

OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES POLYPHENOLS DE DATTES LYOPHILISEES (*Phoenix dactylifera* L) VARIETE GHARS

TELLI A.^{1,*}, MAHBOUB N.¹, BOUDJENEH S.¹, SIBOUKEUR O. E. K.¹
et MOULTI-MATI. F.²

⁽¹⁾ *Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides,
Université Kasdi Merbah Ouargla, Ouargla 30000 (Algérie).*

⁽²⁾ *Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Département de Biochimie-Microbiologie,
Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques,*

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Tizi-Ouzou (Algérie).

* alia.telli@gmail.com

Résumé :

Ce travail est conduit à optimiser les conditions d'extraction des polyphénols à partir de dattes variété *Ghars* (Kimri I). L'effet du solvant (méthanol et éthanol), du rapport solvant/eau, échantillon/solvant et de la durée d'extraction ont été étudiés. Les teneurs en polyphénols totaux (PPT) les plus élevées ont été obtenues dans les conditions suivantes : rapport solvant/eau de 80/20, rapport solide/liquide de 1/6 et durant 5 heures. Les résultats de l'optimisation montrent que le méthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols. L'évolution de la teneur en PPT de dattes durant trois stades de maturité (Kimri I ou Kh'lal I, Khalal ou Bser et Tmar) est étudiée. Le contenu en PPT est compris entre 892,14 mg en équivalent d'acide gallique (EAG)/10g au stade Kimri I et 4,22 mg EAG/10g du poids sec (PS) au stade Tmar.

Mots clés : dattes, variété *Ghars*, optimisation, polyphénols, stades de maturité.

Abstract:

This work was conducted to optimize extraction conditions of polyphenols from date fruit variety *Ghars* (Kimri I or Kh'lal). The effects of solvent type (methanol and ethanol), solvent/water ratio, sample/solvent ratio and extraction time were studied. High values of total polyphenols content (PPT) were obtained at an 80/20 solvent/water ratio, at a 1/6 solid/liquid ratio and at 5 hours. The optimization results showed that the methanol was the most efficient solvent for polyphenols extraction. The evolution of total polyphenols content during three stages of ripening (Kimri I or Kh'lal I, Khalal or Bser and Tmar) was studied. The PPT content decreased from 892.14 mg EAG/10g of dry weight (DW) at Kimri I stage to 4.22 mg EAG/10g DW at Tamr stage.

Keywords: dates, *Ghars* variety, optimization, polyphenols, stages of ripening.

1. Introduction

Le palmier dattier est un important arbre fruitier, non seulement à cause de son importance économique, mais aussi par la haute valeur nutritionnelle de ses fruits, qui représentent une excellente source de glucides et antioxydants (SAWAYA *et al.*, 1983 ; BIGLARI *et al.*, 2008 ; ELLEUCHE *et al.*, 2008).

En plus de leur utilisation dans l'alimentation, les dattes sont utilisées traditionnellement dans le domaine médical (BENCHELAH et MAKKA, 2008). Les dattes sont un tonique musculaire et nerveux, indiquées en cas d'asthénies, de déminéralisation, de tuberculose et d'anémie (DELILLE, 2007).

De nombreux processus physiologiques et biochimiques dans l'organisme humain peuvent produire des espèces réactives oxygénées (ERO). La surproduction de ces radicaux libres cause des dommages aux biomolécules (lipides, protéines, les acides nucléiques), en conduisant éventuellement à plusieurs maladies chroniques, telles que l'athérosclérose, le cancer, le vieillissement et d'autres maladies dégénératives (CAI *et al.*, 2004). En cas d'agression, les plantes se défendent naturellement en produisant localement des métabolites secondaires qui peuvent même conduire à une immunité générale de la plante (HOFFMANN, 2003). Il est, aujourd'hui, prouvé que

ces métabolites, dont font partie notamment les polyphénols et les caroténoïdes, possèdent des propriétés anti-oxydantes (RICE-EVENS *et al.*, 1996 ; CAI *et al.*, 2004). Les études révèlent que les fruits et les légumes en sont particulièrement riches (RICE-EVENS *et al.*, 1996 ; CAI *et al.*, 2004). Pour cela, la consommation d'aliments frais et variés, permet de prévenir de façon très efficace l'apparition de certaines de ces maladies (RICE-EVENS *et al.*, 1996 ; CAI *et al.*, 2004 ; HOOPER et CASSIDY, 2006).

Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par extraction avec des solvants organiques (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006). Mais la procédure de l'extraction est influencée par plusieurs paramètres tels que : la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction utilisée, la dimension des particules d'échantillon et le temps d'extraction (NAZCK et SHAHIDI, 2004). Une autre difficulté doit être prise en considération qui est la susceptibilité des polyphénols à l'oxydation (DRUZYŃSKA *et al.*, 2007). Chaque matériel végétal a ses propriétés uniques en termes d'extraction de ces composés.

Les dattes sont parmi les fruits qui sont riches en composés phénoliques. Ce n'est que récemment que les chercheurs s'intéressent aux métabolites secondaires de dattes. Ces métabolites présentent des propriétés liées à la santé humaine dans la protection particulièrement des maladies cardiovasculaires (MANSOURI *et al.*, 2005 ; BIGLARI *et al.*, 2008). Les objectifs de cette étude sont :

- (1) de déterminer les conditions optimales pour l'extraction des polyphénols de dattes ;
- (2) d'évaluer la teneur en polyphénols et leur activité anti-oxydante durant trois stades de maturité.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les dattes sont récoltées à trois stades de maturité (Kimri, Routab et Tmar) à partir de dix palmiers dattiers de la palmeraie de BEN CHEIKH à EL-HADJIRA. Les échantillons sont transportés au laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides où ils sont dénoyautés, découpés, congelés et lyophilisés. Ils sont ensuite broyés et conservés à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur dans des contenants en verre.

2.2. Optimisation de l'extraction des polyphénols

Afin d'évaluer les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées, un seul stade de maturité est choisi en raison de la date de ce stade qui correspond au moment opportun de l'expérimentation (Kh'lal I ou Kimri I). Trois paramètres ont été étudiés : le rapport solvant alcoolique/eau, le rapport liquide /solide et le temps d'extraction. L'évaluation a porté sur la teneur en polyphénols totaux (PPt).

2.3. Analyses quantitatives

Teneur en polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux de dattes est effectué par le réactif de Folin-Ciocalteau selon la méthode de SINGLETON et ROSSI (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006) en utilisant l'acide gallique comme standard. L'absorbance est mesurée à 765 nm et les résultats sont exprimés en mg EAG/10g du poids sec de matériel végétal.

2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats obtenus sont effectuées avec le STATI-TCF et XLSTAT.

3. Résultats et discussions

3.1. Optimisation de l'extraction des polyphénols

3.1.1. Rapport alcool/eau

Les résultats obtenus ont montré que les teneurs en polyphénols totaux (PPT) varient en fonction du solvant utilisé et en fonction du rapport solvant/eau (Fig. 1). Les teneurs les plus élevées en PPT sont obtenues quand le rapport de solvant/eau est de 80/20 (v/v). Elles sont respectivement de $499,91 \pm 10,07$ mg équivalent d'acide gallique/10g de poids sec pour le méthanol et de $400,02 \pm 4,34$ mg équivalent d'acide gallique/10g de poids sec pour l'éthanol.

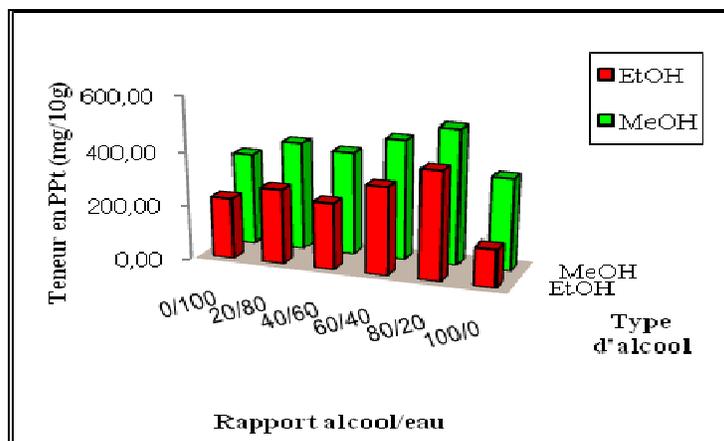


Figure 1 : Influence de type de solvant et de rapport alcool/eau sur la teneur en polyphénols totaux.

Les teneurs les plus faibles ont été obtenues lorsque le milieu d'extraction est entièrement fait d'eau ou de solvant (0/100 et 100/0, v/v). Concernant les proportions 20/80, 40/60 et 60/40, v/v, les concentrations en PPT prennent des valeurs intermédiaires. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (CHIRINOS *et al.*, 2007 ; KIM *et al.*, 2007 ; SPIGNO *et al.*, 2007).

