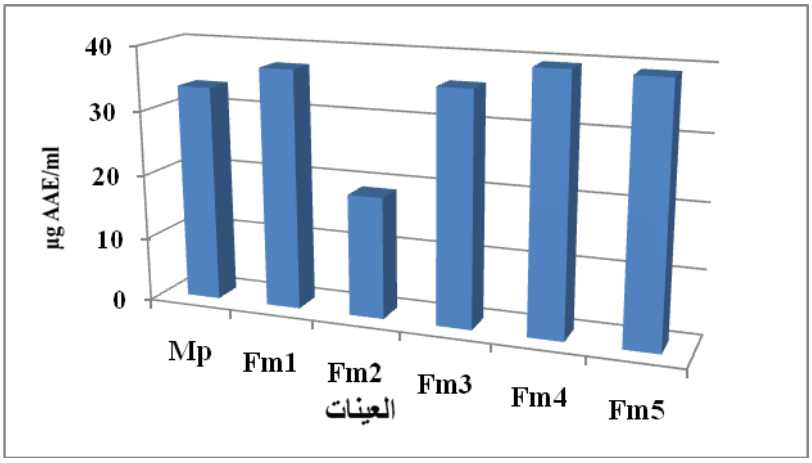
هذا الإختبار هو احد الاختبارات الأكثر استعمالا لتحديد القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية، لأنه يقوم بقياس قدرة إرجاع الحديد Fe^{3+}إليFe^{2+} وغالبا ما يستعمل حمض الأسكوربيك كمضاد مرجعي للأكسدة [49]

في هذه الدراسة تم إستعمال حمض الأسكوربيك للحصول على منحني القياسي الممثل في الشكل (26) أي باستعمال الطريقة البيانية



الشكل(26):المنحني القياسي لحمض الأسكوربيك في اختبار FRAP

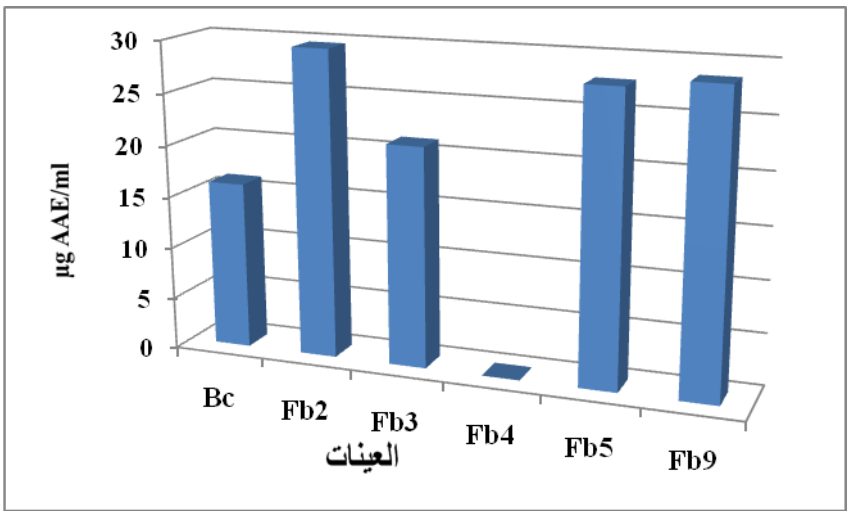
يمثل الرسمان البيانيان تراكيز المستخلصين وكسورهما المكافئة لتركيز حمض الأسكوربيك لإرجاع الحديد الثلاثي.



الشكل (27): نتائج اختبار FRAP لمستخلص *Mp* وكسوره

أظهر رسم البياني قيم تراكيز متقاربة لمستخلص *Mp* وكسوره حيت تجاوزت قيمه 35µgEAA/ml ماعدا الكسر Fm2 فهو يقل عن 20 µg EAA/ml .

أمّا فيما يتعلق بالنبتة الأخرى *Bc* فقد أظهر الرسم البياني انخفاضا في التركيز المكافئ لمستخلصاتها والذي قدّر بالقيمة 16.71 µg EAA/ml علي عكس كسورها التي أعطت تراكيز مكافئة مرتفعة مقارنة بالمستخلص فكان التركيز المكافئ يتجاوز 20 µg EAA/ml



