



Identification des interactions flavonoïde-flavonoïde par évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant de mélanges binaires

Nabomo Hien, Jean Claude W. Ouédraogo, Yvonne L. Bonzi Coulibaly*

Laboratoire de Chimie Analytique, Environnementale et Bio-Organique, Université Joseph KI-ZERBO, 03 BP 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso

Reçu: 18 Septembre 2023 / Reçu sous sa forme révisée: 20 Décembre 2023 / Accepté: 27 Décembre 2023

Résumé :

Les flavonoïdes co-présents dans un extrait de plante créent entre eux des interactions moléculaires. L'investigation de ces interactions flavonoïde-flavonoïde a été menée par l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des mélanges binaires de neuf flavonoïdes préparés dans du méthanol. La capacité antioxydante a été évaluée par deux méthodes spectrophotométriques avec le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS). Le pouvoir réducteur vis-à-vis de l'ion ferrique a été également évalué par la méthode « Ferric Reducing Antioxidant Power » (FRAP). À partir des valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀), les activités antioxydantes des différentes molécules ont été déterminées. Les valeurs obtenues permettent de classer les molécules en trois grands groupes : les flavonoïdes actifs (FA), les flavonoïdes moyennement actifs (FAM) et les flavonoïdes non actifs (FNA). La quercétine exhibe la plus grande valeur pour l'activité antioxydante avec des valeurs de IC₅₀ (μM) de 95,5 ± 0,3 ; 38,0 ± 0,4 et 32,2 ± 0,2 obtenues respectivement pour les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. À partir des indices de combinaison (CI) des mélanges binaires, l'interaction antagoniste a été plus observée avec la méthode DPPH, la synergie observée avec la méthode FRAP, tandis que la méthode ABTS est plus marquée avec les effets additifs. Ces tendances sont remarquables spécifiquement avec la quercétine et la catéchine qui appartiennent au groupe FA. En analyse ABTS, avec un CI = 0,74, l'effet le plus synergique, a été révélé pour le mélange binaire ériodictyol-hespérétine. L'effet antagoniste le plus fort est obtenu avec la combinaison apigénine-lutéoline-7-glucoside (CI = 1,72) en analyse DPPH. La glycosylation et la méthylation sont des facteurs structuraux favorables à l'antagonisme. La diversité des interactions entre flavonoïdes exprimée à travers les effets antagonistes ou synergiques, révélée par les capacités antioxydantes est à prendre en compte lors de mélanges d'extraits végétaux visés pour une application quelconque.

Mots-clés : Composés phénoliques ; Interaction ; Capacité antiradicalaire ; Réduction ; Combinaison binaire.

*Auteur correspondant:

Adresse e-mail: yvonne.bonzi@ujkz.bf (Y.L.B. Coulibaly)

Abstract :

Flavonoids co-present in plant extract create molecular interactions between themselves. Investigation of these flavonoid-flavonoid interactions was carried out by *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of binary mixtures with nine flavonoids prepared in methanol. Antioxidant capacity was assessed by two spectrophotometric methods using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Ferric reducing power was also assessed using Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method. Based on the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values, the antioxidant activities of the various molecules were determined. The different values of IC₅₀ obtained make it possible to classify the molecules into three main groups: active flavonoids (FA), moderately active flavonoids (FMA) and non-active flavonoids (FNA). Quercetin exhibits the highest value for antioxidant activity, with IC₅₀ values (μM) of 95.5 ± 0.3; 38.0 ± 0.4 and 32.2 ± 0.2 obtained for the DPPH, ABTS and FRAP methods, respectively. From the combination indices (CI) of binary mixtures, the antagonistic interaction was more observed with the DPPH method, the synergy interaction was observed with the FRAP method, while the ABTS method is more marked with additive effects. These trends are particularly noticeable with quercetin and catechin, both belonging to the FA group. In ABTS analysis, with a CI value of 0.74, the most synergistic effect was revealed by the binary mixture eriodictyol-hesperetin. The strongest antagonistic effect was obtained with the apigenin-luteolin-7-glucoside combination (CI = 1.72) in DPPH analysis. Glycosylation and methylation are structural factors favourable to antagonism. The diversity of flavonoid interactions expressed through antagonistic or synergistic effects revealed by antioxidant capacities should be taken into account when blending botanical extracts for application.

Keywords: Phenolic compounds; Interaction; Anti-radical capacity; Reduction; Binary combination.

1 Introduction

De nombreuses applications des plantes sont basées sur les propriétés biologiques attribuées aux molécules bioactives dénommées métabolites secondaires. Dans la large gamme de ces métabolites, figurent entre autres les terpénoïdes, les alcaloïdes, les composés phénoliques dont les flavonoïdes. La classe des flavonoïdes, constitue un important groupe de molécules naturelles présentes dans les différentes parties des plantes (feuilles, tiges, écorces, fruits) [1]. Les flavonoïdes sont habituellement classés en

flavonols, flavones, flavanones, flavan-3-ols, isoflavones, anthocyanidines, dihydroflavonols selon la définition stricte de l'IUPAC. De plus, ce sont des composés connus pour leurs propriétés antioxydantes, ou prooxydantes [2-5]. Cela justifie les nombreuses propriétés biologiques qu'ils exhibent : anti-inflammatoire, antivirale, bactéricide, anticancer, cardioprotecteur, etc. [6-8]. Ces composés peuvent également être utilisés comme biopesticides [9-12].

Différents mécanismes d'action sont proposés pour expliquer le pouvoir

antioxydant des flavonoïdes et ce, en relation avec le nombre de groupements OH disponibles sur les trois cycles caractéristiques des flavonoïdes [13, 14], l'arrangement de ces groupements et la présence d'une fonction C=O selon la figure 1 [15, 16].

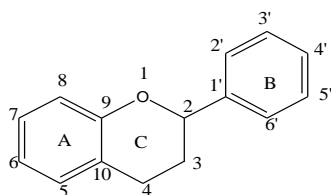


Fig. 1. Numérotation du squelette de base des flavonoïdes.

Dans un mélange où coexistent plusieurs flavonoïdes, des interactions moléculaires flavonoïde-flavonoïde ont été décrites par plusieurs auteurs [5, 17, 18]. Ces investigations ont conduit à des mises en évidence d'interactions complexes regroupées en effet additif, effet antagoniste et effet synergique sur le pouvoir antioxydant de mélanges. En effet, selon les méthodes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antioxydant, les concentrations et les types de molécules antioxydantes étudiées, des divergences sont relevées sur les effets observés. Malgré la grande diversité structurale des polyphénols, ces études sur l'interaction moléculaire ont concerné des acides phénoliques, des anthocyanidines et quelques sous-classes de flavonoïdes que sont les flavonols et les flavan-3-ols [17, 19]. Ainsi, les flavanones et les flavones présents dans diverses plantes exploitées en phytomédicaments [20] ou produits phytosanitaires [21] n'ont pratiquement pas fait l'objet d'études d'interactions moléculaires. Il s'avère utile d'étendre l'investigation des interactions

moléculaires à d'autres sous-classes de flavonoïdes notamment les flavanones et les flavones.