Les combinaisons de solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone avec l'eau font améliorer l'extraction des composés phénoliques glycosylés (CHIRINOS *et al.*, 2007 ; KIM *et al.*, 2007 ; SPIGNO *et al.*, 2007 ; TABART *et al.*, 2007). En plus, un rapport de 70% de méthanol au minimum est nécessaire pour inactiver les polyphénols-oxydases, des enzymes intervenant dans l'oxydation des polyphénols, ce qui conduit au phénomène de brunissement (CHIRINOS *et al.*, 2007). Ce rapport est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes (catéchines ou épicatechines), les acides-phénols et leurs dérivés et plusieurs autres sous groupes des flavonoïdes (AL-FARSI et LEE, 2007 ; TABART *et al.*, 2007).

3.1.2.- Rapport solide/liquide

L'impact de rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées est mesuré avec les rapports 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7 ; P/ V (fig. 2). En augmentant le rapport solide/liquide, celui-ci a un effet positif sur l'extraction. En effet, le rapport solide/liquide de 1/6 est celui qui permet d'extraire le meilleur taux quelque soit le solvant étudié. Au-delà de ce rapport, les taux diminuent.

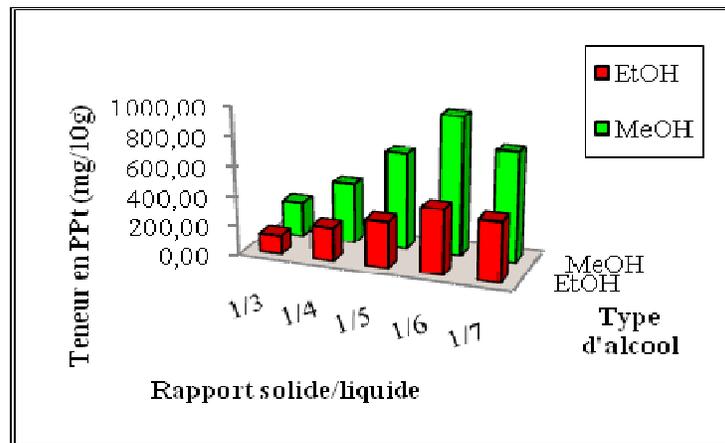


Figure 2 : Influence de type de solvant et de rapport solide/liquide sur la teneur en polyphénols totaux.

Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus élevé (AL-FARSI et LEE, 2007 ; GABORIAUD, 1996). Des résultats similaires sur l’effet du rapport solide/liquide sur l’extraction des polyphénols ont été rapportés pour les noyaux de dattes par AL-FARSI et LEE (2007), pour l’écorce de la pomme par JEREZ et al. (2006) et pour les feuilles d’*Inga edulis* par SILVA et al. (2007).

Concernant le rapport 1/7 qui est marqué par la diminution des teneurs en PPT, nous pouvons dire que ce résultat peut être du à l’intervention d’un autre paramètre (n’étant pas pris en considération dans cette étude, ou peut être du à l’augmentation de l’eau dans le système de solvant d’extraction (alcool/eau), qui fait extraire en quantité importante les composés non phénoliques comme les glucides, les protéines... susceptibles de polymériser avec les composés phénoliques ce qui conduit à la formation des complexes qui ne sont pas détectés par le test utilisé.

Le rapport 1/6 est maintenu dans les étapes suivantes de cette étude.

3.1.3.- Temps d’extraction

Le contenu en PPT a été augmenté considérablement quand le temps d’extraction a été augmenté de 30 min à 5 h et de 5 h à 9 h (fig. 3). Nous constatons que l’évolution de la teneur en PPT et en Ft est rapide entre 30 min et 5 h, alors qu’elle est lente entre 5 h à 9 h. La prolongation du temps d’extraction des PPT par chaque solvant examiné, fait donc accroître leur rendement. Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs auteurs (CHIRINOS *et al.*, 2007 ; DRUŻYŃSKA *et al.*, 2007 ; SILVA *et al.*, 2007).