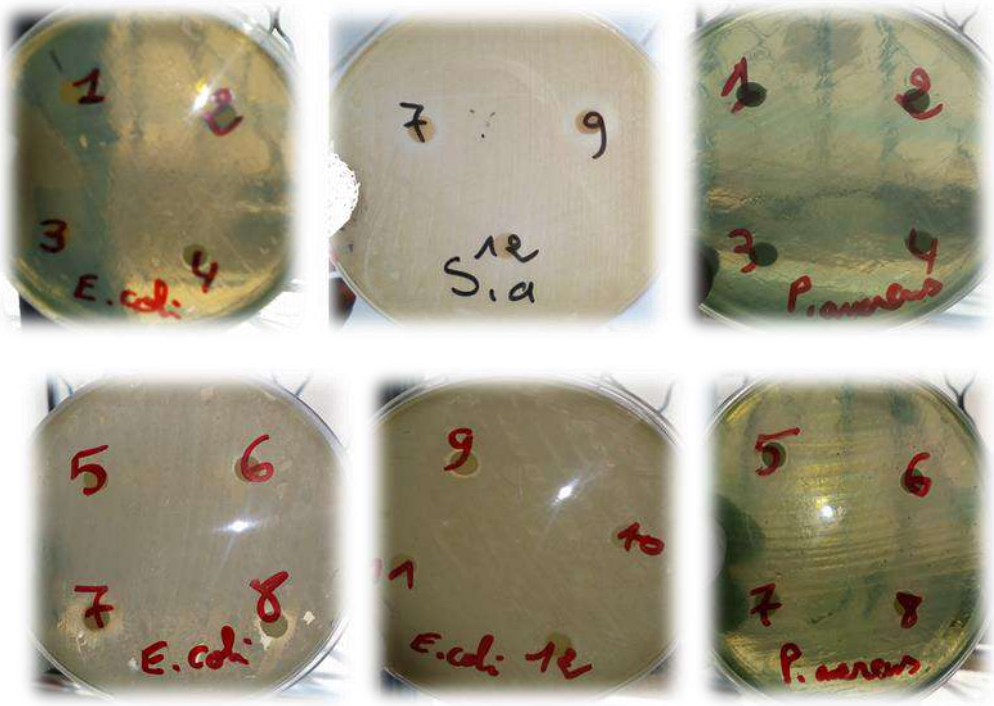
الشكل (28) : نتائج إختبار FRAP لمستخلص *Bc* وكسوره

عموما في هذا الاختبار كلما زاد التركيز المكافئ لحض الأسكوربيك كل ما كان النشاط المرجع اكبر.[26.40.49]

على ضوء نتائج هذا الإختبار يمكن القول أنّ مستخلصBuOH لنبتة *Mp* أكثر فاعلية من مستخلص BuOH لنبتة *Bc* ،حيث مستخلص BuOH لنبتة *Mp* يعطي قيمة تركيز مكافئ (33.55µg EAA/ml)أما مستخلص BuOH لنبتة *Bc* يعطي قيمة تركيز مكافئ(µg 16.71EAA/ml).

II .4. نتائج تقييم النشاط ضد البكتيريا للمستخلصات

نتائج الاختبارات المضادة للبكتيريا للمستخلص البيوتانولي و الكسوره المحضرة من النبتتين(*Matricaria pubscens*(Desf. و *Brocchia cinerea* (Vis) ضد السلالات البكتيرية المختبَرة *E.Coli*، *S. aureus* و *P.aeruginosa* أظهرت حساسية ضد المستخلصين وبعض كسورهما والتي تم توضيحها في الصور على الشكل (29) :



الشكل (29): نتائج الإختبارات المضادة للبكتيريا للمستخلصين البيوتانوليين وكسورهما لكل من *Mp* و *Bc*

ويلخص الجدول (8) حساسية السلالات الثلاثة المختبَرة تجاه المستخلص البيوتانولي وكسوره لكل من ***Mp*** و***Bc*** .

الجدول (8): اقطار الإستجابة للتثبيط البكتيريا (mm) لكل من المستخلصين البيوتانوليين *M.pubscens* و *B.cinerea* وكسورهما

البكتيريا / العينة	*S.aureus* ATCC25923 (Gram+)	*P.aeruginosa* ATCC27853 (Gram-)	*E.Coli* ATCC25922 (Gram-)
mp	-	7±0.005	-
Fm1	-	-	-
Fm2	-	-	-
Fm3	-	-	8±0.005
Fm4	-	-	-
Fm5	-	8±0.005	9±0.005
Bc	12 ±0.005	-	-
Fb1	-	-	-
Fb2	13 ± 0.005	-	10±0.005
Fb3	-	-	-
Fb4	-	-	-
Fb5	-	-	-
Fb6	-	-	-

