

# Antioksidacijska aktivnost lišća masline

---

**Gabre, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:393745>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST LIŠĆA MASLINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**PETRA GABRE**

**Matični broj: 17**

**Split, listopad 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST LIŠĆA MASLINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**PETRA GABRE**

**Matični broj: 17**

**Split, listopad 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
GRADUATE STUDY OF FOOD TEHNOLOGY**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE LEAVES**

**DIPLOMATHESIS**

**PETRA GABRE**

**Parentnumber: 17**

**Split, October 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta održanoj 15. i 16. prosinca 2020. godine.

**Mentor:** Doc. dr. sc. Danijela Skroza

**Pomagala pri izradi:** mag. ing. agr. Martina Čagalj

### ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST LIŠĆA MASLINE

Petra Gabre, 17

**Sažetak:**Listovi masline (*Olea europea* L.) posjeduju veliki potencijal kao prirodni antioksidansi. Danas je sve veći broj istraživanja koji potvrđuju blagotvorne učinke lišća masline na ljudsko zdravlje, kao i mogućnost njihove primjene u prehrambenoj industriji. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski kapacitet lišća masline sorti *Lastovka*, *Levantinka* i divlje masline korištenjem različitih spektrofotometrijskih metoda temeljenih na različitim mehanizmima djelovanja: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbing Capacity*) i DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) metoda. Obzirom na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal određen FRAP metodom, najbolju redukcijsku sposobnost pokazao je ekstrakt lista divlje masline. Najveći antioksidacijski kapacitet i sposobnost neutralizacije hidroperoksil radikala pokazao je ekstrakt kultivirane sorte *Levantinka*. Rezultati svih testiranih uzoraka ukazuju na veliki biološki potencijal ekstrakta lista masline te mogućnosti njegove primjene u prehrambenoj industriji.

**Ključne riječi:** list masline, ukupnifenoli, antioksidacijska aktivnost, FRAP, ORAC, DPPH

**Rad sadrži:** 27 stranica, 9 slika, 1 tablicu, 41 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić- predsjednik
2. Doc. dr. sc. Miće Jakić - član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - član-mentor

**Datum obrane:** 21. listopada 2021. god.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Food Technology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 6 held on 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> December 2020

**Mentor:** Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D

**Assisted in the preparation:** mag. ing. agr. Martina Čagalj

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE LEAVES

Petra Gabre, 17

**Abstract:** Olive leaves (*Olea europea* L.) have great potential as natural antioxidants. Today, a growing number of studies confirm the beneficial effect of olive leaves on human health, but also the possibility of their use in the food industry. The aim of this study was to examine antioxidant activity of olive leaves of *Lastovka*, *Levantinka* and wild olive using different spectrophotometric methods based on different mechanisms of action: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) method. Based on the content of total phenolics and antioxidant potential determined by FRAP method, the best reducing ability was obtained for wild olive leaf extract. The highest antioxidant capacity and ability to neutralize hydroperoxyl radicals was shown by the extract of the cultivated olive variety *Levantinka*. The obtained results for all tested samples indicate a great biological potential of olive leaf extracts and the possibility of their application in the food industry.

**Keywords:** olive leaf, total phenols, antioxidant activity, FRAP, ORAC, DPPH

**Thesis contains:** 27 pages, 9 figures, 1 table, 41 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. Associate Professor Ivana Generalić Mekinić, Ph. D. - chair person
2. Assistant Professor Miće Jakić, Ph. D. – member
3. Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D. – supervisor

**Defence date:** 21<sup>th</sup> October 2021

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroze, u razdoblju od veljače do srpnja 2021. godine.*

*Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood(Reference Number:1467; 2019-SECTION2-4).*



## **ZAHVALA**

*Ovim se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na savjetima i ukazanoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada, ali i tijekom cijelog studija.*

*Također, zahvaljujem se i mag. ing. agr. Martini Čagalj na pomoći prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, dečku i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom studiranja.*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je:

- prikupiti listove nekoliko različitih sorti maslina (*Lastovka*, *Levantika*, divlja maslina)
- biljni material osušiti i pripremiti ekstrakte primjenom mikrovalova
- primjenom različitih metoda (DPPH, FRAP, ORAC) u ekstraktima odrediti antioksidacijsku aktivnost
- usporediti dobivene rezultate i izvesti zaključke o utjecaju sorte na antioksidacijski potencijal

## SAŽETAK

Listovi masline (*Olea europea* L.) posjeduju veliki potencijal kao prirodni antioksidansi. Danas je sve veći broj istraživanja koji potvrđuju blagotvorne učinke lišća masline na ljudsko zdravlje, kao i mogućnost njihove primjene u prehrambenoj industriji. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski kapacitet lišća masline sorti *Lastovka*, *Levantinka* i divlje masline korištenjem različitih spektrofotometrijskih metoda temeljenih na različitim mehanizmima djelovanja: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbing Capacity*) i DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) metoda. Obzirom na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal određen FRAP metodom, najbolju redukcijsku sposobnost pokazao je ekstrakt lista divlje masline. Najveći antioksidacijski kapacitet i sposobnost neutralizacije hidroperoksil radikala pokazao je ekstrakt kultivirane sorte *Levantinka*. Rezultati svih testiranih uzoraka ukazuju na veliki biološki potencijal ekstrakta lista masline te mogućnosti njegove primjene u prehrambenoj industriji.

**Ključne riječi:** list masline, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost, FRAP, ORAC, DPPH

## SUMMARY

Olive leaves (*Olea europea* L.) have great potential as natural antioxidants. Today, a growing number of studies confirm the beneficial effect of olive leaves on human health, but also the possibility of their use in the food industry. The aim of this study was to examine antioxidant activity of olive leaves of *Lastovka*, *Levantinka* and wild olive using different spectrophotometric methods based on different mechanisms of action: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) method. Based on the content of total phenolics and antioxidant potential determined by FRAP method, the best reducing ability was obtained for wild olive leaf extract. The highest antioxidant capacity and ability to neutralize hydroperoxyl radicals was shown by the extract of the cultivated olive variety *Levantinka*. The obtained results for all tested samples indicate a great biological potential of olive leaf extracts and the possibility of their application in the food industry.

**Keywords:** olive leaf, total phenols, antioxidant activity, FRAP, ORAC, DPPH

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Maslina ( <i>Olea europea</i> L.).....	2
1.2. Sistematika masline.....	3
1.3. Autohtone sorte maslina u Hrvatskoj.....	3
1.3.1. <i>Lastovka</i> .....	4
1.3.2. <i>Levantinka</i> .....	5
1.4. Divlja maslina.....	6
1.5. List masline.....	6
1.5.1. Kemijski sastav lista.....	7
1.6. Fenolni spojevi.....	8
1.6.1. Oleuropein.....	8
1.7. Primjena i pozitivno djelovanje lista masline.....	9
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
2.1. Biljni material.....	11
2.2. Priprema ekstrakata.....	11
2.3. Kemikalije i uređaji.....	12
2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	13
2.4.1. FRAP metoda.....	13
2.4.2. ORAC metoda.....	14
2.4.3. DPPH metoda.....	15
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
3.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti lišća masline.....	17
4. ZAKLJUČCI.....	23
5. LITERATURA.....	24

## UVOD

Maslina (*Olea europaeae* L.), stoljećima stara biljna vrsta, zbog svoje posebnosti ubraja se među najcjenjenije voće. Simbolika ovog zimzelenog stabla, koje najčešće nalazimo uz obale Sredozemlja, znana je ljudima još od davnina. Iako su plod i drvo najviše korišteni dijelovi masline, dobro je poznata primjena lišća masline u liječenju različitih bolesti. Posljednjih godina list masline dobiva sve više na važnosti upravo zbog visokog sadržaja bioaktivnih fenolnih spojeva koji se smatraju odgovornim za brojne farmakološke učinke. (1)

Biološki aktivne tvari mogu se definirati kao prirodni, nenutritivni, aktivni sastojci koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu. Zbog povećane stope kroničnih oboljenja u razvijenim zemljama, uloga prehrane u prevenciji zdravlja dobiva sve veće značenje. Pa tako dolazi i do povećanog broja istraživanja koja potvrđuju prehrambena i ljekovita svojstva brojnih biljnih vrsta, među kojima se ističe i maslina.

