

Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante chez *Ephedra alata alenda*

Imène BEN SALAH¹, Améni SMAOUI¹, Héla MAHMOUDI¹, Zeineb OUERGHI¹

¹ Université de Tunis El Manar, Faculté des Sciences de Tunis, Laboratoire de Productivité Végétale et Contraintes Environnementales, 2092, Tunis, Tunisie

Abstract:

Background: Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes. Ces composés présentent plusieurs familles et possèdent des propriétés antioxydantes. Ils sont Abondants dans les tissus végétaux. Les polyphénols contiennent un cycle aromatique avec des groupements -OH ou OCH₃ qui contribuent à leur activité biologique. Leur action antioxydante est due à leur forte capacité à faire des dons d'électrons ou atomes d'hydrogène. Ces composés peuvent capter les espèces réactives d'oxygène et donc peuvent inhiber la peroxydation lipidique par piégeage de radical alcoxyle lipidique.

Materials and Methods: Dans le présent travail, on s'est intéressé à la valorisation d'une plante saharienne *Ephedra alata alenda*. Notre étude a porté sur la composition des différents organes de la plante (partie aérienne, racines, fleurs mâles et fleurs femelles) en polyphénols et en flavonoïdes et sur les activités antioxydante de ces composés et ce ci en faisant varier la méthode d'extraction (macération / décoction) et le solvant d'extraction (methanol, ðanol, acetone et eau).

Results: la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) dépend de la méthode d'extraction suivie (macération / décoction), de la nature du solvant et de la partie de la plante étudiée. La macération par le méthanol et la décoction donnent les teneurs les plus élevées comparées à celles obtenues par macération par l'éthanol, l'acétone et l'eau distillée. L'extrait méthanolique de la partie aérienne est le plus riche en polyphénols totaux suivie par les racines, les fleurs mâles et femelles. Par contre pour les extraits obtenus par décoction, ce sont les parties aériennes qui présentent les teneurs les moins élevées en composés phénoliques. Contrairement aux polyphénols totaux, ce sont les racines qui sont les plus riches en flavonoïdes, viennent ensuite les parties aériennes et les fleurs mâles et femelles. Les résultats montrent donc une répartition contradictoire entre les flavonoïdes et les polyphénols totaux : les premiers se concentrent surtout dans les extraits de la partie aérienne alors que les seconds bien qu'ils soient présents dans toute la plante, ils sont rencontrés majoritairement dans les extraits de la partie souterraine. Par ailleurs, nos résultats montrent que les activités antioxydantes dépendent de la nature du solvant et de l'organe étudié. Nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique ainsi que l'extrait obtenu par décoction présentent les meilleures activités antioxydantes. Concernant les extraits méthanoliques, les fleurs mâles présentent la plus importante valeur, suivie par les racines, la partie aérienne et les fleurs femelles. Pour les extraits obtenus par décoction, la meilleure valeur est enregistrée pour la partie racinaire suivie par les fleurs femelles, les fleurs mâles et la partie aérienne. De la même façon, les extraits méthanoliques présentent un pouvoir réducteur plus important par comparaison avec les extraits obtenus par décoction. De façon intéressante, l'extrait méthanolique des fleurs mâles possède le pouvoir antioxydant le plus important, suivi par les extraits de la partie aérienne et des fleurs femelles. Dans le cas des extraits aqueux et ceux obtenus par décoction, les fleurs femelles possèdent le pouvoir antioxydants le plus important.

Conclusion: La teneur en composés phénoliques et leur activité antioxydante dépendent de la méthode d'extraction ainsi que de l'organe étudié.

Key Word: *Ephedra alata alenda*, composés phénoliques, activité antioxydante.

Date of Submission: 05-11-2021

Date of Acceptance: 20-11-2021

I. Introduction

Malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde surtout ceux qui sont en voie de développement en l'absence d'un système médical moderne¹. Leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers, de composés