La présente étude a été initiée pour déceler les types d'interactions moléculaires flavonoïde-flavonoïde par un suivi du pouvoir antioxydant de mélanges binaires dans du méthanol. Elle a porté sur neuf (09) flavonoïdes appartenant aux sous-classes de type : flavonols, flavones, flavan-3-ols et flavanones. Le thymol, composé phénolique, est pris en compte dans l'étude car considéré comme un modèle réduit à un des cycles constitutifs de la structure de base d'une molécule de flavonoïde. L'objectif général de ce travail est de contribuer à la mise en évidence des interactions entre différents types de flavonoïdes afin de planifier des choix judicieux d'extraits végétaux pour la production de formulations potentiellement bioactives. Trois méthodes spectrophotométriques, à savoir le test au DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), le test ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) et le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ont été utilisées pour évaluer la capacité antioxydante de ces différents mélanges binaires. Les résultats obtenus sont comparés avec les pouvoirs antioxydants des standards pris seuls. En effet, ces méthodes couramment utilisées en raison de leur simplicité et leur sensibilité sont rapides et peu coûteuses [22-25]. La comparaison des activités antioxydantes de flavonoïdes simples et celles des mélanges binaires dans du méthanol permet le calcul d'indice de combinaison (CI) pour définir le type d'effet rencontré.

2 Matériel et méthodes

2.1 Produits chimiques

Les neuf flavonoïdes (standards) utilisés au cours de ce travail sont les suivants : la quercétine dihydratée (Merck, Art 7546 Germany), la rutine hydratée (Sigma Aldrich, 94%), la lutéoline-7-glucoside (Sigma Aldrich, 98%), l'apigénine (Apollo Scientific, 95%), l'héspéridine (Sigma Aldrich, 80%), l'héspéritine (Alfa Aesar, 97%), l'ériodictyol (ACROS Organic, 94%), la naringine hydratée (Alfa Aesar, 98%) et la catéchine hydratée (ACROS Organic, 98%). Les autres composés et réactifs utilisés sont : le thymol (Alfa Aesar, 98%), le trolox (Sigma Aldrich, 97%) choisi comme composé de référence, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le 2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine (TPTZ), l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), l'acétate de sodium trihydraté ($C_2H_3NaO_2, 3H_2O$), tous de marque Sigma Aldrich, l'acide acétique glacial (VWR Chemicals, 100%) et le trichlorure de fer hexahydraté ($FeCl_3, 6H_2O$) de Carlo Erba. Le méthanol (CHEM-LAB, 99,99% grade HPLC) a été utilisé comme solvant.

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation des solutions méthanoliques de flavonoïdes

Des solutions mères de concentrations 100 mM pour l'apigénine et la naringine, et de 1 mM pour les huit

autres composés phénoliques ainsi que le trolox, ont été préparées en dissolvant la masse appropriée de chaque standard dans du méthanol. Pour cette préparation de solutions méthanoliques, les quantités prélevées de flavonoïdes peu solubles dans le méthanol ont été préalablement dissoutes dans du DMSO. Il s'agit de 1 mL pour la lutéoline-7-glucoside et l'ériodictyol) et de 4 mL pour l'apigénine et la naringine qui exigent une préparation à de très fortes concentrations avant d'atteindre le volume final (10 mL) en complétant avec du méthanol. Des solutions diluées ont été préparées à des gammes de concentrations permettant d'obtenir une activité mesurable, pour chaque composé et selon la méthode d'investigation. Les modes de préparations sont fournis dans le tableau 1.

Par la suite, les combinaisons binaires ont été réalisées en mélangeant à volume égal les solutions diluées dans l'ordre croissant de concentration. Ce qui conduit aux ratios de concentration dans les mélanges binaires : 1:1, 1:10, 1:100 et 1:1000 pour le test au DPPH ; 1:1, 1:2, 1:4 et 1:8 pour la méthode ABTS ; 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 et 1:100 pour la méthode FRAP. Les gammes de concentrations obtenues à l'issue des préparations sont fournies dans le tableau 1.

2.2.2 Évaluation de la capacité antioxydante

Dans la présente étude, la concentration de la solution de DPPH a été de 100 μ M selon Danijela *et al.* [26] et le temps d'incubation a été de 2 h pour toutes les méthodes (DPPH, ABTS et FRAP).

Tableau 1

Gamme de concentrations préparées selon le composé étudié et la méthode d'évaluation.

Flavonoïde	Méthode DPPH	Méthode ABTS	Méthode FRAP
Quercétine, rutine, catéchine, ériodictyol, lutéoline-7-O-glucoside	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µM	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µM	20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µM
Hespérétine, hespéridine, thymol	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 µM	20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µM	100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 µM
Naringine	10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000 µM	40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 µM	2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000, 4 500, 5 000 µM
Apigénine			1 000, 1 250, 1 500, 1 750, 2 000, 2 250, 2 500 µM

2.2.2.1 Test de réduction du radical DPPH

Les capacités antioxydantes des solutions diluées des standards et de leurs mélanges binaires ont été déterminées par la méthode de DPPH ajustée à l'utilisation des microplaques [27] avec de légères modifications. Dans un Eppendorf contenant un volume de 40 µL de solution diluée de standard (10-70000 µM) ou de mélange binaire (10-70000 µM), un volume de 560 µL de solution méthanolique de DPPH• (100 µM) fraîchement préparée est ajouté. Le mélange réactionnel a été agité quelques secondes puis incubé à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 2 h. Un volume de 300 µL a été transféré dans un puit de microplaque et la lecture de l'absorbance a été faite à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de marque SPECTRO star NANO. Un volume de 300 µL de la solution de DPPH• (100 µM) a été utilisé pour analyse comme blanc. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• a été calculé selon l'équation (1).

$$\%DPPH_{inhibition} = \frac{A_{DPPH} - A_{flavonoïde(s)+DPPH}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

où A_{DPPH} est l'absorbance de la solution méthanolique de DPPH• et $A_{flavonoïde(s)+DPPH}$ est l'absorbance de la solution de DPPH• après réaction avec le(s) standard(s). Les pourcentages d'inhibition ont été par la suite représentés en fonction des concentrations de flavonoïde(s), puis en utilisant l'équation de régression $y=k \times C_{flavonoïde(s)} + m$, la valeur IC_{50} (concentration initiale de flavonoïde(s) nécessaire pour inhiber 50% de la concentration de la solution du DPPH•) a été calculée en remplaçant "y" par la valeur 50 dans l'équation de régression et la valeur de $C_{flavonoïde(s)}$ est déduite. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicata.