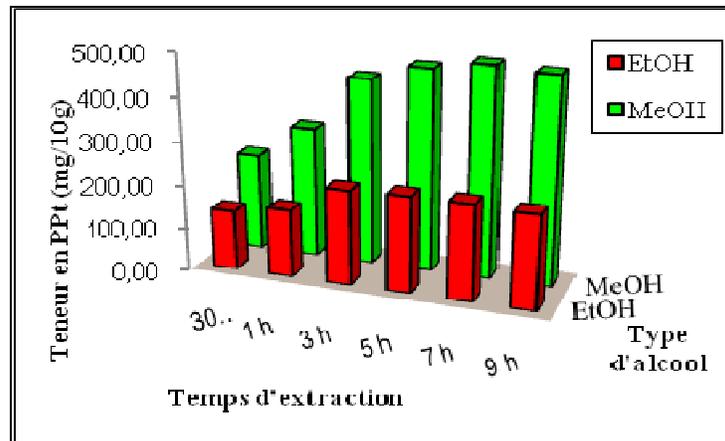


Figure 3 : Influence de type de solvant et du temps d’extraction sur la teneur polyphénols totaux.

Néanmoins, plusieurs chercheurs ont attiré l'attention à la possibilité de l'oxydation des composés phénoliques si le temps d'extraction est long, ce qui peut mener à l'inverse des résultats escomptés (teneurs très basses) (NAZCK et SHAHIDI, 2004 ; NAZCK et SHAHIDI, 2006 ; CHIRINOS *et al.*, 2007 ; DRUZYŃSKA *et al.*, 2007).

D'après les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (facteur 1 : le temps d'extraction, facteur 2 : le type de solvant), l'influence du temps d'extraction et le type de solvant est très importante. En plus, l'interaction entre les deux facteurs étudiés (le temps d'extraction et le type de solvant) a un effet sur la teneur en polyphénols ce qui nous permet de dire que la prolongation du temps d'extraction accroît d'une manière significative le pouvoir d'extraction de chaque solvant étudié.

La cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'un matériel végétal a été présentée dans de nombreuses études (CHIRINOS *et al.*, 2007 ; SILVA *et al.*, 2006 ; SPIGNO *et al.*, 2007). De même, la cinétique d'extraction des anti-oxydants à partir des feuilles de *Melissa officinalis* a été reportée. Ce processus est divisé en deux phases (HERODEZ *et al.*, 2003), une phase rapide qui est expliquée par le fait que les solutés sont présents sur des sites superficiels de la matière première, et une phase lente correspondant à la diffusion moléculaire des solutés à partir des sites internes à travers des pores (HERODEZ *et al.*, 2003 ; SPIGNO *et al.*, 2007). Par conséquent, de nombreux paramètres ont une influence sur la cinétique d'extraction : le coefficient de diffusion des constituants solubles des surfaces, le coefficient de diffusion des constituants des sites profonds, le coefficient de partage de soluté (entre le solvant et le solide), la surface totale mise en contact avec le solvant, le volume de solvant et les dimensions et la géométrie des particules solides (SPIGNO *et al.*, 2007).

Le temps optimal d'extraction trouvé est de 7 h, nous avons quand même opté pour un temps de macération de 5 h avec 2 extractions du même matériel végétal.

3.2. Evolution de la teneur en PPt durant la maturation

Les changements de la teneur en PPt pendant les différents stades de maturité sont présentés dans la figure 4.

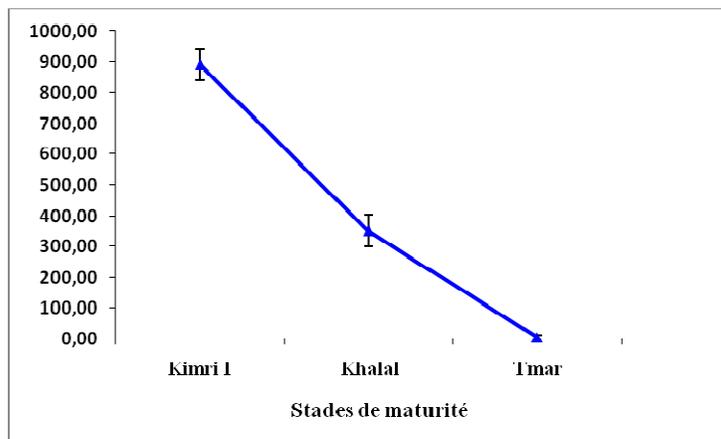


Figure 4 : Evolution de la teneur en PPt durant trois stades de maturité.

Les extraits bruts de palmiers dattiers choisis dans cette étude ont révélé la concentration en PPt la plus élevée au cours du stade Kimri I soit 892,14 mg en équivalent d'acide gallique (EAG)/10g. Après ce stade, la teneur en PPt de dattes diminue progressivement en fonction de la maturation des fruits, pour atteindre les valeurs les plus faibles au cours de dernier stade (Tmar) qui sont de 4,22 mg EAG/10g du poids sec.