- **حالة المستخلص البيوتانولي للنبتة *B.cinerea***

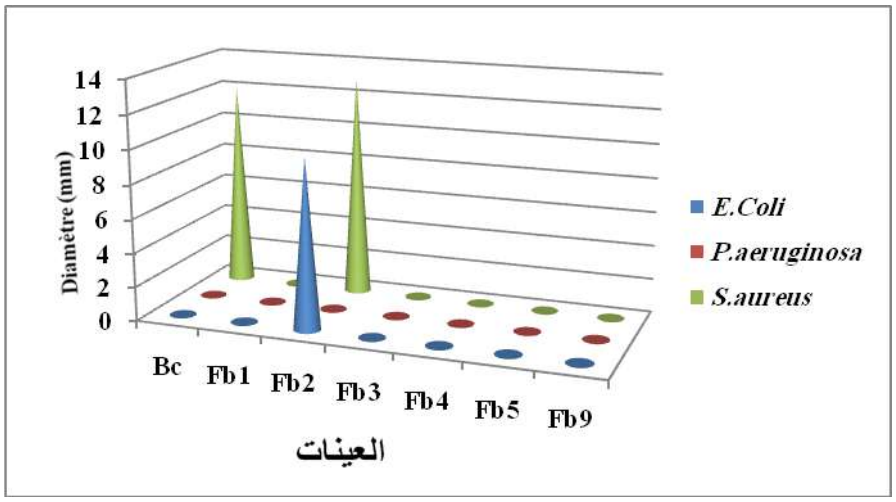
مع السلالة *S.aureus*موجبة الغرام المستخلص البيوتانولي للنبتة *Bc* أبدى حساسية مهمة فقد أظهر قطرا لمنطقة التثبيط قدّر ب12mm وكذا الحال بالنسبة للكسر Fb2الذي تميّز بقطر منطقة تثبيط معتبرة 13mm مقارنة مع باقي الكسور لنفس المستخلص، التي أبدت بدورها مقاومة تامة ضد هذه السلالة البكتيرية . فحسب المرجع [50] حساسية ا لسلالات البكتيريا موجبة الغرام أكثر من سالبة الغرام كون جدار الخلية البكتيرية عند هذه الأخيرة أكثر سمكا من البكتيريا موجبة الغرام وهذا الجدار يتكون من غشائين بلازميين يفصل بينهما طبقة من البيبتيدوغليكان(Piptidoglucane) عند البكتيريا سالبة الغرام على عكس

البكتيريا موجبة الغرام حيث يتكون جدارها من طبقة واحدة.

لكن السلالة *P.aeruginosa* سالبة الغرام أبدت مقاومة ضد المستخلص البيوتانولي *Bc* و أيضا يوجد مقاومة ضد كسورهوتحصل الباحثون في العمل المنشور [40]على أن المستخلص البيوتانولي *Bc* له فاعلية معتبرة ضد *P.aeruginosa* سالبة الغرام و يمكن أن يرجع هذا التباين في النتائج إلى إختلاف الشروط العملية.

و كذلك الحال مع سلالة *E. Coli* سالبة الغرام التي أبدت مقاومة ضد المستخلص البيوتانولي *Bc* وكسوره ما عدا مع الكسرFb2حيث أظهرت حساسية إتجاهه فكان قطر منطقة التثبيط معتبرا 10mm.

في بعض الحالات هذه البكتيريا تكون حساسة جدا ضد بعض أنواع الطيارة والمستخلصات النباتية [51]، يمكن أن تفسر هذه النتيجة على أنّ سلالة *E. Coli* التي عادة ما تبدي مقاومة كبيرة ضد الكثير المستخلصات الطبيعية قد كانت حسّاسة بالنسبة للكسر Fb2 ربما لاحتوائه على أنواع من متعدد الفينولات الفعّالة.



الشكل (30): رسم بياني لحساسية السلالات الثلاث للمستخلص البيوتانولي للنبتة *Bc* وكسوره

•في حالة المستخلص البيوتانولي *M.pubescens*

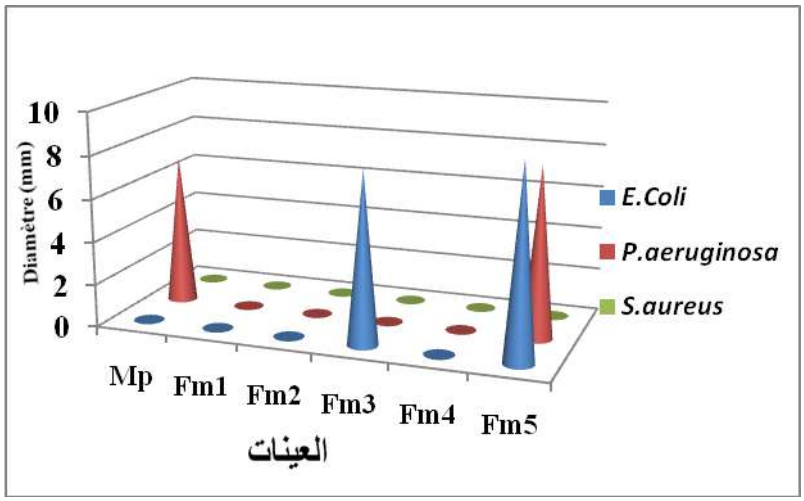
أبدت سلالة البكتيريا *S.aureus* موجبة الغرام مقاومة ضد المستخلص البيوتانولي *Mp* الشيء الذي أثبت في الدراسة [40] وكذلك مقاومة ضد كسوره. من المحتمل أن تكون تركيبة الخلية لهذه السلالة هي السبب.