Ekstrakt lista masline, zahvaljujući prisutnim fenolnim spojevima, pokazuje vrlo dobra antioksidacijska i druga biološka svojstva. Zbog svog pozitivnog djelovanja, osim u svrhu liječenja i sprječavanja bolesti, prirodni antioksidansi postaju sve češća zamjena sintetskim antioksidansima koji se primjenjuju u prehrambenoj industriji.

Svrha ovog rada je ispitati antioksidacijski potencijal ekstrakata lišća masline korištenjem različitih spektrofotometrijskih metoda..

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Maslina (*Olea europea* L.)

Maslina (*Olea europea* L.) je jedna od najstarijih poljoprivrednih, drvenastih, zimzelenih kultura, a rasprostranjena je na svim kontinentima. (2) Zajednička poveznica svima je simbol masline kao svetog drva, slijedom čega predstavlja simbol mira, mudrosti, snage, pobjede, napretka, vjernosti i čistoće, ali i ljekovitosti i svjetlosti. Maslina je prisutna u duhovnom, kulturnom i gospodarskom životu Mediterana od samih početaka razvoja civilizacije pa sve do danas. Najstariji nalazi kulture masline datiraju još iz 4. tisućljeća prije Krista s područja istočnog Mediterana. (3)



**Slika 1.** Stablo masline(4)

Maslina je dugovječno stablo zahvaljujući sposobnosti razvijanja adventivnih pupova u nepovoljnim uvjetima. Raste na područjima s mediteranskom klimom, koju odlikuje vrlo malo kiše, a obilje sunca, zbog čega je tlo na kojem maslina raste pretežno suho. (5) Ime je dobila po latinskoj riječi *olea*, što znači ulje jer sadrži visoki udio ulja u plodovima (13- 28%). (6) Upravo se zbog plodova i ulja maslina uzgaja već tisućama godina.

## 1.2.Sistematika masline

Maslinu ubrajamo u porodicu Oleaceae koja broji do 30 rodova. Najznačajniji je rod *Olea*, a jedina vrsta s jestivim plodovima je maslina ili *Olea europea* L. (5,6) Razlikujemo dvije podvrste, divljumaslinu, *Olea europaea oleaster* Hoffm. i Link, te pitomu– kultiviranumaslinu, *Olea europaea sativa* Hoffm. i Link. (7) Utvrđena je značajna sličnost između kultiviranih sorti masline i divljih maslina, zbog čega se divlje masline mogu smatrati roditeljskom grupom kultiviranih sorti. (3)

**Tablica 1.** Klasifikacija roda *Olea*(8)

<b>Carstvo</b>	Plantae
<b>Odjeljak</b>	Magnoliophyta
<b>Razred</b>	Magnoliopsida
<b>Red</b>	Lamiales
<b>Porodica</b>	Oleaceae
<b>Rod</b>	<i>Olea</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Olea europea</i> L.

## 1.3.Autohtone sorte maslina u Hrvatskoj

Danas je u svijetu poznato preko 700 sorti maslina, a u Hrvatskoj ih je oko 60. Nisu sve vrste pogodne za uzgoj u priobalnom području, pa se neke mogu naći u unutrašnjosti zemlje. Zahvaljujući različitim tipovima klime, reljefa, tradicija te socio-ekonomskih prilika, Hrvatska ima velik i raznolik broj sorti na cjelokupnom maslinarskom području kojem pripada šest podregija uzgoja, a to su: Sjeverna, Srednja i Južna Dalmacija, Unutrašnjost Dalmacije, Istra, Hrvatsko Primorje i Kvarner. (5)