Ces résultats sont en accord avec ceux d'AL-OGAIDI et MUTLAK (1986), qui ont montré que le taux des PPt de quatre variétés de dattes cultivées en Iraq (Zahdi, Sayer, Khistawi et Shukkar) diminue graduellement pendant la maturation. NAVARRO *et al.* (2006) ont étudié l'évolution de la

composition chimique du poivre durant trois stades de maturité. Ils ont trouvé que la teneur en substances phénoliques varie avec le stade de maturité. CASTREJÓN et al. (2008) ont aussi étudié l'évolution de la teneur en PPT à trois stades de maturité de trois variétés de myrtille. Leurs résultats indiquent une variation de concentration des PPT lors de la maturité de myrtille. Néanmoins, BACCOURI et al. (2008), ont suivi l'évolution de la teneur en PPT pendant la maturation de deux variétés d'olive cultivées en Tunisie ; ils ont montré que le taux des PPT augmente progressivement jusqu'aux stades " rougeâtre " et " noir " de pigmentation, puis la teneur diminue.

L'influence du stade de maturité se traduit par la diminution progressive de la teneur en PPT. Ce phénomène est expliqué par la synthèse active des polyphénols qui a lieu après la pollinisation durant la phase de division cellulaire, puis elle diminue à partir de la phase de croissance cellulaire (TRAVERS, 2004). Alors que, la diminution de la teneur en PPT pendant la maturation peut être due à l'action des polyphénols-oxydases PPO et les peroxydases POD. Plusieurs études ont reporté qu'il y a une corrélation entre l'évolution du taux des PPT et l'activité enzymatique des PPO durant la maturation. GOODING et al. (2001) ont montré que l'activité enzymatique des PPO dans les fruits du bananier *Goldfinger* diminue en fonction du stade de maturité. En plus, AYAZ et al. (2008) ont montré qu'il y a une diminution de la teneur en PPT ainsi que l'activité enzymatique des PPO au cours de trois stades de maturité des nèfles.

4. Conclusion

Pour une extraction efficace et optimale des PP de dattes lyophilisées, en résumant les différentes étapes d'extraction menées sous différentes conditions, certaines conclusions s'imposent :

- 1- Le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols de dattes est le méthanol.
- 2- L'addition de l'eau au système d'extraction fait améliorer le rendement, mais plus le rapport d'eau est élevé, plus la concentration des composés non phénoliques augmente ce qui conduit à la diminution du taux des polyphénols.
- 3- Le rapport solide /liquide affecte de façon significative la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux ; le meilleur rapport trouvé est 1/6.
- 4- La température optimale pour l'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées est 23°C. Ce paramètre est en relation étroite avec le temps d'extraction.
- 5- L'accroissement des taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes avec la prolongation du temps d'extraction est observé.

D'autres paramètres qui ne sont pas étudiés dans ce travail et qui ont une influence sur le rendement d'extraction, peuvent servir de perspectives pour optimiser au mieux l'extraction en vue de son utilisation à l'échelle industrielle. D'autres critères peuvent être ajoutés en plus du rendement en PP totaux, tels que les différentes familles de PP et les différentes activités biologiques.

La teneur en PPT de nos extraits est diminuée au fur et à mesure que les dattes sont mûries.

5. Références bibliographiques

1. AL-FARSI M. A. et LEE C. Y.; Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **108**, pp977-985, (2008).
2. AL-OGAIDI H. K. et MUTLAK H. H.; The phenolic compounds of four date cultivars during maturity stages, *The Date Palm Journal*, Vol. **4**, pp191-203, (1986).
3. AYAZ F. A., DEMIR O., TORUN H., KOLCUGLU Y. et COLAK A.; Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **106**, pp291-298, (2008).

