



Article Original

Activité Biologique et Antioxydante des Extraits de *Cynoglossum lanceolatum* Forssk (Boraginaceae)

Biological and antioxydant activity of Cynoglossum lanceolatum forssk (Boraginaceae) extract

Ndzana Ndzana Ariane Roger^{1*}, Nnanga Nga^{1 2*}, Essola Ndoé Nadine¹, Nyangono Ndongo¹, Ze Minkande Jacqueline³

RÉSUMÉ

Objectif : *Cynoglossum lanceolatum* (CL) est une plante moyennement étudiée en Afrique et au Cameroun, mais pourtant fréquemment employée en médecine traditionnelle. La présente étude avait pour but d'évaluer les propriétés biologiques et antioxydantes de l'extrait hydroethanolique des feuilles de CL (Boraginaceae). **Matériel et méthodes :** L'étude de type expérimental a permis la récolte des feuilles fraîches de CL dans la ville de Yaoundé (Cameroun), identifiées à l'Herbier National sous le numéro 6477/SRF/Cam; puis séchées à l'ombre et pulvérisées. Les poudres obtenues ont été macérées dans un système éthanol-eau (70 :30 v/v). Le macérât obtenu a permis de réaliser un screening phytochimique. Les méthodes de diffusion en milieu liquide ont été utilisées pour le test de sensibilité et la détermination de la CMI et CMB respectivement. L'activité antioxydante a été réalisée grâce à 03 méthodes complémentaires (FRAP, ABTS et DPPH). Les différents tests ont été effectués sur 03 souches bactériennes; et 7 souches fongiques. **Résultats.** Ces tests ont permis de mettre en évidence six familles de métabolites secondaires, une activité bactéricide sur les trois souches bactériennes en présence a été observée; le rapport CMB/CMI montre une activité fongicide et fongistatique de l'extrait sur les isolats de levures. Une activité antioxydante modérée de notre extrait a été reportée avec les trois tests utilisés. **Conclusion :** l'extrait des feuilles de *Cynoglossum lanceolatum* a révélé que cette plante regorge de nombreuses propriétés qui justifient son utilisation comme principe actif de base dans le traitement traditionnel de NDZIBA en pays Bantou.

ABSTRACT

Objective. *Cynoglossum lanceolatum* (CL) is a plant moderately studied in Africa and Cameroon but nevertheless frequently used in traditional medicine. The aimed of this study was to evaluate the biological and antioxydant properties of the hydroethanolic extract of the leaves of CL. **Materials and Methods:** the experimental study allowed the harvest of leaves from CL in the city of Yaoundé (Cameroon), identified at the National Herbarium of Cameroon under the number 6477/SRF/Cam. Then dried in the shade and sprayed. The resulting powders were macerated in an ethanol-water solvent system (70: 30 v / v). The macerate obtained allowed us to carry out a phytochemical screening. The diffusion methods in liquid medium, were used for the sensitivity test and the determination of the MIC and the MBC respectively. Antioxidant activity was achieved through 03 complementary methods (FRAP, ABTS and DPPH). The different tests were carried out on 03 bacterial and 7 fungal strains **Results.** Phytochemical screening revealed the presence of six secondary metabolites. A bactericidal activity on the three bacterial strains present was observed, the MBC/MIC ratio shows a fungicidal and fungistatic activity of the extract on yeast isolates. Low antioxidant activity was revealed compared to the positive controls used in the 03 antiradical activity tests. **Conclusion.** the extract of the leaves of CL revealed that this plant is full of many properties that justify its use as a basic active ingredient in the traditional treatment of ndziba in bantu contry.