naturels bioactifs représentés par les métabolites secondaires (polyphénols, alcaloïdes, terpènes...). Ces derniers sont dotés de plusieurs activités biologiques et sont accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante. Parmi, les métabolites secondaires qui ont fait l'objet de nombreuses recherches, les polyphénols regroupent diverses molécules antioxydantes qui sont largement utilisées en thérapie pour lutter contre les effets néfastes des formes réactives d'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies². Ces antioxydants jouent aussi un rôle important dans la prévention des maladies contrairement à certains antioxydants synthétiques ayant un effet cancérogène ce qui présente un risque potentiel pour la santé³. Ainsi, il existe un besoin pour développer des médicaments alternatifs pour le traitement des maladies à partir des plantes médicinales qui semblent moins agressifs que les médicaments synthétiques⁴. Parmi ces plantes médicinales, les membres de la famille des Ephedraceae représentée par un seul genre «Ephédra», sont connus pour leurs nombreuses utilisations en médecine traditionnelle dans le monde. La présente étude contribue à la valorisation de Ephédra alata alenda, une plante qui pousse dans le Sud tunisien, biotope favorable pour la production de métabolites secondaires dotés de nombreuses activités biologiques⁵ et réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau.

II. Matériel Et Méthodes

Matériel végétal

Il s'agit d'un arbuste dioïque vivace qui peut atteindre 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés, avec de minces tiges dressées vert jaunâtre, intersectées se terminent par une pointe souvent acérée. Les rameaux inférieurs émettant en surface de longs stolons (jusqu'à 10 m) souvent recouverts de sable (Fig. 1A). Au niveau des nœuds, les feuilles réduites en écailles triangulaires se développent en paires opposées donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuille. De petites fleurs apparaissent au printemps⁶. Ces fleurs (Fig. 1 B et C) sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents): les pieds mâles avec fleurs en glomérules alors que les pieds femelles sont à fleurs solitaires ou réunies par 2 à 5. Cette plante présente un système de racines latérales extrêmement puissant et très fibreux qui l'aide à s'ancrer fermement dans le sol sablonneux.

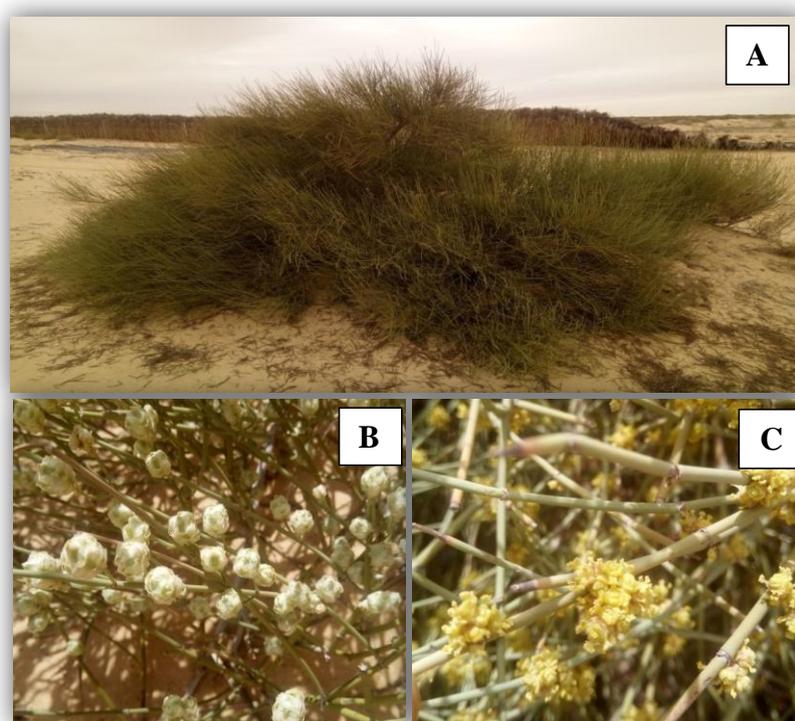


Figure 1. Photo du port general d'*Ephédra alata var alenda*, des. fleurs femelles (B) et des fleurs mâles (C)

Récolte du matériel végétal

Les parties aérienne et racinaire de l'espèce, *Ephédra alata var alenda* ont été récoltée en Décembre 2017 alors que les fleurs ont été récoltées en Mars 2018 (pendant la période de la floraison). Les récoltes ont été réalisées dans la région d'el Faouar à Rjim Maatoug (gouvernorat Kébili). Les différentes parties de la plante ont été nettoyées et conservées, à une température ambiante dans une pièce aérée à l'abri de soleil. Puis elles ont été séchées dans une étuve à 40°C.