4. BACCOURI O., GUERFEL M., BACCOURI B., CERRETANI L., BENDINI A., LERCKER G., ZARROUKM. et BEN MILED D. D.; Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening, *Journal of Food Chemistry*, Vol. **109**, pp 743-754, (2008).
5. BENCHELAH A.-C. et MAKHA M. ; Les dattes : intérêt en nutrition. *Phytothérapie*, Vol. **6**, pp117-121, (2008).
6. BIGLARI F., ALKARKHI A. F. M. et EASA A. M.; Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran, *Journal of Food Chemistry*, Vol. **107**, pp1636-1641, (2008).
7. BOIZOT N. et CHARPENTIER J.-P. ; Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier ; *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, numéro spécial : 79-82, (2006).
8. CAI Y., LUO Q., SUN M. et CORKE H. ; Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Journal of Life Sciences*, Vol. **74**, pp 2157-2184, (2004).
9. CASTREJON A. D. R., EICHHOLZ I., ROHN S., KROH L. W. et HUYSKENS-KEIL S.; Phenolic profile and antioxidant activity of high bush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **109**, pp 564-572, (2008).
10. CHIRINOS R., ROGEZ H., CAMPOS D., PEDRESCHI R. et LARONDELLE Y.; Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers; *Journal of Separation and Purification Technology*, Vol. **55**, pp 217-225, (2007).
11. DELILLE L. ; Les plantes médicinales d'Algérie ; Ed. BERTI, Alger, Algérie (2007).
12. DRUŻYŃSKA B., STEPNIEWSKA A. et WOŁOSIAK R.; The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts; *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, Vol. **6**, pp 27-36, (2007).
13. ELLEUCH M., BESBES S., ROISEUX O., BLECKER C., DEROANNE C., DRIRA N. E. et ATTIA H.; Date flesh: chemical composition and characteristics of the dietary fibre; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **111**, pp 676-682, (2008).
14. GABORIAUD R. ; Physico-chimie des solutions ; Edition MASSON, Paris, pp 208-228, (1996).
15. GOODING P. S., BIRD C. et ROBINSON S. P. ; Activité et expression génique de la polyphénol-oxydase dans le fruit du bananier Goldfinger ; *Info musa*, Vol. **10**, pp 17-22, (2001).
16. HERODEŽ S. S., HADOLIN M., ŠKERGET M. et KNEZ Z. ; Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **80(2)**, pp275-282, (2003).
17. HOFFMANN L. ; Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT) ; Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur, pp 5-10, (2003).
18. HOOPER L. et CASSIDY A. ; A review of health care potential of bioactive compounds; *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. **86**, pp 1805-1813, (2006).
19. JEREZ M., PINELO M., SINEIRO J. et JOSÉ NÚÑEZ M.; Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **94**, pp 406-414, (2006).
20. KIM J.-M., CHANG S.-M., KIM I.-H., KIM Y.-E., HWANG J.-H., KIM K.-S. et KIM W.-S.; Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from mulberry leaves; *Biochemical Engineering Journal*, vol. 37: 271-278, (2007).
21. MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. et KEALAS P.; Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Journal of Food Chemistry*, Vol. **89**, pp 411-420 2005-.

- 22.** NAVARRO J., FLORES P., GARRIDO C. et MARTINEZ V.; Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **96**, pp 66-73, (2006).
- 23.** NAZCK M. et SHAHIDI F.; Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A*, Vol. **1054**, pp 95-111, (2004).
- 24.** NAZCK M. et SHAHIDI F.; Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. **41**, pp 1523-1542, (2006).
- 25.** RICE-EVANS C., MILLER N. J. et PAGANGA G.; Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids; *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. **20**, pp 933-956, (1996).
- 26.** SAWAYA W. N., KHALIL J. K., KHATCHADOURIAN H. A., SAFI W. M. et MASHADI A. S.; 1983a- Sugars, tannins and some vitamins contents of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalal (mature color) and Tamer (ripe) stages. *Date Symposium*. King Faisal University Al-Hassa, March 23-25, 1982.
- 27.** SILVA E. M., ROGEZ H. et LARONDELLE Y.; Optimisation of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology; *Journal of Separation and Purification Technology*, Vol. **55**, pp 381-387, (2007).
- 28.** SPIGNO G., TRAMELLI L. et De FAVERI D. M.; Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics; *Journal of Food Engineering*, Vol. **81**, pp 200-208, (2007).
- 29.** TABART J., KEVERS C., SIPEL A., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.-O. et DOMMES J.; Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage; *Journal of Food Chemistry*, Vol. **105**, pp 1268-1275, (2007).
- 30.** TRAVERS I. ; Influence des conditions pédoclimatiques du terroir sur le comportement du pommier et la composition des pommes à cidres dans le Pays d’Auge ; Thèse de doctorat de l’Université de CAEN, pp 15-31, (2004).
- 31.** VERMERRIS W. et NICHOLSON R. ; Phenolic compounds biochemistry; Ed. Springer, pp 1-58, (2006).