1. Département de Sciences Pharmaceutiques - Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales Yaoundé - Cameroun;
2. Laboratoire de Technologie Pharmaceutique - Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales - Yaoundé - Cameroun
3. Département de Chirurgie et Spécialités - Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales Yaoundé - Cameroun
4. Laboratoire de biochimie de l'Agence Universitaire de la Francophonie Yaoundé - Cameroun

Auteur correspondant : Nnanga Nga , Ndzana Ndzana Ariane Roger ,

Adresse **e-mail :**
arianeroger18@gmail.com
ngnnanga@gmail.com
 Tel : (+237)672301111

Mots clés : Extrait, *Cynoglossum lanceolatum forssk*, antibactérien, antifongique, antioxydant, CMI, CMB.

Key words: Extract, *Cynoglossum lanceolatum forssk*, antibacterial, antifungal, antioxidant, MIC, MBC.

INTRODUCTION

L'Afrique dispose d'une diversité importante de plantes médicinales; celles-ci constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales en Afrique [1]. Au Cameroun, 80% des populations se

soignent à base des produits de la pharmacopée traditionnelle [2]. Ainsi, Les nouveaux composés actifs peuvent être recherchés dans les plantes médicinales, car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens [3]. Mais, à ce jour, de

Health Sci. Dis: Vol 22 (12) December 2021 pp 65-70

Available free at www.hsd-fmsb.org

nombreuses personnes s'improvisent tradi - praticiens. Ce qui fait sombrer la profession dans les méandres du charlatanisme. Il est donc impératif de recadrer ce domaine, qui s'avère très prometteur dans le domaine de la santé. C'est dans cette optique que notre travail s'attèlera à l'évaluation des propriétés d'une plante traditionnellement utilisée pour combattre diverses pathologies dont les infections sexuellement transmissibles et la stérilité féminine. Il s'agit d'une plante de la famille des Boraginaceae : *Cynoglossum Lanceolatum* (CL), Couramment appelé 'iyami' en langue 'éton'. Selon certains tradithérapeutes, les feuilles sont traditionnellement utilisées en association avec d'autres composants dans le traitement du 'ndziba' ou 'edipe' dans la tribu beti .Il sera question après avoir déterminé sa composition chimique, d'évaluer les propriétés antibactériennes et antifongiques de CL, d'étudier son activité antioxydante pour en tirer des conclusions quant à son usage traditionnel.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les feuilles de CL ont été récoltées sous la supervision d'un tradithérapeute en juin 2018 dans la ville de Yaoundé (Cameroun, latitude Nord 3° 52', longitude Est 11° 31'), séchées à température ambiante sous ombre. L'identité de la plante a été confirmée à l'herbier national du Cameroun en comparaison au spécimen N° 6477/SRF/Cam;

Matériel animal

La population ayant servi à l'étude expérimentale était constituée de 03 souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* NR46374, *Salmonella enteritidis*, souche provenant de l'Hôpital Général de Yaoundé, *Salmonella typhi* DT104 ; et 7 souches de levures : *Candida albicans* P37037, 44B, NR2045, NR294, 141S ; *Candida krusei* CK ; *Candida parapsilosis* CP. Leur sélection reposait sur leur implication fréquente dans les infections bactériennes et fongiques

Préparation de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de CL

L'extrait hydroéthanolique a été obtenu par Broyage et pulvérisation des feuilles dans un broyeur mécanique pour obtenir 60g de poudre, grâce au principe énoncé par Prakash *et al.* (2005) et Sourabie *et al.* (2012), que nous avons modifié pour les besoins de l'étude.

60 g de poudre de matériel végétal pesé à l'aide d'une balance électronique ont été macérés dans un système hydroéthanolique (70-30, v/v), dans des proportions (1 : 10), soit 1 g de poudre pour 10 ml de solvant, durant 72 heures. Le procédé a été répété deux fois, le macérât obtenu a été filtré à l'aide du coton hydrophile et du papier filtre Wattman N°4 puis N°2 ; chaque filtrat a été recueilli dans un flacon conique, puis condensé sous pression réduite à 79°C dans un évaporateur rotatif, afin d'éliminer l'éthanol. Après passage à l'évaporateur rotatif, l'extrait a été lyophilisé, le lyophilisat pesé en vue de la détermination du rendement, puis conservé dans des flacons en plastique à 4°C jusqu'à utilisation.