في حين أنّ إختبار نفس المستخلص الخام لهذه النبتة على سلالة *P.aeruginosa* سالبة الغرام قد أبدى حساسية بقطر التثبيط قدّر ب 7 mm مما يتفق مع ما تمّ تسجيله في الدراسة [40] لكن بقطر أكبر 11 mm كسوره قاومت هذه البكتيريا، ماعدا الكسر Fm5 الذي تميّزت فعاليته بقطر تثبيط يساوي8mm. من المؤكّد أنّ هذه السلالة لديها حساسية اتجاه المركبات الكيميائية المتواجدة في هذا المستخلص التي نتوقع أن تكون الفينولية المتعدّدة من فئة الفلافونيدات.

فيما يخصّ تأثر *E. coli* سالبة الغرام بالعيّنات المختبرة، فقد لوحظت نتائج ايجابية فقط في حالتي الكسرين Fm3و Fm5 اللذان أظهرا منطقتي تثبيط بقطرين قدّرا على التوالي 8mm و 9mm. كما سجّلت عدم فعالية المستخلص الخام و بقية كسوره تجاه *E. coli*.

من المحتمل أن يكون الفعل المضاد لمركبات المستخلص البيوتانولي للنبتة *M.pubescens*، مجتمعة كان سببا في عدم كفاءته، لكنّ فصلها أظهر فعالية بعضها إمّا منفردة أو مجتمعة بأثر فعلها التآزري كما الشأن في الكسرين Fm3 و Fm5.

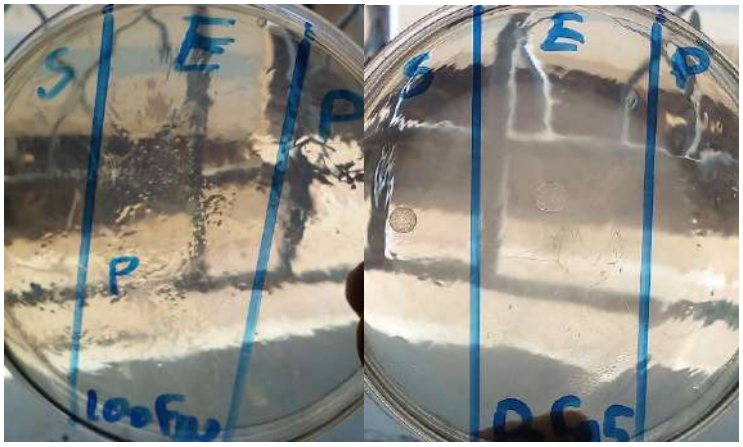
وعلى العموم النتائج المتحصل عليها في الفاعلية ضد البكتيريا ليست نفسها على الرغم من أنّنا استعمالنا نفس للسلالات البكتيرية الثلاث وهذا ما يفسر أنّ زيادة قطر التثبيط البكتيري يتبع عاملين إثنين هما السلالة البكتيرية المستعملة و طبيعة المادة المختبَرة .



الشكل (31) :رسم بياني لحساسية السلالات الثلاث للمستخلص البيوتانولي للنبتة *Mp* وكسوره

II .2.4 تحديد التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا CMI

حدّد التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا بإتباع طريقة التخفيف والمزج على الوسط الصلب للسلالات البكتيرية سابقة الذكر للمستخلصات والكسور التي أظهرت فاعلية مهمة كما تبرزه بعض الصور الموضحة في الشكل (32)



الشكل (32): صور لبعض نتائج إختبار CMI

اختبار العيينات بتراكيز مختلفة على السلالات البكتيرية المدروسة سمح لنا بتسجيل النتائج الملخصة في الجدول (9)

الجدول (9): التركيزالأدنى للمستخلص المثبط للبكتيريا

السلالة / المستخلص (mg /ml)		***S.aureus*** **ATCC25923 (Gram+)**	***P.aeruginosa*** **ATCC27853 (Gram-)**	***E.Coli*** **ATCC25922 (Gram-)**
Mp	5	R	**S**	R
	2.5	R	R	R
	1.25	R	R	R
	0.625	R	R	R
Fm3	5	R	R	**S**
	2.5	R	R	R
	1.25	R	R	R
	0.625	R	R	R
Fm5	5	R	**S**	**S**
	2.5	R	R	R
	1.25	R	R	R
	0.625	R	R	R
Bc	5	**S**	R	R
	2.5	R	R	R
	1.25	R	R	R
	0.625	R	R	R
Fb2	5	**S**	R	**S**
	2.5	R	R	R
	1.25	R	R	R
	0.625	R	R	R

قراءة لما تمّ ذكره في الجدول (9) من نتائج أدنى تركيز لتثبيط نمو البكتيريا CMI يمكن أن نثبت أنّه:

- ✓ لوحظ عدم نمو البكتيريا *P.aeruginosa* في للمستخلص البيوتانولي *Mp* والكسر Fm5 لتركيز 5 mg /ml في حين لوحظ نموها في التراكيز المخففة2.5 mg /ml ، 1.25 mg /ml ، 0.625 mg /ml ومن هذا نستنتج أنّ التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا سالبة الغرام *P.aeruginosa* هو5 mg /ml.
- ✓ لوحظ عدم نمو للبكتيريا *S.aureus* في المستخلص البيوتانولي *Bc* و الكسر Fb2 لتركيز 5 mg /ml في حين لوحظ نموها في التراكيز المخففة ومن هذا نستنتج أنّ التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا للبكتيريا موجبة الغرام *S.aureus* هو5 mg /ml .
- ✓ لوحظ عدم نمو البكتيريا *E. coli* في الكسور Fm3 و Fm5و Fb2 لتركيز5 في حين لوحظ نموها في التراكيز المخففة ومن هذا نستنتج أنّ التركيز الأدنى المثبط للبكتيريا سالبة الغرام *E. coli* هو 5 mg /ml

الخاتمة

يندرج هذا العمل في إطار تثمين النباتات الطبية وعلى وجه الخصوص النبتتين *Matricaria pubscens* (Desf) و *Brocchia cinerea* (Vis) المعروفتين في الأوساط الصحراوية الشعبية بالقرطوفة و الشيحية والمنتميتين إلى عائلة *Asteraceae* وذلك نظرا للتطبيقات التقليدية المتنوعة لهما، بالاضافة إلى ما تحتويه هاتان النبتتان من عناصر ومواد فعالة والدراسات المثارة حولهما.

مساهمتنا في دراسة هاتين النبتتين استهدفت بعض مركبات الأيض الثانوية الفعالة: الفينولات المتعدّدة، الفلافونيدات. فكانت بداية هذا العمل باستغلال المستخلصات البيوتانولية للنبتتين المتحصّل عليهما بالإستخلاص بمذيبات مختلفة بطريقتين مختلفتين.فتم تجزئة المستخلص البيوتانولي لكل نبتة بطريقة كروماتوغرافيا العمودCC حيث تم إختيار الطور المتحرك المناسب فيها من إختبارCCM ،فنتجت خمس كسور من تجزئة المستخلص البيوتانولي لنبتة *M pubscens* وستة كسور من تجزئة المستخلص البيوتانولي لنبتة *B cinerea*.

الدراسة التحليلة للمستخلصات والكسور بواسطة كروماتوغرافيا الورق CP أظهرت أنّ من أهم المركبات التي وجدت هي المركبات الفينولية والفلافونيدات،

تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصين وكسورهما بطريقتين هما إختبار FRAP و إختبار DPPH.

بواسطة إختبار FRAP قدّرت فعالية مستخلص *Mp* 33.55 µg EAA/ml و مستخلص *Bc* 16.71µg EAA/ml،أما بالنسبة لإختبار DPPH و جدنا أن قيم IP% بالنسبة لمستخلص *Mp* 89.63% أما بالنسبة لمستخلص *Bc* 30.45 %وعليه إن المستخلصات المدروسة تحتوي على كمية كبيرة من الفينولات وكذا الفلافونيدات التي يمكن أن تلعب دورا في القدرة التثبيطية المضادة للأكسدة.

دراسة الفعالية المضادّة للكائنات المجهرية المسببة للأمراض، تُوّج عملنا التطبيقي باستنتاج مدى فعالية المستخلص البيوتانولي على بعض السلالات البكتيرية الوبائية مثل *E.Coli*(Gram-) و المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*(Gram+) والزائفة الزنجارية *P.aeruginosa*(Gram−) ، والتي تعتبر المسؤول الرئيسي للعدوى في المستشفيات، بإستخدام طريقة الوسط الصلب للأقراص المنتشرة و أثبتت النتائج أن

للمستخلصين فاعلية ضد البكتيريا متفاوتة الأهمية لكل السلالات المختبرة و CMI المتحصل بالنسبة المستخلص البيوتانولي لنبتة *M pubscens* ضد *P.aeruginosa* تساوي µg/ml 500 و بالنسبة لمستخلص البيوتانولي لنبتة *B cinerea* ضد *S. aureus* 500 µg/ml كما أظهرت كسورهما استجابة ضد السلالات البكتيرية المختبرة وهذا ما يتناسب مع بعض الإستعمالات التقليدية.

تعتبر النتائج المتحصّل في هذه المذكّرة حلقة مهمّة وتتمّة واعدة لسلسلة الأعمال المؤطّرة في مخبر البحث بيوجيوكيمياء الأوساط الصحراوية حول هاتين النبتتين سواء في المجال الكيميائي أو البيولوجي. ومواصلة العمل على هذين النوعين النباتيين وأنواع أخرى مماثلة من منطقتنا يعتبر مجالا واسعا للبحث المستقبلي عن البدائل الطبيعية النافعة.

المراجع

[1] بن عشورةصبرينة البتول، الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية،مذكرة ماجستير في الهندسة الكيميائية، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2007.

.[2]. فيصل كاظم مطشر، غازي منعم عزيز،أماني عبد الوهاب عبد الرزاق ، دراسة تاثيير المركبات الكومارين المعزولة من نبات الحندقوق *Melilotusindica* تجاه بعض البكتيريا المرضية و خط الخلايا السراطنية *HeLa cell* ، المجلة العراقية الحياتية (1)356-399(2009).