2.2.2.2 Test de réduction du radical ABTS^{•+}

Le test de réduction du radical $ABTS^{•+}$ a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Chen *et al.* [28] avec de légères modifications. Le cation radical $ABTS^{•+}$ a été généré en mélangeant une solution aqueuse de persulfate de sodium (2,45 mM) à une solution aqueuse d'ABTS (7 mM).

Le mélange est incubé durant 16 h à la température ambiante à l'abri de la lumière. La solution du cation $ABTS^+$ a été pré-diluée dans du méthanol pour obtenir une absorbance de $0,703 \pm 0,002$ à 745 nm [29]. Dans un Eppendorf contenant un volume de 40 μ L de solution diluée de standard (5-280 μ M) ou de mélange binaire (5-280 μ M), 2x280 μ L de solution d'ABTS fraîchement préparée est ajouté. Le mélange réactionnel a été agité quelques secondes puis incubé à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 2 h. Un volume de 300 μ L a été transféré dans un puit de microplaque et la lecture de l'absorbance a été faite à 745 nm [29]. Un volume de 300 μ L de la solution du radical $ABTS^+$ a été utilisé pour analyse comme blanc. Le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ a été calculé selon l'équation (2).

$$\%ABTSinhibition = \frac{A_{ABTS} - A_{flavonoïde(s)+ABTS}}{A_{ABTS}} \times 100 \quad (2)$$

où A_{ABTS} est l'absorbance de la solution d'ABTS dissous dans du méthanol et $A_{flavonoïde(s)+ABTS}$ est l'absorbance de la solution d'ABTS après réaction avec le(s) flavonoïde(s). Les pourcentages d'inhibition ont été par la suite représentés en fonction des concentrations de flavonoïde(s), puis en utilisant l'équation de régression $y=k \times C_{flavonoïde(s)} + m$, la valeur IC_{50} (concentration de flavonoïde(s) nécessaire pour inhiber 50% de la concentration de la solution d'ABTS) a été calculée en remplaçant "y" par la valeur 50 dans l'équation de régression et la valeur de $C_{flavonoïde(s)}$ est déduite. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicata.

2.2.2.3 Test de FRAP

Le test FRAP a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Chen *et al.* [28] avec de légères modifications. Le réactif du test FRAP a été préparé en mélangeant une solution de 300 mM de tampon d'acétate (pH = 3,6), de 10 mM de TPTZ dans 40 mM de HCl et 20 mM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ au ratio 10:1:1 v/v/v. Dans un Eppendorf contenant un volume de 40 μ L de solution diluée de standard (20-5000 μ M) ou de mélange binaire (20-5000 μ M), un volume de 560 μ L de solution de réactif du test FRAP fraîchement préparée est ajouté. Le mélange réactionnel a été agité quelques secondes puis incubé à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 2 h. Un volume de 300 μ L a été transféré dans un puit de microplaque et la lecture de l'absorbance a été faite à 595 nm. Un volume de 300 μ L de la solution du réactif de FRAP a été utilisé pour analyse comme blanc. Le pourcentage de réduction de la solution du réactif de FRAP (équivalent du pourcentage d'inhibition dans les méthodes DPPH et ABTS) a été calculé selon l'équation (3).

$$\%FRAPréduction = \frac{A_{flavonoïde(s)+FRAP} - A_{FRAP}}{A_{flavonoïde(s)+FRAP}} \times 100 \quad (3)$$

où A_{FRAP} est l'absorbance de la solution de FRAP et $A_{flavonoïde(s)+FRAP}$ est l'absorbance de la solution du réactif de FRAP après réaction avec le(s) flavonoïde(s). Les pourcentages de réduction ont été par la suite représentés en fonction des concentrations de flavonoïde(s), puis en utilisant l'équation de régression $y=k \times C_{flavonoïde(s)} + m$, la valeur IC_{50} (concentration de flavonoïde (s) nécessaire pour réduire à 50% la concentration de la solution de FRAP) a été calculée en remplaçant "y" par la valeur 50 dans

l'équation de régression et la valeur de $C_{\text{flavonoïde(s)}}$ est déduite. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicata.

2.3 Analyse des interactions moléculaires

Les interactions entre les flavonoïdes ont été évaluées par l'interprétation des valeurs de l'indice de combinaison selon Chou *et al.* [30]. Pour ce faire, l'indice de combinaison noté CI (Combination Index) en anglais, pour ne pas confondre avec la notation IC_{50} , a été calculé préalablement en adaptant la formule de Novotny *et al.* [31] aux valeurs de IC_{50} , selon l'équation (4).

$$CI = \frac{a.(IC_{50} AB)}{(a+b)(IC_{50} A)} + \frac{b.(IC_{50} AB)}{(a+b)(IC_{50} B)} \quad (4)$$

où « $IC_{50} AB$ », « $IC_{50} A$ », et « $IC_{50} B$ » sont respectivement les concentrations du mélange binaire (A et B), de A et de B, nécessaires pour inhiber 50% de la concentration initiale du réactif (DPPH, ABTS, FRAP). $a:b$ représente le ratio de concentrations respectivement de A et B dans le mélange binaire. Les effets de synergie, d'antagonisme ou additif ainsi que l'ampleur de l'effet : faible, modéré, fort et très fort ont été distingués selon le classement proposé par Chou *et al.* [30] : $0 < CI < 0,1$ (Synergie très forte), $0,1 < CI < 0,3$ (Synergie forte), $0,3 < CI < 0,7$ (Synergie), $0,7 < CI < 0,85$ (Synergie modérée), $0,85 < CI < 0,90$ (Synergie faible), $0,90 < CI < 1,10$ (Additif), $1,10 < CI < 1,20$ (Antagonisme faible), $1,20 < CI < 1,45$ (Antagonisme modéré), $1,45 < CI < 3,3$ (Antagonisme), $3,3 < CI < 10$ (Antagonisme fort), $CI > 10$ (Antagonisme

très fort). La gamme contient onze (11) effets au total.

3 Résultats et discussion

Les résultats présentés portent sur neuf (09) flavonoïdes repartis en quatre (04) sous-classes et le thymol.

3.1 Capacité antioxydante des standards

Les capacités antioxydantes des flavonoïdes et du thymol ont été évaluées par les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. Les résultats sont exprimés en IC_{50} (μM de flavonoïde) et les valeurs sont consignées dans le tableau 2. La valeur IC_{50} du trolox considéré comme standard de référence, a été également évaluée dans les mêmes conditions.

Plus la valeur de IC_{50} est faible plus la capacité antioxydante est élevée. Ainsi, des trois méthodes DPPH, ABTS et FRAP, la quercétine est le composé le plus actif avec des valeurs de IC_{50} (μM) respectivement de $95,5 \pm 0,3$; $38,0 \pm 0,4$ et $32,2 \pm 0,2$.