### 1.3.1. *Lastovka*

*Lastovka* je korčulanska autohtona sorta masline. Iako bi se po imenu sorte reklo da potječe s otoka Lastova, stabla *Lastovke* ne nalazimo na tom području. Jedna od teorija o podrijetlu *Lastovke* kaže da je ona prirodni križanac sorti *Oblice* i *Drobnice*, dok druga teorija kaže da je prirodni križanac između pitome i divlje masline, zbog čega se često naziva još i pitomi olivaster. (3)

Stablo *Lastovke* je srednje bujno, razvijeno, a krošnja poprima oblik piramide zahvaljujući uspravnom rastu grana. List je sitan, uzak i kratak, u obliku koplja, a lice mu jetamno-zelene boje. Ime *Lastovka* dobila je po izgledu grančica i ploda koji podsjećaju na krila lastavice. (3)

Zbog velikog udjela ulja u plodu (oko 24%) i izuzetne kvalitete istog, smatra se gospodarski vrlo vrijednom sortom. Također, smatra se hrvatskom sortom masline s najvećim udjelom ulja. Boja ulja je izrazito zelena, a okus vrlo pikantan. Najveća prednost ove sorte je otpornost na sušu, dok joj je mana osjetljivost na rak masline i niske temperature. Kupažirano ulje sorti *Lastovke*, *Oblice* i *Drobnice* jedan je od prepoznatljivih proizvoda otoka Korčule, a posebno mjesta Blata gdje se ove tri sorte uzgajaju u konsocijaciji. (3)



**Slika 2.** Listovi i plodovi *Lastovke*(9)

### 1.3.2. *Levantinka*

Porijeklo *Levantinke* nije razjašnjeno, ali se smatra domaćom sortom masline. Ime *Levantinka* podsjeća na njeno porijeklo s Levanta, kako se nekada nazivalo područje Bliskog istoka. Naziva se još i *Šoltankom* jer je najveća populacija sorte na otoku Šolti. (3)

*Levantinka* razvija vrlo bujnui okruglastu krošnjju. List joj je velik, širok i dug, po dužini blago uvijen. Lice lista je tamno-zelene boje, dok mu je naličje bjelkasto.(3)

Prema brojnosti u ukupnoj populaciji masline u našoj zemlji ova sorta je na četvrtom mjestu. Gospodarski je veoma vrijedna u prvom redu zbog redovite i obilne rodnosti te dobre otpornosti na rak masline,ali je slabo otporna na sušu. (10)

Zbog visokog stupnja samooplodnje daje obilati rod, s tri do pet plodova smještenih poput grozdova. Udio ulja u plodu je oko 20% i vrlo je dobre kvalitete.Slatkastog je okusa te je umjereno pikantno,a mirisom podsjeća na svježju travu i zgnječeni list masline. (3)



**Slika 3.** Listovi i plodovi *Levantinke*(11)

#### 1.4.Divlja maslina

Divlja maslina je samonikla i rasprostranjena je po cijelom Mediteranu u sastavu makije. Kod nas je također prisutna kao sastavni dio biljke česmine (*Quercetum ilicis*), raste kao grm, a rjeđe kao stablo. Ima vrlo sitne plodove i daje mali prirod. Koristi se kao podloga i oprašivač pitome masline, a u prošlosti se ulje divlje masline često se preporučavalo u medicinske svrhe. (7)



Slika 4. Listovi i plodovi divlje masline(12)

#### 1.5.List masline

List masline podijeljen je na lisnu plojku, petelju i dršku. Dorziventralno je građen što znači da ima i lice i naličje. Naličje sadrži velik broj puči i zvjezdaste mrtve dlačice koje mu daju bijelu boju te su ispunjene zrakom i na taj način štite od isušivanja, minimaliziraju transpiraciju i reflektiraju zrake Sunca. List je kožnat što doprinosi zaštiti od isušivanja. Najvažnija uloga lista je fotosinteza, a ona se odvija u mezofilu lista. List masline može biti različitih oblika, boje, veličine i nazubljenosti ovisno o vrsti. (5) Također, list je i glavno mjesto odvijanja primarnog

sekundarnog metabolizma masline. Bogat je važnim biološkim komponentama zbog kojih se koristi u različite svrhe (prehrambene, terapijske...).(13)