Réalisation du screening phytochimique des extraits de CL

Le principe général était basé sur la formation de complexes insolubles et colorés, grâce aux réactions de précipitation et de coloration. L'intensité de la coloration ou le degré de turbidité était proportionnelle à la quantité de complexes formés [4].

Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de CL

Elle a été réalisée par la méthode de microdilution en milieu liquide (CLSI, 2012). Cette évaluation a consisté à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), et la subculture en milieu liquide pour la détermination de la Concentration minimale bactéricide (CMB).

Préparation des milieux de culture [5].

La gélose Mueller Hinton (MHA) et le bouillon Mueller Hinton (MHB) ont été préparés suivant les instructions du fabricant.

Repiquage des souches

Les différentes souches ont été repiquées au préalable dans des tubes sur milieu solide par la méthode de stries, puis incubées à 37°C pendant 24heures afin d'obtenir une culture jeune. Les colonies isolées de cette culture ont servi à préparer les inocula.

Préparation des inocula bactériens et fongiques

Près de la flamme d'un bec Bunsen, pour chaque souche bactérienne ou fongique, quelques colonies de 24h de vie ont été prélevées à l'aide d'une anse. Elles ont ensuite été introduites dans 10mL d'eau physiologique stérile, jusqu'à obtention d'une turbidité semblable au 0.5 McFarland, correspondant aux concentrations 1.5×10^8 et 1.5×10^6 unités formant colonies /mL (UFC/mL) respectivement pour les bactéries et les levures.

Nous avons ensuite ajusté avec MHB chaque inoculum bactérien et fongique afin d'avoir la concentration de 5×10^6 UFC/mL nécessaire pour nos différents tests.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) [6]

Les paramètres d'inhibition (CMI et CMB) ont été déterminés par la méthode de microdilution en milieu liquide (CLSI, 2012). Elle a été réalisée en utilisant une microplaque de 96 puits

Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) : La détermination de ce paramètre était effectuée par subculture en milieu liquide à partir des préparations prélevées sur les plaques de détermination des CMI selon le protocole de Rhayour (2002) [6].

Rapport CMB/CMI

Après détermination des CMI et des CMB des extraits testés, le ratio CMB/CMI était calculé. Ce rapport permet de confirmer le caractère bactériostatique/ bactéricide d'une substance. Selon (Fauchère et Avril, 2002) : Les substances dites bactéricides, ont un rapport CMB/CMI inférieur ou égal à 4; Les substances dites bactériostatiques, ont un rapport CMB/CMI compris entre 4 et 16 ;

Évaluation de l'activité antioxydante

Elle a été déterminée grâce à trois tests complémentaires : l'activité réductrice des ions Fe³⁺ selon le protocole décrit par Path Canada(1994). Le piégeage du radical DPPH selon la méthode de Brand-Williams et al, (1995); L'activité de l'ABTS basée sur La décoloration du radical,

mesurée par spectrométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants (Lien et al. 1999)[7].

RÉSULTATS

Les tests phytochimiques ont permis de mettre en évidence six familles de métabolites secondaires. (Tableau I)

Tableau I: Résultat du test phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de *Cynoglossum Lanceolatum*

Métabolites secondaires	Alcaloïdes	Phénols	Polyphénols	Tanins	Saponines	Flavonoïdes	Terpénoïdes	Stéroïdes	Anthocyanines	Anthraquinones
Extrait de <i>C lanceolatum</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
- : absence	+ : présence									

Effet de l'extrait hydroéthanolique de *Cynoglossum lanceolatum* sur les souches bactériennes testées

Il ressort de ces images qu'au cours du test de l'INT, les cupules dans lesquelles les bactéries sont vivantes du fait de la respiration que génère le réactif INT ont changé de couleur et on viré au rose (figure 2); tandis que les cupules ou les bactéries ont été tuées ont conservé leur teinte jaune.