Préparation des extraits phénoliques et de la décoction

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon la méthode de Mau *et al.*⁷. L'extraction se fait par macération qui consiste à laisser la poudre végétale (obtenue après broyage du matériel végétal à l'aide d'un broyeur) en contact prolongé avec un solvant avec agitation, pour extraire les principes actifs. Le protocole d'extraction consiste à mettre un gramme de poudre végétale dans 10 ml de solvant. Dans ce travail, on a utilisé quatre solvants (méthanol, éthanol, acétone et eau). La macération est réalisée dans des flacons obscurs pendant 24 heures à 4°C sous une agitation douce. Après macération, les extraits ont été filtrés puis conservés à 4°C pour servir par la suite aux dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de l'activité antioxydante totale. Une décoction à 5% (5 g de matière végétale dans 100 ml d'eau) de chaque partie de la plante est préparée par ébullition dans l'eau pendant 30 minutes puis filtrée et conservés à 4°C.

Dosage des polyphénols totaux

Un volume de 125 µl de l'extrait (méthanolique ou aqueux ou acétonique ou éthanolique ou la décoction) est mélangé avec 500 µl d'eau distillée et 125 µl de réactif Folin Cicalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 min, on ajoute 1250 µl Na₂CO₃ à 7 % et 1000 µl d'eau distillée. Après un repos de 90 min à l'obscurité et à température ambiante, on effectue une lecture de l'absorbance à 760 nm. Les teneurs des polyphénols totaux sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage linéaire réalisée avec l'acide gallique (0-200 µg.ml⁻¹) et sont exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹MS)⁸.

Dosage des flavonoïdes

Un volume de 250 µl de l'extrait (méthanolique ou aqueux ou acétonique ou éthanolique ou la décoction) est mélangé avec 75 µl d'une solution de Na₂NO₂ (5 %). Après une incubation à température ambiante, on ajoute 150 µl d'une solution de trichlorure d'aluminium à 10 % (AlCl₃, 6H₂O) fraîchement préparée. Après 5 min de repos, on ajoute 500 µl de soude (NaOH, 1M) et on ajuste avec l'eau distillée jusqu'à 2.5 ml⁸. L'absorbance est mesurée à 510 nm en se référant à un témoin de catéchine à des concentrations allant de 50 à 500 mg.L⁻¹. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC g⁻¹MS).

Mesure de l'activité antioxydante totale

Cette méthode consiste à ajouter 0.2 ml d'une solution contenant de l'acide sulfurique (H₂SO₄; 0.6 M), du phosphate du sodium (NaH₂PO₄, H₂O; 28 mM) et de l'heptamolybdate d'ammonium ((NH₄)₆ Mo₇ O₂₄, 4H₂O; 4 mM) à pH acide. Le mélange est ensuite placé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG g⁻¹ MS).

Test du piégeage du radical libre DPPH

Pour chaque extrait et pour chaque concentration (0-0.4mg/l), 200 µL d'extrait préparé dans le méthanol est additionné à 2.5 ml de solution DPPH préparée à 76 µM dans de méthanol. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30 min 517nm. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé par la formule suivante:

Pourcentage d'inhibition = [(Absorbance du contrôle – Absorbance du test) x 100] / Absorbance du contrôle

Où le contrôle est préparé en parallèle en mélangeant 100 µL de méthanol avec 3.9 ml de la solution méthanolique de DPPH. Les résultats sont exprimés en mg/ml.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant de nos extraits, nous avons introduit le paramètre IC₅₀. L'indice IC₅₀ désigne la concentration de l'antioxydant qui est nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• de 50%. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petit⁹.

Extraction et dosage des sucres solubles totaux et de l'amidon

La matière fraîche est extraite dans l'éthanol 80% (v/v) à l'ébullition. Les sucres solubles totaux sont dosés selon la méthode à l'anthrone¹⁰ après incubation de l'extrait en présence du réactif d'anthrone à 100°C pendant 10 minutes. La DO est mesurée à 640 nm contre une gamme croissante de glucose. Le culot obtenu après extraction des SST est lavé plusieurs fois avec l'éthanol 80% et hydrolysé avec l'acide perchlorique 35% pendant 10 minutes. L'amidon est déterminé selon la méthode à l'anthrone. La DO est mesurée à 640 nm contre une gamme croissante de glucose¹¹.