[3].مهدي ضمد القيسي ،زينب صباح المالكي، فاروق فرج جمع ،تشخيص وتقدير الفينولات الكلية و مركباتها في بدور بعض أصناف العنب *Vitis vinifera L* باستخدام الكرومانوغرافيا السائل عالي الأداء ، جزاء من أطروحة دكتوراه،2008.

[4]. A.Crozier, M. N. Clifford , H. Ashihara., plant Secondary Metabolites, Blackwell publishing , Oxford UK ,2006.

[5].ميثاق الجبر،بحث وتحديد نواتج الايض الثانوي لنبات القات *Catha edulis* من العائلة *(Celastraceae)* ونبات البوليكاريا *PulicariaJauberti* من العائلة (*Asteraceae*) ،رسالة دكتوراه جامعة منتوري-قسنطينة،2010.

[6]. Bahaz. M, Rachdi. H, Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhetinolepis LonadoidesCoss (Tichert),* mémoire de fin d'étude, Univ. Ouargla,2010.

[7]. Laraoui.H, Etude Phyotchimique L'Extrait Chloroformique de *Bupleurumatlanticum*, thèse doctorat, UV El Hadj Lakhdar Batna, 2007

[8].لطرش عائشة، دراسة الدور الوقائي من الفيتامين E و بعض المستخلصات النباتية اتجاه سمية المبيد كلور وبيرفيوس ،مذكرة ماجستير ،جامعة قسنطينة،2011

[10]. S. Fiorucis, Activité biologique de composés de la famille des flavonoïdes : Approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire, Thèse de doctorat, Univ. Nice ,2006.

[11].ع .الأميرعبد الله الموسيمي، ع .عبود شريف، لحسين علي،دراسة الفعالية البيولوجية لبعض مستخلصات أوراق نبات كفم ريم، *Vitex agnus* – castus L.– مجلة علوم ذي الفقار،جامعة البصرة، 2 (4) ،2011.

[12]. P. Arun., In vitro Antibacterial acttivity and Flavonoid contents of

Lawsoniainermis (Hanna), *Int . J. Pharm. Tech. Res*, 2(2), 2010 .

[13]. أمداح سعاد، التنقيب عن الجزيئات الفعالة من النبتتين الصحراويتين *Chrysanthemum fuscatum* و*Colocynthis vulgaris* و دراسة الأثر الوقائي للنظام الهيباتولوجي و الهيماتولوجي لدى الجرذان المعاملة بمضادات السل، أطروحة دكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، 2006.

[14].بومعراف منال ، فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتة *Phoenix dactylifera*(Ghars)، مذكرة ماجستر، جامعة منتوري قسنطينة، 2007.

[15] احمد طويل، دراسة نواتج الميثابوليزم الثانوي لبعض نباتات منطقة الهقار ، رسالة الدوكتراه جامعة منتوري، قسنطينة، 2009.

[16] . دندوقي حسين ، دراسة الميتابوليزم الفلافونيدي لنبات*Inula Viscose*، مذكرة ماجستير في الكيمياء العضوية ،جامعة قسنطينة، 1989.

[17].M. Bouziane, Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante : *Cotulacinerea*de la région de Ouargla, thèse de Magister, Univ. Ouargla. 2002.

[18] عاشوري أمال.،فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبات الجثجاث *Crispapulicaria (*forsk.)، مذكرة ماجستر،جامعة منتوري ،قسنطينة ،2006.

[19]علاوي مسعودة ، مساهمة في دراسة بعض المركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث *Haloxylon Scoparium*، مذكرة ماجستير ،جامعة ورقلة، 2003.

[20]. E. H. Ali.The Effect of Apigenin on Gram Positive and Negative, 30(2), 20-21, 2012.

[21]. Elhazimi. H., The natural product, 149-190, 1995.

[23]. M. Asoobrattee, phenolic as potential and Molecular therapentic of Mutagenessis, 579(1), 200-13, 2005.

[24] محب طه صقر، فسيولوجيا الاجهاد،Stress physiology، كلية الزراعة، جامعة المنصورة.

[25]بوبلوطة حورية، النشاط المضاد للتاكسدي وامكانية وقاية بالمستخلص الميثانولي لنبتي الـ *Matricariapubescens* و*CentaureaIncana*على السمية الكبدية، مذكرة ماجستير، جامعة

منتوري قسنطينة، 2009.

[26] العابد إبراهيم ، دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات لنبات الضمران *Traganumnudatum*، رسالة ماجستير، جامعة ورقلة، 2009.

[27] غيابة زينب، دراسة تحليلية للبيدات وفينولات ومكونات أخرى لبعض أصناف نخيل التمر المحلية، رسالة دكتوراه، جامعة ورقلة ،2015.

[28]. Chahardehi, A. M., Ibrahim, D., and Sulaiman, S. F., Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in Urticaceae family. *J. Applied Bio. Sci*, 2, 01-05, 2009.