L'apigénine est le composé le moins actif selon le test au DPPH, tandis que la naringine est le composé qui exhibe la plus faible activité antioxydante aussi bien avec le test ABTS qu'avec le test FRAP. Le trolox, standard de référence, s'est révélé moins inhibiteur comparé à la quercétine, la rutine, la catéchine, la lutéoline-7-glucoside et l'ériodictyol. Il est par contre plus inhibiteur que l'hespérétine, l'hespéridine, la naringine, l'apigénine et le thymol.

Tableau 2

Valeurs de IC₅₀ du trolox, des flavonoïdes et du thymol (IC₅₀ (μM) ± SD).

Méthode Composé	DPPH	ABTS	FRAP
Trolox (Tr)	335 ± 2	210 ± 1	169 ± 1
Quercétine (Q)	95,5 ± 0,3	38,0 ± 0,4	32,2 ± 0,2
Rutine (R)	114,7 ± 0,4	38,7 ± 0,4	48,9 ± 0,1
Catéchine (Cat)	99 ± 1,3	46 ± 1	67 ± 1
Lutéoline (LG)	104,9 ± 0,7	38,5 ± 0,3	39,3 ± 0,2
Eriodictyol (Er)	177 ± 2	77 ± 1	54 ± 1
Hespérétine (Ht)	804 ± 33	124 ± 2	191,6 ± 0,9
Hespéridine (Hd)	1252 ± 43	129 ± 2	162 ± 3
Naringine (N)	56805 ± 216	271 ± 2	6047 ± 95
Apigénine (A)	155343 ± 745	242 ± 4	1476 ± 19
Thymol (T)	1777 ± 80	136 ± 2	308 ± 4

Les ordres suivants en termes de capacité antioxydante ont été observés pour :

- la méthode DPPH : quercétine > catéchine > lutéoline-7-glucoside > rutine > ériodictyol > trolox > hespérétine > hespéridine > thymol > naringine > apigénine ;

- la méthode ABTS : quercétine ≈ rutine ≈ lutéoline-7-glucoside > catéchine > ériodictyol > hespérétine > hespéridine > thymol > trolox > apigénine > naringine ;

- la méthode FRAP : quercétine > lutéoline-7-glucoside > rutine > ériodictyol > catéchine > hespéridine > hespérétine > thymol > apigénine > naringine.

Au regard des trois ordres de positionnement des flavonoïdes et peu importe la méthode, la quercétine, la catéchine, la rutine, la lutéoline-7-glucoside et l'ériodictyol, sont plus actifs que le trolox (standard de référence). Par contre, la naringine et l'apigénine, sont moins actifs que le trolox. L'hespérétine, l'hespéridine et le thymol présentent des positions variables par rapport au trolox ; ils sont à des positions intermédiaires entre les deux précédentes séries des composés à savoir

ceux à activité antioxydante élevée et ceux qui sont moins actifs. Une classification des dix (10) composés étudiés en trois groupes a été suggérée pour prendre en compte les tendances observées selon les trois méthodes d'évaluation. Le premier groupe est constitué de flavonoïdes considérés actifs (FA) : la quercétine, la rutine, la catéchine, la lutéoline-7-glucoside, l'ériodictyol. Le deuxième groupe est constitué de flavonoïdes modérément actifs appelés flavonoïdes actifs modérés (FAM) : l'hespéridine, l'hespérétine. Le troisième groupe est constitué de flavonoïdes non actifs (FNA) : la naringine, l'apigénine. Le thymol se classe dans le groupe FAM, quelle que soit la méthode d'analyse.

Des études antérieures réalisées par test DPPH, ont rapporté une activité antioxydante plus forte pour : la quercétine, la catéchine et la rutine, tandis que la naringine et l'apigénine ont été observées être des flavonoïdes non actifs [15, 28, 32]. Les résultats de la présente étude, réalisée par trois méthodes d'évaluation (DPPH, FRAP et ABTS), permettent d'affiner le classement en dégageant le groupe FAM

(flavonoïdes actifs modérés): l'hespéridine, l'hespérétine et du thymol (composé phénolique).

Le regroupement en FA, FAM et FNA révèle mieux les caractéristiques structurales à forte capacité antioxydante décrites dans la littérature [15, 28]. L'observation des structures des flavonoïdes investigués et présentés sur la figure 2, révèle la présence du groupement catéchol sur les structures de tous les flavonoïdes du groupe FA ; ce qui confirme le caractère primordial du groupement catéchol pour l'activité antioxydante dans le cas des flavonoïdes [15, 28, 32]. Bien qu'il soit connu que la glycosylation atténue la

capacité antioxydante, la rutine et la lutéoline-7-glucoside, flavonoïdes glycosylés restent classés dans le groupe des composés actifs. Cela traduit aussi la forte contribution de groupement catéchol dans la propriété antioxydante. En fait, le caractère atténuant de la glycosylation est perceptible seulement entre deux composés qui ne diffèrent structurellement que par le glycoside. Il en est de même pour la méthylation. Ainsi, la méthylation du groupement catéchol justifie le classement de l'hespérétine comme flavonoïde modéré comparativement à son homologue non glycosylé, l'ériodictyol classé dans le groupe FA.