III. Résultats

Teneur en composés polyphénoliques totaux

La figure 2 illustre la variation des teneurs en polyphénols totaux des différentes parties de la plante en fonction de différentes méthodes d'extraction. Les résultats montrent bien que la teneur en composés phénoliques totaux dépend de la méthode d'extraction suivie et de la partie de la plante étudiée. Les résultats montrent aussi que les extraits méthanoliques sont les plus riches en composés phénoliques totaux que les extraits éthanolique, acétonique et aqueux et ceci quel que soit l'organe étudié. De façon intéressante, la méthode de décoction a donné un rendement plus important en composés phénoliques totaux que la méthode de macération par les 3 solvants organiques (éthanol, acétone et eau). Ainsi, la macération par méthanol et la décoction sont les meilleures méthodes qui donnent les rendements les plus importants. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de la partie aérienne est le plus riche en polyphénols totaux suivie par les racines, les fleurs mâles et femelles. Par contre pour les extraits obtenus par décoction, ce sont les parties aériennes qui présentent les teneurs les moins élevées en composés phénoliques.

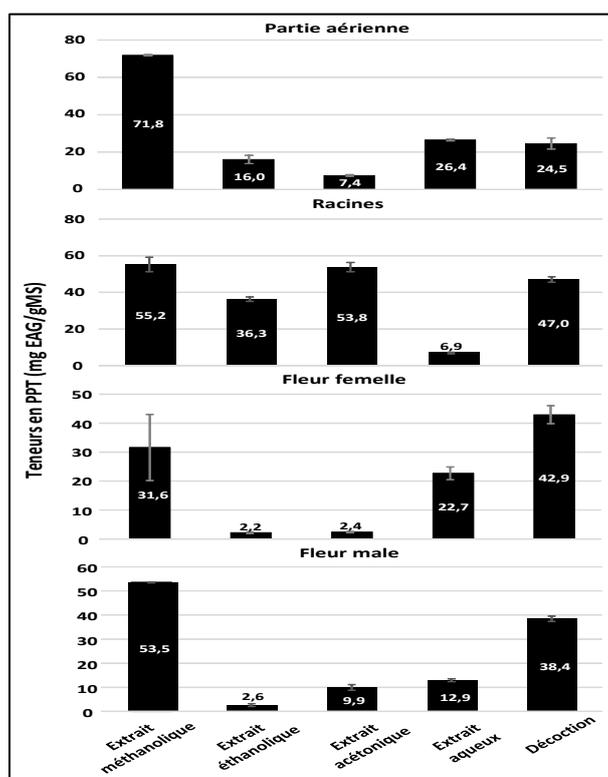


Figure 2. Teneurs en polyphénols totaux des différentes parties de plante d'*Ephedra alata alenda* en fonction des procédés d'extraction et de solvants (méthanol, éthanol, acétone ou eau distillée). Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité calculés au seuil de 5%.

Teneur en flavonoïdes

Le profil observé pour les teneurs en flavonoïdes est presque le même que celui des polyphénols totaux avec quelques différences. La teneur en flavonoïdes dépend de la méthode d'extraction suivie et de la partie de la plante étudiée. La macération par méthanol et la décoction sont respectivement les meilleures méthodes qui donnent le rendement le plus important en flavonoïdes. De la même façon, la méthode de décoction a donné un rendement plus important en flavonoïdes que la méthode de macération par solvants organiques éthanol, acétone et eau (Fig.3). Contrairement aux polyphénols totaux, ce sont les racines qui sont les plus riches en flavonoïdes, viennent ensuite les parties aériennes et les fleurs mâles et femelles. Les résultats montrent donc une répartition contradictoire entre les flavonoïdes et les polyphénols totaux : les premiers se concentrent surtout dans les extraits de la partie aérienne alors que les seconds bien qu'ils soient présents dans toute la plante, ils sont rencontrés majoritairement dans les extraits de la partie souterraine.