[29]. غزل اليافي الزهري، تعيين المحتوي الكيميائي لنبات البرانغوس وإمكانية استخدامها في المجال التطبيقي، رسالة دكتوراه ،جامعة دمشق، 2007.

[30] Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., Leeuwenburgh, C., Supplementation with vitamin c and n-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise, *Free Radic. Biol. Med*, 31: 745-753, 2001.

[31].بابا عربي الياس، تحضير بعض أملاح الفوسفونيوم ودراسة فعاليتها البيولوجية على بعض أنواع البكتيريا عند مزجها مع البنيسلينV، مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة، 2009.

[32]. بوخبتي حبيبة ، النباتات الطبية المتداولة في المنطقة الشمالية لولاية سطيف دراسة تشريحية لنوعين من جنس *Mentha* و النشاطية ضد البكتيرية لزيوتهما، مذكرة ماجستير جامعة فرحات عباس سطيف، 2010.

[33]. L.G. Harris, S.J. Foster, R.G. Richards., An introduction to *staphylococcus aureus* and techniques for identifying and quantifying *S. aureus*adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *harriseuropean cells and materials*, 4, 39-60, 2002.

[34]. T. Strateva, D. Yordanov, *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance, *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1133–1148, 2009.

[35]. M. Bouziane, Extraction et analyse de la composition chimique de plantes sahariennes d'intérêt médicinal, thèse de doctorat, Univ. Ouargla, 2016

[36]. Lakhdari F.,atlas floristique de la vallée de l'oued righ, écosystème.station milieu biophysique-touggourt . *dépôt légal* : 4718-2010, ISBN: 978-9961-9745-4-4.

[37].مخدمي نور الهدى، استعمال المستخلصات المائية لنبتتي *Matricariapubscens*و *Pituranthoschloranthos* كمعطرات طبيعية للجبن "امير"، ودراسة النشاطية ضد البكتيريا لزيوتهما العطرية ، رسالة ماجستير، جامعة فرحات عباس سطيف .2014.

[38]. Lakhdari W, Dehliz A, Acheuk F, Mlik R, Hammi H, Doumandji-Mitiche B , Gheriani S, Berrekbia M, Guermit K, Chergui S, Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara), *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2), 204-21, 12016 .

[39]. M. Salha., Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricariapubescens* et l'évaluation de son activité antioxydante, mémoire master, Univ. Ouargla, 2013.

[40]. M. Bouziane, M. Hadj-Mahammed, K. Dehak, N. Oussameur, C. Ksikis, F. Benzaoui, A. Houari, Antioxidant and antibacterial properties of *Brocchiacinerea* (Vis.) and *Matricariapubescens* (Desf.) ethyl acetate extracts and their fractions, *Der Pharma Chemica*, 18(7),232-239, 2016.

[41]. Naima, S. Nadjet., Etude de l'effet antitoxique de l'extrait méthanolique de l'espèce *Cotulacinerea* vis-à-vis le pesticide Chlorpyriphos chez les rats wistar albinos, mémoire Master Univ. El-oued,2015 .

[42]. A. Makhloufi, H. Moussaoui, H.A.Lazouni., Antibacterial activité of essential oil and crude extracts from *Matricariapubescens* (Desf.) growing wild in Bechar, south west of Algeria, *J. Medicinal Plants Research*, 6 (16), 3124-3128, 2012.

[43] .باز مسعودة ، استخلاص وفصل و تحديد بنيات منتوج الايض الثانوي عند نبات جنس *Centaureac.sphaerocephala* L.، جامعة منتوري قسنطينة، 2006.

[44].هشام لكحل ، فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبتة *Stachys ocymastrum*(L).Briq (Lamiaceaee) ، مذكرة ماجستير جامعة منتوري قسنطينة، 2008.

[45]. بن سلامة عبد الرحيم ، النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للأنزيم المؤكسد للكزانثين لمستخلصات أوراق *Hertiacheirifolai* l. ، مذكرة ماجستير، جامعة فرحات عباس سطيف،

.2012

[46]. H. Roukia, Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien, thèse de doctorat, Univ. Ouargla, 2015.

[47]. N. Mezache., Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille Asteraceae: *Seneciogiganteus* (Desf.) et *Chrysantemummyconis* (L.) », thèse de doctorat, Univ. Constantine, 2010.

[48]. H. Roukia, K. Dehak, M.Hadj-Mahammed, M. D.Ould-elhadj, composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de *deverrascoparia*coss. & dur. (apiaceae),*Lebanese Science Journal*, 16, 2, 2015

[49]. David R. Katerere, Giulia Graziani, Kaizer M. Thembo, Norman Z. Nyazema, Alberto,Ritieni, Antioxidant activity of some African medicinal and dietary leafy African vegetables,*African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4103-4108, 2012.

[50]. Perry J.J., Staley J.T., Lory S., Microbiologie. Cours et questions de révision. Ed. Dunod, 2004,

[51]. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International journal of foodmicrobiology*, 94, 223-253 ,2004.