Ce test nous permet donc de confirmer les CMI visuelles qui paraissaient un peu ambiguës dans le test d'activité antibactérien (figure 1). Toutefois l'inhibition est plus importante avec *Staphylococcus aureus* comparé aux deux autres espèces (figure 1).

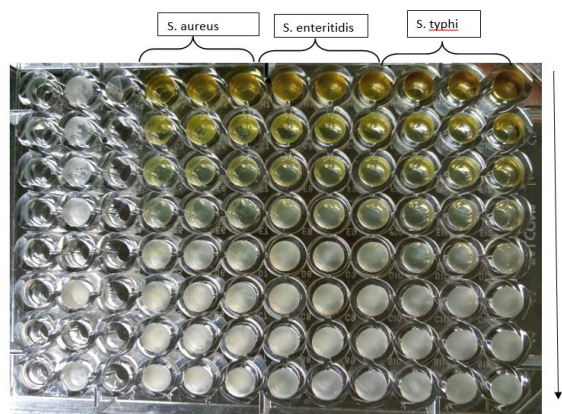


Figure 1: Microplaques montrant les turbidités au cours du test d'activité antibactérien sur *S typhi*, *S enteritidis*, *S Aureus* en présence de différentes concentrations de *C lanceolatum*.

Effet de l'extrait hydroéthanolique de *C lanceolatum* sur les paramètres d'inhibition CMI et CMB.

Le tableau II montre que les extraits de *cynoglossum lanceolatum* obtenus par macération hydroéthanolique, ont toutes une action bactéricide sur les trois souches bactériennes en présence (rapport CMB/CMI < 4);

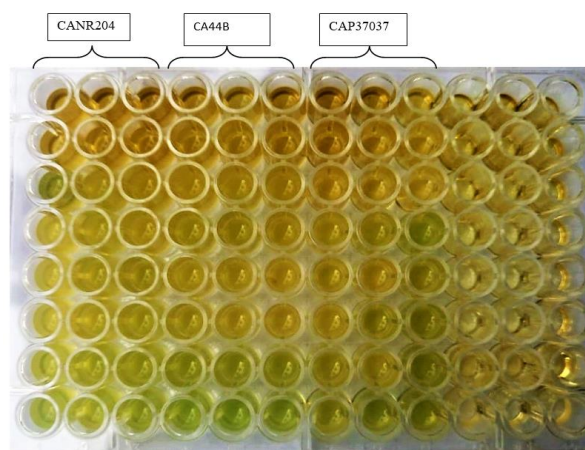


Figure 3: image montrant les turbidités au cours du test d'activité antifongique sur *C albicans* P37037, de l'isolat de *C albicans* 44B et de *C albicans* NR2045 en présence de différentes concentrations de CL.



Figure 2: microplaques montrant les réductions de chlorure de (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (INT) au cours du test d'activité antibactérien sur *S typhi*, *S enteritidis*, *S Aureus*

Tableau II : Paramètres d'inhibition (CMI et CMB), rapport CMB/CMI et classification des extraits de *Cynoglossum lanceolatum* sur les trois bactéries testées

	Paramètres (µg/mL)	Rapport CMB/CMI		Classification des extraits	
		CMI	CMB		
Macération	<i>S aureus</i>	375	750	2	Bactéricide
	<i>S enteritidis</i>	375	375	1	Bactéricide
	<i>S typhi</i>	375	375	1	Bactéricide

S aureus: *Staphylococcus aureus*. *S typhi* : *Salmonella typhi*
S enteritidis: *Salmonella enteritidis*

Effet de l'extrait hydroethanolique de *Cynoglossum lanceolatum* sur les souches de levures testées

On constate qu'en présence des différentes concentrations de *C.lanceolatum*, il y'a inhibition de la croissance pour toutes les souches de *Candida albicans* testées (Figure 3) le calcul du rapport CMB/CMI révèle que notre extrait

hydroéthanolique est fongicide sur les isolats CANR294 ; CA141S, CP et CK. Alors qu'il est fongistatique sur les isolats CA ATTC P37037 ; CA44B ; CANR2045 (Tableau III)