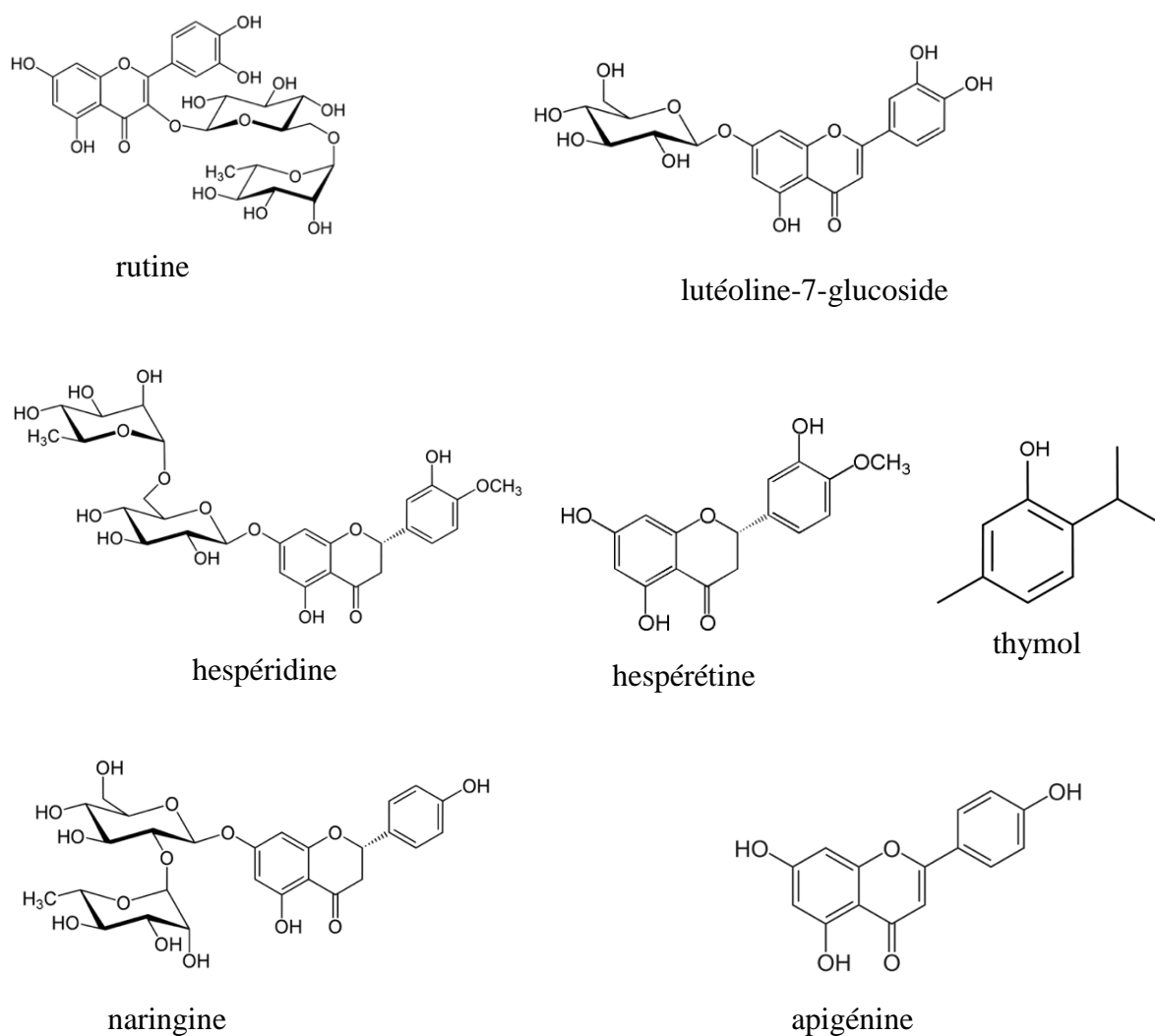


Fig. 2. Structures des flavonoïdes investigués et du thymol.

L'apigénine et la naringine ne confirment pas l'hypothèse de corrélation de la capacité antioxydante avec le nombre d'hydroxyles telle que mentionnée dans diverses études [15, 32, 33]. L'apigénine est supposée manifester un pouvoir pro-oxydant en produisant d'abord, suite à son oxydation, un radical phénoxy qui peut par la suite servir d'oxydant. Le pouvoir antioxydant est considéré également comme dépendant de la structure moléculaire et de la concentration de flavonoïdes étudiés. A des concentrations de 0 à 200 μM , les flavanones (naringine et hespéridine) ne permettent pas de détecter H_2O_2 issu de la réduction de O_2 [34]. Selon les travaux rapportés dans la littérature, la comparaison entre les potentiels redox, évalués par électrochimie (considérée comme une méthode très précise), et les données de capacités antioxydantes évaluées par les méthodes DPPH, ABTS ou FRAP, révèle des similitudes [35, 36]. Jiao *et al.* [36] ont mené l'analyse avec un extrait de fruit Kiwi : *Actinidia deliciosa* de la famille des Actinidiaceae. Ils ont observé des corrélations entre la teneur en flavonoïdes totaux et la capacité antioxydante mesurée par ABTS ($r = 0,959$) et FRAP ($r = 0,950$) et surtout entre les valeurs de l'activité antioxydante mesurées par la voltammétrie cyclique et celles obtenues par les méthodes spectrophotométriques ABTS ($r = 0,993$), DPPH ($r = 0,961$) et FRAP ($r = 0,902$). Firuzi *et al.* [35] ont également relevé une bonne corrélation entre les mesures de l'activité antioxydante réalisée par le test FRAP et les résultats électrochimiques obtenus par analyse du potentiel d'oxydation en voltammétrie cyclique. Les tendances observées sur l'ordre des pouvoirs antioxydants des composés

étudiés permettent de les répartir en groupes FA, FAM et FNA avec les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. Ces tendances similaires aux trois méthodes d'évaluation indiquent qu'elles peuvent donc être utilisées pour apprécier les interactions intermoléculaires sur le pouvoir antioxydant.

3.2 Capacité antioxydante des combinaisons binaires – analyse des interactions moléculaires

Les capacités antioxydantes des composés individuels ainsi que celles de leurs combinaisons binaires ont été évaluées et exprimées en IC_{50} (μM de flavonoïde(s)). Les données sont fournies en Annexe. Ensuite, les indices de combinaison (CI) ont été calculés selon la méthode de Novotny *et al.* [31] et sont reportés dans le tableau 3 pour les quarante-cinq (45) combinaisons binaires. Les effets synergique (+), antagoniste (–) et additif (0) avec les indications faible (^f) et modéré (^m) sont obtenus selon la méthode proposée par Chou *et al.* [30] et sont reportés dans les figures 3, 4 et 5. Pour rappel, les effets synergique, additif et antagoniste correspondent aux intervalles de CI sont définis respectivement comme suit : $0 < \text{CI} < 0,9$; $0,9 < \text{CI} < 1,10$ et $\text{CI} > 1,10$. Pour toutes les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et tous les cas de combinaisons binaires, les valeurs de CI sont comprises entre 0,74 et 1,72. Ce qui couvre la gamme de six interactions : i) synergique modéré, ii) synergique faible, iii) additive, iv) antagoniste faible, v) antagoniste modéré et vi) antagoniste. L'effet additif reste un effet normal qui

n'indique pas d'interaction entre les molécules.

Tableau 3

Valeurs de CI des combinaisons binaires.

Combinaison binaire	DPPH	ABTS	FRAP	Combinaison binaire	DPPH	ABTS	FRAP
Q-R	1,02	0,97	0,93	Cat-T	1,15	1,01	0,84
Q-Cat	1,14	0,88	0,87	LG-Er	1,20	1,09	0,86
Q-LG	0,99	0,91	0,82	LG-Ht	1,61	0,99	0,90
Q-Er	1,05	0,91	0,83	LG-Hd	1,72	0,98	0,86
Q-Ht	1,39	0,96	0,83	LG-N	1,03	1,14	0,97
Q-Hd	1,27	0,89	0,90	LG-A	0,97	1,40	1,08
Q-N	1,11	0,94	1,01	LG-T	1,71	1,02	1,12
Q-A	1,18	1,03	1,23	Er-Ht	1,02	0,74	1,03
Q-T	1,26	0,95	1,04	Er-Hd	1,25	0,80	1,03
R-Cat	0,88	1,01	0,98	Er-N	0,87	0,80	1,03
R-LG	0,92	1,07	0,93	Er-A	1,04	0,87	1,17
R-Er	0,84	1,02	0,89	Er-T	1,05	1,06	0,89
R-Ht	1,50	0,91	1,00	Ht-Hd	1,00	0,96	0,88
R-Hd	1,14	0,98	0,88	Ht-N	1,29	1,29	0,98
R-N	1,10	1,25	0,95	Ht-A	1,30	1,23	1,28
R-A	0,98	1,21	1,02	Ht-T	1,01	0,91	0,89
R-T	1,21	1,08	1,10	Hd-N	1,14	1,20	0,93
Cat-LG	1,11	1,10	0,88	Hd-A	1,24	1,30	0,95
Cat-Er	0,95	0,82	0,77	Hd-T	0,96	0,92	0,81
Cat-Ht	1,45	1,01	0,79	N-A	0,89	1,10	0,99
Cat-Hd	1,16	1,00	0,85	N-T	1,10	0,96	0,86
Cat-N	1,18	0,92	0,78	A-T	1,13	1,07	0,90
Cat-A	1,08	1,08	1,01				