الملخص

من خلال هذا العمل تم استهداف المركبات الفينولية المتعددة الموجودة في النبتتين (Vis)*Brocchiacinerea* و (Desf)*Matricariapubescens*، وذلك من خلال دراسة المستخلص BuOH لهاتين النبتتين

تم تجزئة المستخلصات المتحصل عليها بواسطة المذيب BuOH باستخدام كروماتوغرفيا العمود CC وذلك للحصول على 5 كسور لكل مستخلص .

اظهرت نتائج تحليل الكسور المتحصل بواسطة كرمتوغرافيا الورق CP أن المستخلص غني بالمركبات الفينولية بما في ذلك الفلافوندات من فئات مختلفة . أمّا تتقييم الفاعلية المضادة للأكسدة للعينات فقد أجري باستعمال إثنين من الإختبارات كثيرة الإستعمال أولا اختبار DPPH باستعمال الجذور الحرة .2, 2-diphényl-1- picrylhydrazyle والثاني اختبار FRAP لإرجاع ثلاثي الحديد المستخدِم ل(TPTZ) 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-1, 3, 5-s-triazine

أظهر اختبار DPPH نسبة تثبيط منخفضة (30.45 %) لمستخلص Bc مقارنة بالمستخلص Mp الذي أعطى نسبة تثبيط قدّرت ب 89.63%. بالنسبة لاختبار FRAPفقد أظهر مستخلص Mp قدرة إرجاعية بتركيز مكافئ µg EAA/ml33.55 أكثر فعالية على إرجاع الحديد من مستخلص Bc.

تقيم الفعالية ضد البكتيريا أظهروجود تأثير لبعض كسور مستخلصي النبتتين على السلالات البكتيرية المختبرة : -Gram *E.Coli* و المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* +Gram والزائفة الزنجارية -Gram*P.aeruginosa*

الكلمات المفتاحية : . ,*Matricariapubescens, Brocchiacinerea*الفينولات المتعددة ، الفاعلية المضاد لأكسدة ، الفاعلية ضد البكتيريا

Résumé

Au cours de ce travail, les polyphénols contenus dans les deux AsteraceaeBrocchiacinerea (Del.) et Matricariapubescens (Desf.), et à travers l'étude des extraits BuOH pour les deux Plantes

choisis pour le fractionnement sur colonne. En effet, quatre fractions sont obtenues de M. pubescenset cinq de B. cinere

Les analyses chromatographiques CP effectuées sur les extraits et leurs fractions ont montré, qualitativement, leur richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes de différentes classes.

La mise en évidence et l'évaluation de l'activité antioxydante de ces échantillons, ont été réalisées par deux tests, couramment utilisés dans ce domaine. Le premier qui utilise le radical libre 2, 2-diphényl-2 - picrylhydrazyle (DPPH) et le FRAP a été le deuxième en utilisant 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-1, 3, 5-s-triazine (TPTZ).

Le test DPPH a révélé que B. cinereaavec %IP équivalent à30.45%est moins efficace à piéger les radicaux libres que M. pubescensdont le %IP égale à 89.63% Pareillement, le test FRAP a montré que B. cinerea possède une capacité à réduire le fer plus faible avec 16.71µg EAA/ml par rapport à celle d'extrait de M. pubescensavec33.55µg EAA/ml

Les tests antibactérienne effectués dans ce travail ont montré un effet antimicrobien appréciable des plantes M. pubescenset , B.cinereasur les souches microbiennes :E.Coli Gram- S. aureus Gram+ P.aeruginosa Gram-

Mots clés : *Matricariapubescens*, *Brocchiacinerea*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydants . Antibactérienne.

Abstract

In this work, the polyphenols contained in the two Asteraceae Brocchiacinerea (Del.) And Matricariapubescens (Desf.), And through the study of the BuOH extracts for both Plants

Chosen for fractionation on a column. Indeed, four fractions are obtained from M. pubescens and five from B. cinerea .

The CP chromatographic analyzes carried out on the extracts and their fractions showed, qualitatively, their richness in phenolic compounds, in particular the flavonoids of different classes.

The detection and evaluation of the antioxidant activity of these samples were carried out by two tests, commonly used in this field. The first one using the 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) and the FRAP was the second using 2, 4, 6-tris (2-pyridyl) -1,3,5-s-triazine (TPTZ).

The DPPH test revealed that B. cinerea with% IP equivalent to% 30.45 is less effective in trapping free radicals than M. pubescens whose% IP equals% 89.63 Similarly, the FRAP test showed that B. cinerea has a capacity To reduce the lower iron with 16.71 µg EAA / ml relative to that of M. pubescens extract with 33.55 µg EAA / ml .

The antibacterial tests carried out in this work showed an appreciable antimicrobial effect of M. pubescens and B.cinereasur plants on microbial strains: E.Coli Gram-S. aureus Gram + P.aeruginosa Gram- .

Key words: Matricariapubescens, Brocchiacinerea, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity. antibacterial