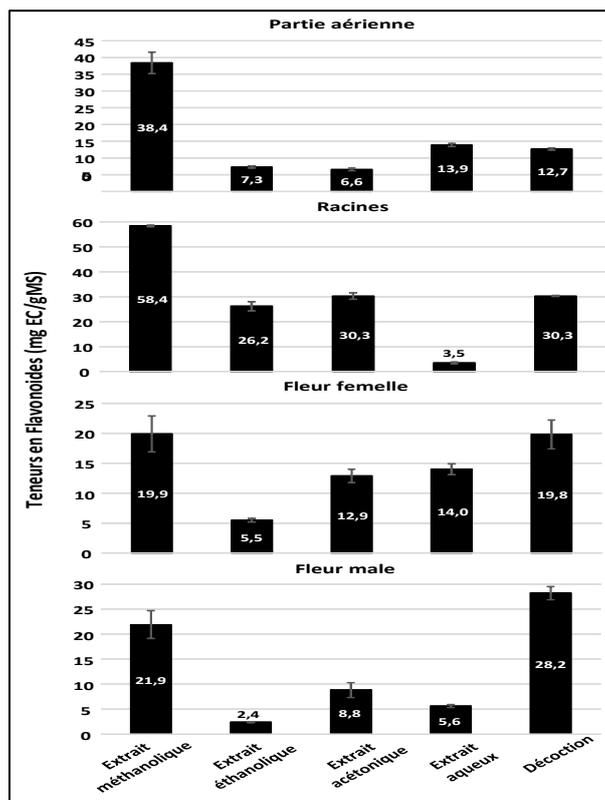


Figure 3. Teneurs en flavonoïdes des différentes parties de plante d'*Ephedra alata alenda* en fonction des procédés d'extraction et de solvants (méthanol, éthanol, acétone ou eau distillée). Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité calculés au seuil de 5%.

Activité antioxydante

L'estimation de la capacité antioxydante des extraits obtenus par macération dans divers solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone ou eau) ou par décoction a été déterminée par la mesure de l'activité antioxydante totale et par le test au radical libre DPPH.

- Activité antioxydante totale

La figure 4 montre que l'extrait méthanolique ainsi que l'extrait obtenu par décoction présentent les meilleures activités antioxydantes. Concernant les extraits méthanoliques, les fleurs mâles présentent la plus importante valeur, suivie par les racines, la partie aérienne et les fleurs femelles. Pour les extraits obtenus par décoction, la meilleure valeur est enregistrée pour la partie racinaire suivie par les fleurs femelles, les fleurs males et la partie aérienne.

- Pouvoir de piégeage du radical libre DPPH

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

- **Le calcul de IC50:** il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de IC50 pour les différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire

$$Y = ax + b$$

Où : $y = 50\%$ (pourcentage de réduction de DPPH)

X : IC50 (la concentration de l'extrait et de l'acide ascorbique)

Le calcul du pouvoir antiradicalaire: (PAR) : qui est inversement proportionnel à l'IC50

$$PAR = 1/IC50$$

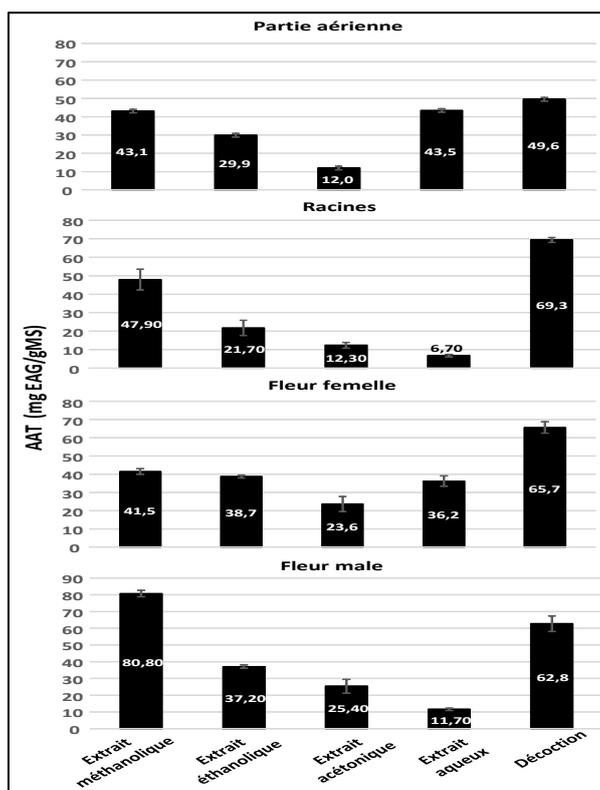


Figure 4. Variations de la capacité antioxydante totale des extraits des différentes parties de plante d'*Ephedra alata alenda* en fonction des procédés d'extraction et de solvants (méthanol, éthanol, acétone ou eau distillée). Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité calculés au seuil de 5%.