**Slika 5.** Izgled lista masline(14)

### **1.5.1. Kemijski sastav lista**

List masline sadrži veliki broj fenolnih spojeva koji su dobro poznati zbog svog antioksidacijskog potencijala, pa mu se pripisuje i najveća antioksidacijska moć od svih ostalih dijelova stablate ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Od fenola najzastupljeniji su fenolne kiseline, fenolni alkoholi (tirozol i hidroksitirozol), flavonoidi (luteolin 7-*O*-glukozid, rutin, apigenin 7-*O*-glukozid, luteolin 4-*O*-glukozid) i sekoiridoidi (oleuropein). (15) Kemijski sastav lišća masline varira ovisno o nekoliko faktora kao što su vrsta, podrijetlo, udio grana na stablu, uvjeti skladištenja, klimatski uvjeti, sadržaj vlage i stupanj onečišćenosti. Osim toga, strukturni sadržaj ugljikohidrata i dušika u lišću masline ovisi o čimbenicima kao što su sorta masline, klimatski uvjeti, godina uzgoja...(16)

Razvijene su različite metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih i sekoiridoidnih spojeva: tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) i kapilarna elektroforeza (CE). U plodovima, fenolne kiseline, flavonoidi i sekoiridoidi zastupljeni su sa 1-3%, a u listovima

oleuropein je zastupljen s 19%, flavonoidi s 1,8%, od čega čak 0,8% otpada na luteolin 7-glukozid. (16)

## 1.6.Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji imaju vrlo važnu ulogu u sprječavanju stvaranja slobodnih radikala te u zaštiti od bolesti. S obzirom na nepovoljne uvjete (sušna područja, napadi kukaca i štetnika) u kojima maslina raste, biljka sintetizira veliku količinu fenola kako bi preživjela navedene uvjete i obranila se. (17) Upravo zbog toga je antioksidacijsko djelovanje fenola predmet brojnih istraživanja.(18)

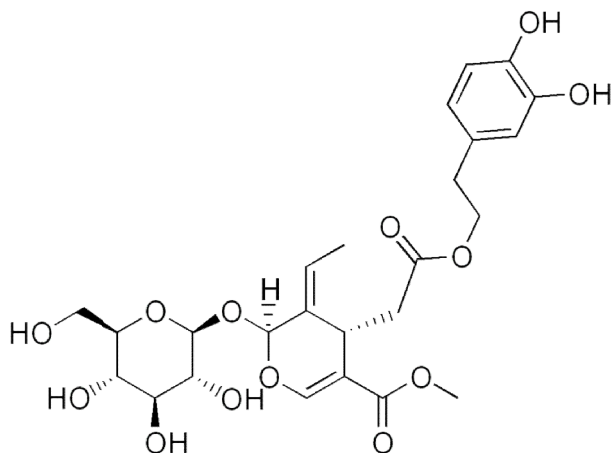
Fenolni spojevi koji se nalaze u listu masline podijeljeni su u pet skupina s obzirom na strukturalne obilježja:(1)

- sekoiridoidi (oleuropein, dimetiloleuropein, verbaskozid, ligstrozid)
- flavoni (luteolin, diosmetin, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid)
- flavonoli (rutin, kvercetin, kamferol)
- flavan-3-oli (katehin)
- supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina, kava kiselina)

### 1.6.1. Oleuropein

Najistaknutiji i najzastupljeniji polifenol u lišću masline je oleuropein. Prvi puta je izoliran početkom 20.stoljeća, a različite studije navode upravo oleuropein kao najvažniji biološki aktivni spoj u lišću masline. (19)

Oleuropein je heterozidni ester  $\beta$ -glikozilirane elenolske kiseline i 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozola). (20)