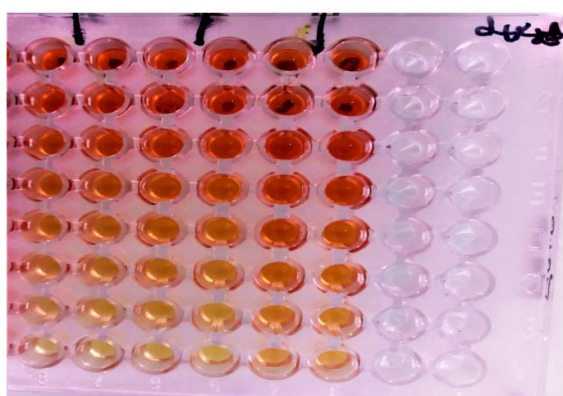
Tableau II : Paramètres d'inhibition (CMI et CMB), rapport CMB/CMI et classification des extraits de *Cynoglossum lanceolatum* sur les sept levures testées

	CANR294	CA141S	CP	CK	CA ATTC P37037	CA44B	CANR2045
CMIv	500	250	500	500	500	500	500
CMmet	500	250	500	500	>2000	>2000	>2000
CMIspec	126	108	378	544	>2000	>2000	>2000
CMB/CMI	1	1	1	1	>4	>4	>4
Classification des extraits de <i>Cynoglossum lanceolatum</i>	Fongicide	Fongicide	Fongicide	Fongicide	Fongistatique	Fongistatique	Fongistatique

CA :*Candida albicans*, CK :*Candida crusei*, CP :*Candida parapsisolsis*, CMIv:CMI visuelle,CMImet : CMI métabolique, CMIspec :CMI spectrophotométrique.

Activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique de CL

Les différents tests de mise en évidence d'une activité antioxydante de notre extrait ont révélé pour la méthode de FRAP, La formation d'un précipité rouge-orange suivie d'une décoloration progressive des cupules (figure 4). , quant à l'activité DPPH antiradicalaire , elle augmente progressivement avec la concentration en extrait jusqu'à atteindre 75% (Figure 5). ces différents tests nous permettent de conclure que les extraits de *Cynoglossum lanceolatum* sont dotés d'une activité antiradicalaire modérée



H= extrait de *C. Lanceolatum* ; I = vitamine C ; J= acide tannique

Figure 4: image de la microplaque montrant les réductions au cours du test de FRAP.

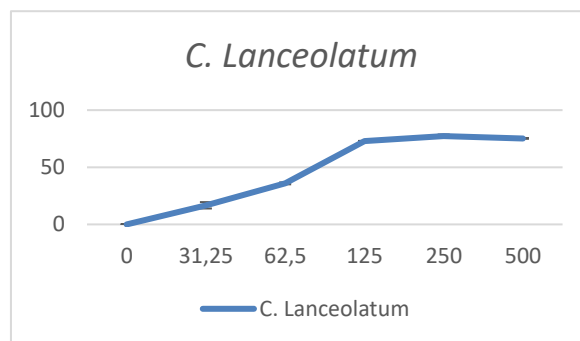


Figure 5: Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Cynoglossum lanceolatum*.

DISCUSSION

Les différents tests nous a permis de mettre en évidence six familles de métabolites secondaires ; nous n'avons pas trouvé des auteurs ayant reporté le profil phytochimique de l'extrait brut de *CL*. Néanmoins, des composés alcaloïdiques ont été isolés des racines de la plante dans les spécimens Asiatiques notamment la Cynaustaline et Cyanustine (Jin et al, 2007). De même, l'acidehexadécanoïque, méthyl ester, beta-sistosterol, 5alpha, stigmastance 3, 6-dione, 6beta-hydroxy-stigmasta-4-en-3-one et daucosterol ont été identifiés par zhan et al, (1996) sur le spécimen chinois. M. Anitha et al avaient identifiés 20 composés chez *Cynoglossum zeylanicum*, il s'agissait préférentiellement des 9,12-Oetadecadienoic (44.18%) [8]. La précision dans la composition en alcaloïde serait due à la méthode utilisée ; GC-MS qui est différente de la méthode colorimétrique que nous avons utilisé. Elle pourrait également s'expliquer par les