Q : quercétine ; R : rutine ; Cat : catéchine ; LG : lutéoline-7-glucoside ; Ht : hespérétine ; Hd : hespéridine ; N : naringine ; A : apigénine ; T : thymol

Q										
R	0									
Cat	- ^f	+ ^f								
LG	0	0	- ^f							
Er	0	+ ^m	0	- ^f						
Ht	- ^m	-	- ^m	-	0					
Hd	- ^m	- ^f	- ^f	-	- ^m	0				
T	- ^m	- ^m	- ^f	-	0	0	0			
N	- ^f	-	- ^f	0	+ ^f	- ^m	- ^f	0		
A	- ^f	0	0	0	0	- ^m	- ^m	- ^f	+ ^f	
	Q	R	Cat	LG	Er	Ht	Hd	T	N	A

Fig. 3. Types d'interactions obtenus par la méthode DPPH.

Q : quercétine ; R : rutine ; Cat : catéchine ; LG : lutéoline-7-glucoside ; Ht : hespérétine ; Hd : hespéridine ; N : naringine ; A : apigénine ; T : thymol.

(+) : synergie ; (-) : antagonisme ; (0) : additif ; (^m) : modéré ; (^f) : faible.

Les effets synergiques sont traduits par la couleur verte et les effets antagonistes sont signalés par la couleur orange.

Q										
R	0									
Cat	+ ^f	0								
LG	0	0	0							
Er	0	0	+ ^m	0						
Ht	0	0	0	0	+ ^m					
Hd	+ ^f	0	0	0	+ ^m	0				
T	0	0	0	0	0	0	0			
N	0	- ^m	0	- ^f	+ ^m	- ^m	- ^f	0		
A	0	- ^m	0	- ^m	+ ^f	- ^m	- ^m	0	0	
	Q	R	Cat	LG	Er	Ht	Hd	T	N	A

Fig. 4. Types d'interactions obtenus par la méthode ABTS.

Q : quercétine ; R : rutine ; Cat : catéchine ; LG : lutéoline-7-glucoside ; Ht : hespérétine ; Hd : hespéridine ; N : naringine ; A : apigénine ; T : thymol.

(+) : synergie ; (-) : antagonisme ; (0) : additif ; (^m) : modéré ; (^f) : faible.

Le code de couleur choisi est le même que précédemment.

Q										
R	0									
Cat	+ f	0								
LG	+ m	0	+ f							
Er	+ m	+ f	+ f	+ f						
Ht	+ m	0	+ f	0	0					
Hd	0	+ m	+ f	+ f	0	+ f				
T	0	0	+ m	- f	+ f	+ f	+ m			
N	0	0	+ m	0	0	0	0	+ f		
A	- m	0	0	0	- f	- m	0	0	0	
	Q	R	Cat	LG	Er	Ht	Hd	T	N	A

Fig. 5. Types d'interactions obtenus par la méthode FRAP.

Q : quercétine ; R : rutine ; Cat : catéchine ; LG : lutéoline-7-glucoside ; Ht : hespérétine ; Hd : hespéridine ; N : naringine ; A : apigénine ; T : thymol.

(+) : synergie ; (-) : antagonisme ; (0) : additif ; (^m) : modéré ; (^f) : faible.

Tout comme pour les figures 3 et 4, les effets synergiques et antagonistes sont respectivement mis en évidence par les couleurs verte et orange.

Au regard des résultats reportés dans le tableau 3 et organisées sur les figures 3, 4 et 5, les capacités antioxydantes évaluées par les trois méthodes révèlent les trois effets : additif, synergique ou antagoniste.

Cependant, aucune méthode ne présente les effets fort et très fort synergique ou antagoniste. Le test au DPPH révèle des effets à un degré plus élevé (+ ou -) comparativement aux autres méthodes ABTS et FRAP qui ne présentent que des effets modérés (+^m ou -^m) et faibles (+^f ou -^f).

L'interprétation des résultats n'est pas simple au regard des divergences observées sur les effets issus des interactions dans un même système binaire. Pour l'exemple du mélange binaire : ériodictyol-hespérétine, CI est respectivement égal à 0,74 pour le

test ABTS (synergisme modéré), 1,02 pour le test DPPH (additif) et 1,03 pour le test FRAP (additif). La combinaison binaire quercétine-rutine présente un effet additif avec les trois méthodes alors que le mélange quercétine-catéchine est antagoniste en analyse DPPH et synergique avec les méthodes ABTS et FRAP. Toutes ces divergences indiquent la complexité des interactions qui varient avec la méthode d'évaluation lors d'une analyse comparative.

Cependant, en considérant les résultats obtenus pour les trois méthodes en termes d'effets, et en se basant sur les indices de combinaison du tableau 3, il est possible de dégager des tendances selon les méthodes et entre les flavonoïdes.

De façon générale, la méthode DPPH enregistre le plus d'effets antagonistes, la méthode FRAP révèle le plus d'effets synergiques et la méthode ABTS est plus marquée par les effets additifs. Ces tendances sont remarquables pour les mélanges avec la quercétine ou la catéchine. Hidalgo *et al.* [17] avaient également observé majoritairement des effets synergiques avec la méthode FRAP et des effets antagonistes avec la méthode DPPH. Heo *et al.* [37] n'avaient observé aucun effet synergique avec la méthode ABTS.

De l'analyse des effets enregistrés selon la spécificité structurale de chaque flavonoïde, certains constats peuvent être faits. Il s'agit de :

- l'effet additif récurrent des combinaisons quercétine-rutine (Q-R), rutine-lutéoline-7-O-glucoside (R-LG) et catéchine-apigénine (Cat-A) ;
- l'effet antagoniste récurrent de la combinaison hespérétine-apigénine (Ht-A) ;
- la quasi similitude des effets de l'apigénine et de la naringine (flavonoïdes non-actifs) avec les autres molécules, à quelques exceptions près ;
- l'effet de synergie plus observé pour les mélanges incluant la quercétine, la catéchine et l'ériodictyol (flavonoïdes actifs et aglycones) ;
- l'effet d'antagonisme plus observé pour les mélanges entre composés de deux groupes différents (FA, FAM, FNA) ;
- les types d'effets observés (synergique ou antagoniste) sont dépendants des formes glycosylées ou aglycones. En effet, en dehors du binaire quercétine-catéchine, tous les autres binaires à effet antagoniste possèdent un composé O-glycosylé ou O-méthylé. Les quelques effets antagonistes observés avec la méthode ABTS concernent

également des mélanges comportant un composé O-glycosylé ou O-méthylé. Ces observations indiquent que la glycosylation et la méthylation, connus comme facteurs atténuant la capacité antioxydante ont induit l'effet antagoniste [15]. Palafox *et al.* [38] ayant obtenu également des effets antagonistes avec toutes les combinaisons incluant l'acide vanillique qui comporte un groupement O-méthylé dans sa structure, ont conclu que ce groupement serait responsable de la faible réactivité des mélanges.