Le tableau 1 montre que les extraits méthanoliques présentent un pouvoir réducteur plus important par comparaison avec les extraits obtenus par décoction (valeur de IC₅₀ les plus faibles) et par comparaison à l'ascorbate. De façon intéressante, l'extrait méthanolique des fleurs males possède le pouvoir antioxydant le plus important avec un IC₅₀ = 0.079 mg/ml, suivi par les extraits de la partie aérienne et des fleurs femelles avec un IC₅₀ = 0.094 mg/ml. Dans le cas des extraits aqueux et ceux obtenus par décoction, les fleurs femelles possèdent le pouvoir antioxydants le plus important avec un IC₅₀ = 0.107 et 0.108 mg/ml, respectivement.

Tableau 1. Valeurs de l'IC₅₀ et du pouvoir antiradicalaire (PAR) des différents extraits exprimées en mg/ml.

Extraits	IC ₅₀	PAR
Ascorbate	0.129	7.75
Méthanol-PA	0.094	10.6
Méthanol-R	0.100	10.0
Méthanol-FI male	0.079	12.6
Méthanol-FI femelle	0.094	10.6
Eau-PA	0.198	5.0
Eau-R	0.398	2.5
Eau-FI male	0.639	1.5
Eau-FI femelle	0.107	9.3
Décoction-PA	0.157	6.3
Décoction-R	0.134	7.46
Décoction-FI male	0.122	8.1
Décoction-FI femelle	0.108	9.2

Teneurs en sucres solubles totaux et en amidon

Selon les résultats, la partie aérienne est la plus riche en sucres solubles totaux que la partie souterraine et les fleurs. De la même façon, la partie aérienne est la plus riche en amidon suivie par les fleurs et les racines. La teneur en amidon est moins importante que la teneur en sucres solubles. Ceci est dû à l'épuisement de l'amidon pendant la période d'épanouissement des fleurs.

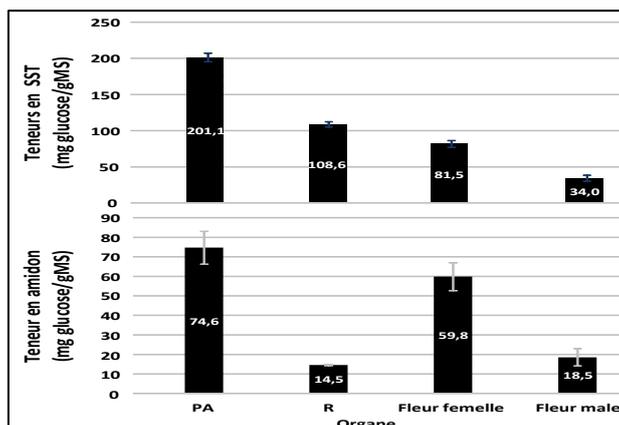


Figure 5. Variations des teneurs en sucres solubles et en amidon des différentes parties de plante d'*Ephedra alata alenda* en fonction des procédés d'extraction et de solvants (méthanol, éthanol, acétone ou eau distillée). Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité calculés au seuil de 5%.

IV. Discussion

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines et tanins¹². Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols¹³. La solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante¹². L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Ephedra sinica* chinoise¹⁴ a montré une teneur très faible en polyphénols totaux 27.70 ± 0.89 mg EAG/g d'extrait par rapport à 71.8 ± 0.3 mg EAG/g d'extrait méthanolique pur obtenus de la partie aérienne de notre plante. Les stress environnementaux tels que la sécheresse, la déficience en nutriments ainsi que le fort ensoleillement, peuvent contribuer à l'augmentation du niveau de la production des composés phénoliques dans certaines plantes⁵. Ceci pourrait expliquer la richesse de *E.alata alenda* de la région saharienne en composés phénoliques par rapport aux autres espèces d'*Ephedra* dans le monde.

Dans notre travail nous avons trouvé des teneurs en polyphénols inférieures à celle en flavonoïdes. Des teneurs en flavonoïdes supérieures à celles des polyphénols totaux a été déjà rapporté dans la littérature^{15,16,17}. Ce résultat pourrait être expliqué par la différence des unités d'expression des résultats et aussi par le fait que les deux méthodes de dosage utilisées folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium ne sont pas spécifiques et qu'ils peuvent donner des résultats peu exacts en réagissant avec d'autres composés y compris les protéines, les sucres, les amines aromatiques, ...¹⁸.