différences de solvants utilisés, cette assertion est confirmée par Tan et al qui stipulent que le rendement et la composition en métabolites d'un extrait varient en fonction du type de solvant ou co-solvant [9].

S'agissant de l'activité antibactérienne, le test nous révéla que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles à l'extrait. Quaid-i-Azam et al (2015) [10] ont prouvé dans une étude que les extraits de *CL* n'avaient aucune activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* utilisant l'incorporation sur la gélose, par contre on note une activité de *CL* sur les souches de *Salmonella typhi* et *paratyphi*, ainsi que sur *Staphylococcus epidermidis* [11]. Les différences observées pourraient être dues au solvant d'extraction. En effet, nous avons utilisé un solvant hydroéthanolique afin de se rapprocher le plus possible du solvant traditionnellement employé par les tradithérapeutes dans le traitement du "NDZIBA". L'hypothèse du solvant peut être confirmée par l'absence d'activité sur *Salmonella paratyphi* de l'extrait n-hexanolique, alors qu'une activité remarquable est observée sur la même souche avec cette fois l'extrait éthylacétate de *CL*. Toutefois l'inhibition beaucoup plus marquée avec *Staphylococcus aureus* pourrait s'expliquer par les polyphénols et des triterpènes contenus dans l'extrait.

Les mécanismes probables du pouvoir antibactérien des polyphénols pourraient être basés sur le contact direct de leurs composés hydrophobes avec la membrane cellulaire, et leur pouvoir de répartir les phospholipides en les rendant plus perméables, ce qui causerait des dommages structuraux ou une rupture complète des membranes cellulaires conduisant à la mort cellulaire [12].

Le pouvoir inhibiteur de *salmonella typhi* et *paratyphi* semble être une caractéristique propre du genre *lanceolatum*. En effet plusieurs auteurs ont obtenu des résultats similaires. C'est le cas de Quaid-i-Azam et al 2015 qui ont montré que les extraits méthanoliques et hexanoliques des feuilles et des racines de *Cynoglossum lanceolatum* étaient actifs sur *Salmonella typhi* et *paratyphi*.

L'évaluation des propriétés antifongiques des extraits de *CL* a permis de mettre en évidence de façon qualitative et colorimétrique des métabolites acides issus du métabolisme des levures au cours de leur croissance. Ainsi, toutes les souches fongiques testées ont une activité antifongique marquée ; l'inhibition est totale avec les espèces CANR294, CA141S, CP et CK, alors qu'elle est partielle avec les souches CA P37037, CANR2045, CA44B. Les souches de CK sont retrouvées chez les enfants et nourrissons, leur inhibition pourrait expliquer l'usage traditionnel des extraits de *CL* dans le traitement par purges et lavages chez les enfants souffrant d'affections cutanées. Ces résultats s'opposent à ceux de Quaid-i-Azam et al en 2015 qui n'avaient noté aucune activité antifongique des extraits de *CL* obtenus par trois solvants différents : le méthanol, l'hexane et l'éthyl acétate.

Comparativement aux témoins positifs utilisés au cours des tests de mise en évidence de l'activité antioxydante, l'extrait de *CL* a présenté une faible activité. Par ailleurs, Cheng et al, (2012), travaillant sur les racines du spécimen Chinois, ont montré que les extraits hydroéthanolique avaient une bonne activité diurétique et anti-inflammatoire sur le model à la carragénine et sur le blanc d'œuf [13]. Ces

activités corroborent les résultats que nous avons obtenu car : il est établi que au cours de la réponse inflammatoire, l'organisme produit des radicaux libres tels que l'histamine, l'oxyde nitrique et le radical hydroxyle. Ce dernier étant issu de la réaction de Fenton avec implication du Fe³⁺. La réduction de la réponse inflammatoire pourrait en partie être le fait de la capacité anti oxydante de l'extrait de *C lanceolatum*.