Les tendances des effets semblent ne pas être dictées par la classe de flavonoïde mais plutôt en lien avec le pouvoir antioxydant et donc des groupes (FA, FAM et FNA). Cependant, quelques effets antagonistes sont observés par la méthode DPPH pour les binaires : quercétine-catéchine et quercétine-apigénine, qui ne sont ni glycosylés ni méthylés. En outre, les binaires ériodictyol-naringine et naringine-apigénine, qui impliquent un composé glycosylé (la naringine) ont présenté un effet synergique plutôt faible. La glycosylation et la méthylation des molécules ne sont pas donc les seuls facteurs justifiant l'effet antagoniste. Cela indique que l'interaction n'est pas prévisible sur seulement la base des pouvoirs antioxydants des composés individuels. Hidalgo *et al.* [17] ont reporté également un effet antagoniste pour la combinaison quercétine-myricétine (composés à forte capacité antioxydante) avec la méthode DPPH. Dans la littérature, une synergie antioxydante est supposée se produire lorsque deux antioxydants mélangés présentent: (i) une action régénératrice de l'antioxydant le plus faible par l'antioxydant le plus fort d'une part et d'autre part, (ii) des mécanismes d'action

coopératifs (chélateur de métaux ou piègeur de radicaux) dans leur fonctionnement. Pour ce qui concerne l'interaction antagoniste, il est induit par la régénération de l'antioxydant le moins efficace par l'antioxydant le plus efficace, par la compétition entre la formation d'adduits antioxydants-radicaux, et la modification du microenvironnement selon Apak *et al.* [39].

Ainsi, la glycosylation, la méthylation sont à considérer comme des facteurs de changement d'environnement moléculaire. La tendance générale de l'effet synergique observée par la méthode FRAP est opposée à celle antagoniste observée par la méthode DPPH. Cela pourrait s'expliquer par les différents types de mécanisme mis en jeu dans chaque méthode. En effet, la réaction mise en jeu dans le test DPPH est basée sur un mode mixte de transfert d'atome d'hydrogène et d'électron en milieu neutre, tandis que la méthode FRAP réalisée en milieu acide, implique le transfert d'un électron et ce au niveau d'un ion ferrique Fe (III) complexé dans une molécule de grande taille. Un changement d'environnement en lien avec l'acidité du milieu, peut justifier les divergences rencontrées dans l'étude des mélanges binaires [25].

4 Conclusion

La compréhension des interactions moléculaires dans les mélanges binaires de flavonoïdes avec le méthanol comme solvant, a été abordée à travers l'évaluation de la capacité antioxydante. Ces mélanges sont basés sur neuf (09) flavonoïdes repartis en quatre (04) sous-classes : flavonols (quercétine et rutine), flavones (luteolin-7-

glucoside et apigénine), flavanones (hespéridine, hespérétine, ériodictyol et naringine), flavan-3-ol (catéchine), et un phénol (thymol). La mise en évidence des effets additif, de synergie ou d'antagonisme a été investiguée par les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. L'évaluation de pouvoir antioxydant par ces trois méthodes montrent des similitudes dans l'analyse des standards de flavonoïdes et du thymol. Les valeurs des activités antioxydantes obtenues pour les différentes molécules sont en relation avec leurs groupements fonctionnels. Le groupement catéchol facteur primordial pour l'activité antioxydante, est l'élément commun aux quatre flavonoïdes suivants : quercétine, rutine, catéchine, lutéoline-7-glucoside, ériodictyol. La quercétine s'est montrée la plus active.

Les valeurs d'indices de combinaisons obtenues par les trois méthodes DPPH, ABTS et FRAP montrent que les flavonoïdes et le thymol en mélange peuvent présenter les trois effets suivants: synergique, antagoniste et additif. Par la méthode DPPH, les mélanges binaires présentent majoritairement l'effet antagoniste excepté les mélanges ériodictyol-naringine et naringine-apigénine qui ont un effet synergique. Le mélange ériodictyol-hespérétine présente l'effet le plus synergique (CI = 0,74) obtenu en analyse ABTS et l'effet le plus antagoniste est obtenu en analyse DPPH avec la combinaison hespéridine-lutéoline-7-O-glucoside (CI = 1,72). L'influence atténuante de la glycosylation et de la méthylation du groupement catéchol sur la capacité antioxydante des flavonoïdes favorise l'effet antagoniste. Les méthodes de DPPH et de FRAP sont indiquées pour

accompagner les études d'interaction moléculaire.

Remerciements

Les auteurs remercient International Science Programme (ISP) de l'Université d'Uppsala (Suède) pour le soutien financier à travers le projet BUF:01 IPICS.

Références bibliographiques

- [1] M. Khalid, M. Bilal, H. Dan-feng, *Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens - A review*, J. Integr. Agric. 18(1) (2019) 211–230.
- [2] R.D. Corral-Aguayo, E.M. Yahia, A. Carrillo-Lopez, G. Gonzalez-Aguilar, *Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops*, J. Agric. Food Chem. 56(22) (2008) 10498–10504.
- [3] D. Procházková, I. Bou, N. Wilhelmová, *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Fitoterapia 82(4) (2011) 513–523.
- [4] M. Plaza, T. Pozzo, J. Liu, K.Z. Gulshan Ara, C. Turner, E. Nordberg Karlsson, *Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids*, J. Agric. Food Chem. 62(15) (2014) 3321–3333.
- [5] M. Olszowy-tomczyk, *Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures*, Phytochem. Rev. 19 (2020) 63-103.
- [6] S. Kumar, A.K. Pandey, *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*, Sci. World J. (2013) 162750. DOI: 10.1155/2013/162750.
- [7] D. Tungmunthum, A. Thongboonyou, A. Pholboon, *Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview*, Medicines 5(93) (2018) 1–16. DOI: 10.3390/medicines5030093
- [8] T. Wang, Q. Li, K. Bi, *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*, Asian J. Pharm. Sci. 13(1) (2018) 12–23.
- [9] O. Ilboudo, S. Bonzi, I. Tapsoba, I. Somda, Y. L. Bonzi-Coulibaly, *Activité antifongique in vitro des flavonoïdes diglycosides de Mentha piperita et de leur dérivé oxime contre deux champignons céréaliers*, Comptes Rendus Chim. 19 (2016) 857–862.
- [10] Y. Karanga, O. Ilboudo, S. Bonzi, I. Tapsoba, I. Somda, Y.L. Bonzi-Coulibaly, *Phytochemical and Antifungal Properties of Euphorbia hirta L against Fusarium moliniforme and Phoma sorghina*, Nat Prod Ind J. 13(1) (2017) 1–10.
- [11] P.S. Poka, V.A.G. Londoño, S. Vicente, S.M. Momero, A. Pacín, M.Tolaba, S.M. Alzamora, S.L. Resnik, *Evaluation of citrus flavonoids against Aspergillus parasiticus in maize: Aflatoxins reduction and ultrastructure alterations*, Food Chem. 318 (2020) 126414.
- [12] L. Schnarr, M.L. Segatto, O. Olsson, V.G. Zuin, K. Kümmerer, *Flavonoids as biopesticides – Systematic assessment of sources, structures, activities and environmental fate*, Sci. Total Environ. 824 (2022) 15378.