Nos résultats ont montré que les extraits obtenus par décoction, la meilleure valeur est enregistrée pour la partie racinaire. Ceci est probablement due à la richesse et l'abondance des nutriments dans le sol. Les valeurs importantes des activités antioxydantes des racines et des fleurs mâles pourraient être liées à leur richesse en composés phénoliques et suggèrerait un rôle important de ces composés dans la réponse antioxydante^{9,14,16}. Par ailleurs nos résultats ont montré que les extraits méthanoliques présentaient le meilleur pouvoir réducteur. Un pouvoir antioxydant très important des extraits méthanoliques a été auparavant rapporté par Jaradet *et al.*¹⁹ et a été attribué au meilleur pouvoir extracteur du méthanol des composés phénoliques.

Les résultats ont aussi montré que la teneur en sucres solubles est plus importante au niveau des feuilles. Bien que divers organes et tissus isolés sont capables de synthétiser certains composés phénoliques (racines, entre-nœuds, boutons floraux, feuilles), les feuilles sont considérées comme site privilégié de cette biosynthèse. En effet, c'est dans ces organes et à la lumière que le processus de la biosynthèse est de loin le plus rapide et intense. On sait, d'autre part, que dans les chloroplastes fonctionne non seulement le cycle de Calvin de réduction de carbone, mais aussi le cycle du pentose phosphate, ainsi que le système enzymatique de synthèse des acides gras. Par conséquent, les chloroplastes sont régulièrement alimentés en composés initiaux pour la formation des polyphénols, en énergie (ATP) et en pouvoir réducteur²⁰.

V. Conclusion

Nos résultats montrent ainsi que la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) ainsi que leur activité dépendent de la méthode d'extraction suivie (macération / décoction), de la nature du solvant mais aussi de la partie de la plante étudiée. Il serait intéressant d'approfondir ce travail par l'étude des activités biologiques (antibactérienne, antifongique et anticancéreuse).

Références

- [1]. Tabuti JRS, Lye KA, Dhillon SS. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88: 19-44.
- [2]. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4eme Ed.), 2009;1268 p.
- [3]. Safer AM, Al-Nughamish AJ.. Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxyl toluen (BHT) in rats: An electron microscopical study. *Histology and Histopathology*. 1999;14: 391-406.
- [4]. Arshad H, Shadma W, Iffat Z, Sarfaraj H. Antibacterial Activity of the Leaves of *Coccinia indica* (W. and A) Wof India. *Advances in Biological Research*. 2010; 4: 241-248
- [5]. Timmermann BN, Steelin C, Loewus FA. Recent Advances in Phytochemistry Phytochemical Adaptations to Stress .Plenum Press: New York, 1984; pp. 273–220.
- [6]. Limberger RP, Jacques ALB, Schmitt GC, Arbo MD. Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*. 2013; 1218- 1237.
- [7]. Mau JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci*. 2001; 6: 273- 278.
- [8]. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agr. Food chem*. 2002; 50: 3010-3014.
- [9]. Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industrielle*. 2009; 4: 25-39.
- [10]. Yemm EW, Willis J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J*. 1954; 57: 508–514
- [11]. Morris D. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*. 1948; 107: 254–255.
- [12]. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 2010; 15 : 8813–8826.
- [13]. Koffi E, Sea T, Dodehe Y, Soro S. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci*. 2010; 5 : 550-558.
- [14]. Song FL, Gan RY, Zhang Y, Qin X., Kuang L, Li HB. Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci*. 2010; 11: 2362 2372.
- [15]. Ayoola GS, Ipav SS, M, Sofidiya O, Adepoju-Bello AA, Coker HAB, Odugbemi TO. Phytochemical Screening and Free Radical Scavenging Activities of the Fruits and Leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International Journal of Health Research*. 2008; 1: 87-93.
- [16]. Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S. 2010. activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. 11: 69-81
- [17]. Hammoudi R. Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional Algérien. Thèse de doctorat. "Sciences biologiques ". Université Kasdi Merbah-Ouargla. 2015; 147 p.
- [18]. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*; 2005 53: 4290- 4302
- [19]. Jaradat N, Hussen F, Al-Ali A. Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne. *J. Mater. Environ. Sci*. 2015; 6: 1771-1778.
- [20]. Brzozowska J, Hanower P. Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences)*, tome XII, 1976; 65-87pp

Imène BEN SALAH, et. al. "Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante chez *Ephedra alata* alenda." *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 14(10), 2021, pp. 23-30.