CONCLUSION

La présente étude s'inscrit dans la contribution à la lutte contre les maladies infectieuses. Elle suggère que cette plante est dotée d'un pouvoir antibactérien, antifongique respectivement sur les bactéries de la flore résidente de la peau de l'homme (*staphylococcus aureus*), sur les bactéries responsables de toxi-infections alimentaires (*Salmonella enteritidis et typhi*), et enfin sur les infections fongiques cutanées (*Candida parapsilosis*) invasives et multirésistantes (*Candida albicans, Candida Krusei*). Ce travail, s'inscrivant dans la valorisation des plantes de la riche flore de notre pays d'une part et d'autre part visant à apporter du crédit scientifique à l'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle au Cameroun. Il est donc nécessaire de réaliser des études poussées et d'exploiter cette plante dans le cadre de la mise sur pieds des MTA ou la recherche de nouveaux principes actifs. .

RÉFÉRENCES

1. **Mpondo et al.** P.Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences, 2009 Dec; 23(4):496-507.
2. **Jiofack et al.** Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon, International journal of medicine and medical sciences, 2010; 2(3) 60-79.
3. **Philippe Okusa Ndjolo.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Thèse de pharmacie. Université libre de Bruxelles, université d'Europe 2012 .
4. **Prakash Jamuna, Shirin adel.** Chemical composition and antioxidant properties of ginger root. Journal of medicinal plant research, India, 2011, January 4(24):2674-9.
5. **Fauchère J, Avril J.** Bactériologie générale et médicale, Editions Ellipse; Nov 2002.
6. **Clinical and laboratory standards institute (CLSI).** Methodss for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 2012; 32(2):88.
7. **Lien et al.** Antioxydant activity of flavonoids of different polarity, assayed by modified ABTS cation radical decolorization and EPR technique. Acta biologica cracoviensia series botanica, . 2010 May 52(1):97-104.
8. **Anitha et al.** GC-MS Analysis of Bioactive Components of *Cynoglossum zeylanicum*. Journal of applied pharmaceutical science, India; 2012, Dec 2(17):099-103.
9. **Tan MC, Tan CP, Khoo HE, Ho CW.** Optimization for extraction on total phenolic content and radical scavenging capacity of henna (*Lawsonia inermis*) stems using response surface methodology. Int Food Res J. 2014; 21(2):789-94.
10. **Quaid i azam et al.** Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. Biotechnology progress; 2015; Nov 30(5):1065-75.
11. **Zabta K et al.** Biological activities of commonly used medicinal plants. Pakistan Journal of Botany, 2015; 47(1): 113-120.

12. **Bulot T.** Espaces urbanisés durables et/ou espaces vulnérables en situations plurilingues. 2011 consulté le 04 Mai 2018.
13. **Cheng XY, et al.** A global characterization and identification of multifunctional enzymes. 2012; *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012, 7(6):50-4.
14. **Tan SY, Tatsumura Y.** Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. 2015 Jul;56(7):366–7..
15. **Leung E, Weil DE, Raviglione M, Nakatani H.** The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2011 May;89(5):390–2.
16. **Sourabie TS, Nikiema J, Guissou L, Nacoulma O.** Etude des effets hépatotoxiques d'extraits d'argemone mexicana (papaveraceae), une plante utilisée dans le traitement traditionnel de la jaunisse au Burkina Faso. *Journal of biologie, chimie, sciences*; 2008 Nov;6(3):1139-47.
17. **Brand Williams.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and technology*. 1995, Feb;28(1):25–30.
18. **Parekh J, Chanda S.** Phytochemicals screening of some plants from western region of India. 2008 January 30;24(3):126–31.