- [13] A. Moradi, H. Yousefi, D. Javidmehr, A. Karimollah, *Comparing the Effects of Kaempferol, Galangin and Apigenin Flavanoids on Basis of its Structural Differences in Increasing of Paraoxonase 1 Activity and Attenuating Oxidative Stress Markers in Rats*, Int. J. Med. Lab. 3(4) (2016) 241–248.
- [14] Y. Zheng, G. Deng, Q. Liang, D. Chen, R. Guo, R. Lai, *Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study*, Sci. Rep. 7(1) (2017) 7543. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08024-8>
- [15] C. Zheng, G. Li, H. Li, X. Xu, J. Gao, A. Zhang, *DPPH-Scavenging Activities and Structure-Activity Relationships of Phenolic Compounds*, Nat. Prod. Commun. 5(11) (2010) 1759–1765.
- [16] A. Zuo, Y. Yu, J. Li, B. Xu, X. Yu, Y. Qiu, S. Cao, *Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone*, Free Radic. Antioxid. 1(4) (2011) 39–47.
- [17] M. Hidalgo, C. Sánchez-Moreno, S. De Pascual-Teresa, *Flavonoid – flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity*, Food Chem. 121(3) (2010) 691–696.
- [18] S. Wang, D. Wang, Z. Liu, *Synergistic, additive and antagonistic effects of Potentilla fruticosa combined with EGb761 on antioxidant capacities and the possible mechanism*, Ind. Crop. Prod. 67 (2015) 227–238.
- [19] L.A. Tavadyan, S. H. Minasyan, *Synergistic and antagonistic co-antioxidant effects of flavonoids with trolox or ascorbic acid in a binary mixture*, J. Chem. Sci. 131(5) (2019) 1–11.
- [20] M.A. Farag, B. Abib, L. Ayad, A.R. Khattab, *Bioactives, nutrition, food quality, therapeutic merits and biowaste*, Food Chem. 331 (2020) 127306.
- [21] B. Izuogu, C. Azubuike, A.S. Hinmikaiye, A. Olarenwaju, *Comparative evaluation of powdered and aqueous extract of citrus peels and carbofuran in the management of root-knot nematode on infected cowpea field*, Agric. Conspec. Sci. 84(2) (2019) 173–178.
- [22] J. Sochor, M. Ryvolova, O. Krystofova, P. Salas, J. Hubalek, V. Adam, L. Trnkova, L. Havel, M. Beklova, J. Zehnalek, I. Provaznik and R. Kizek, *Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages*, Molecules 15(12) (2010) 8618–8640.
- [23] N. Alam, N.J. Bristi, *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*, Saudi Pharm. J. 21(2) (2013) 143–152.
- [24] K.M. Schaich, X. Tian, J. Xie, *Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays*, J. Funct. Foods 14 (2015) 111–125.
- [25] J. Rumpf, M. Schulze, *Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins*, Int. J. Biol. Macromol. 233 (2023) 123470.
- [26] V.K.D. Skroza, I.G. Mekinic, S.

- Svilovic, V. Simat, *Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures*, J. Food Compos. Anal. 38 (2015) 13–18.
- [27] A.L. Dawidowicz, M. Olszowy, M. Józwiak-Doleba, *Importance of solvent association in the estimation of antioxidant properties of phenolic compounds by DPPH method*, J Food Sci Technol. 52(7) (2015) 4523–4529.
- [28] X. Chen, Z. Deng, C. Zhang, S. Zheng, Y. Pan, H. Wang, *Is antioxidant activity activity of flavonoids mainly through the hydrogen-atom transfer mechanism?*, Food Res. Int. (2018) 11018.
- [29] J.W. Dong, L. Cai, Y. Xing, Z.T. Ding, *Re-evaluation of ABTS Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products*, Nat. Prod. Commun. 10(12) (2015) 2169–2172.
- [30] T. Chou, M. Sloan, K. Cancer, *Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and antagonism in drug combination studies*, Pharmacol. Rev. 58(3) (2006) 621-681.
- [31] B. Novotný, M. Nagy, *Synergy evaluation of non-normalizable dose-response data: Generalization of combination index for the linear effect of drugs*, Pharm. Stat. 20(6) (2021) 982-989.
- [32] R. Prasad, N. Koirala, J.H. Lee, H.C. Lee, J.K. Sohng, *Comparative Study of the Antioxidative Potential of Common Natural Flavonoids and Isoflavonoids*, Korean J. Microbiol. Biotechnol. 41(3) (2013) 367–371.
- [33] A. Andueza, A. García-Garzón, M.R. de Galarreta, E. Ansorena, M.J. Iraburu, M.J. López-Zabalza, J.J. Martínez-Irujo, *Oxidation pathways underlying the pro-oxidant effects of apigenin*, Free Radic. Biol. Med. 87 (2015) 169-180.
- [34] Gow-Chin Yen, Pin-Der Duh, *Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(6) (2003) 1215–1222.
- [35] O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso, *Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry*, Biochim. Biophys. Acta-General Subjects 1721 (2005) 174–184.
- [36] Y. Jiao, P.A. Kilmartin, M. Fan, S.Y. Quek, *Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with HPLC*, Food Chem. 268 (2018) 77–85.
- [37] H.J. Heo, Y.J. Kim, D. Chung, D.O. Kim., *Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system*, Food Chem. 104(1) (2007) 87–92.
- [38] H. Palafox-carlos, J. Gil-chávez, R.R. Sotelo-mundo, J. Namiesnik, S. Gorinstein, G.A. González-aguilar, *Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in ‘Ataulfo’ Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids*, Molecules 17 (2012) 12657–12664.

- [39] R. Apak, M. Özyürek, K. Guclu, E. Capanoglu, *Antioxidant activity /capacity measurement: I. Classification , physico- chemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays*, J. Agric. Food Chem. 64(5) (2016) 997-1027.