**Slika 6.** Struktura oleuropeina(21)

Velike količine oleuropeina nalaze se u plodovima i listovima masline, dok je hidroksitirozol, koji je razgradni produkt oleuropeina, zastupljeniji u prerađenim plodovima i maslinovom ulju. Smanjenje koncentracije oleuropeina, tj. povećanje koncentracije hidroksitirozola pripisuje se kemijskim i enzimskim reakcijama tijekom sazrijevanja ili prerade plodova.(19) U listovima je zastupljen s 1-14% (60-90 mg/g suhe tvari, a u mladim maslinama do 140 mg/g), dok ga u ulju ima samo 0,005-0,12%. (16,22) Oleuropein ima nekoliko dokazanih pozitivnih farmakoloških učinaka, poput antioksidativnog, antikancerogenog, antimikrobnog, antiinflamatornog učinka, a djeluje i kardioprotektivno.(18)

### **1.7.Primjena i pozitivno djelovanje lista masline**

Lišće masline dobro je poznato po svojim blagotvornim učincima na metabolizam kada se koristi kao tradicionalni biljni lijek. Ova svojstva pripisuju se upravo fenolnim spojevima lišća masline. (16) Već od davnih vremena poznata su iscjeljujuća i zdravstvena svojstva maslinovog lišća. (23) Jedno od prvih uspješnih ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz listova masline bilo je jednostavno pravljenje čaja. Zabilježeni su terapijski učinci čaja od listova masline protiv običnih prehlada, suhog kašlja, vrućice ili upala mokraćnog mjehura. (24)

Oleuropein, najzastupljeniji polifenol u lišću masline, sprječava srčane bolesti štiteći membranu od oksidacije lipida, utječući na širenje koronarnih krvnih žila, djelujući antiaritmički, poboljšavajući metabolizam lipida, štiteći enzime (25), sprječavanjem hipertenzivne smrti stanica u pacijenata s rakom, i svojim antivirusnim svojstvima. (26) Istraživanja polifenola masline također su dovela do izolacije određenih spojeva, poput oleokantala u maslinovom ulju, sa zanimljivim djelovanjem sličnom djelovanju ibuprofena. (27,28) Nadalje, ekstrakt maslinovog lista bio je koristan u tretiranju bolesti poput malarije, gripe, raznih virusnih oboljenja, proljeva, zubnih i slušnih problema te infekcija nakon operacijskih zahvata. (19)

Današnja uporaba ekstrakta lista masline usmjerenaje na industrijsku upotrebu jer u proizvodnji maslinovog ulja jako puno ostataka otpada na listove (25 kg listova i grana godišnje po stablu) (29) Ekstrakti lista masline se također koriste u kozmetičkoj industriji kao „anti-age“ proizvodi. (19) Prilikom proizvodnje maslinovog ulja listovi se mogu dodati kako bi se povećao pozitivan učinak na zdravlje te poboljšao okus ulja obzirom da dodatak lišća povećava sadržaj polifenola i klorofila, ali i poboljšava organoleptička svojstva ulja. (23)

Postoji nekoliko flavonoida koje sadrži ekstrakt lista masline, a nisu zabilježeni u ulju ploda. Neki od njih su apigenin i luteolin, za koje se smatra kako imaju antikancerogena svojstva. Također, razlikuje se i struktura fenola ploda i lista. Smatra se da su fenoli ekstrakta lista masline glikozilirani u većoj mjeri te kako imaju bolju biodostupnost i bioiskoristivost upravo zbog prisutnosti šećera. U nekim istraživanjima je prikazana mogućnost korištenja polifenola ekstrakta lista masline u inhibiraju prolifracije tumorskih stanica gušterače i dojke, a dokazan je i potencijalno povoljan utjecaj na leukemiju. Vrlo bitno svojstvo oleuropeina i hidroksitirozola je to da razlikuju tumorske stanice od normalnih, odnosno inhibiraju proliferaciju isključivo tumorskih stanica. (23)

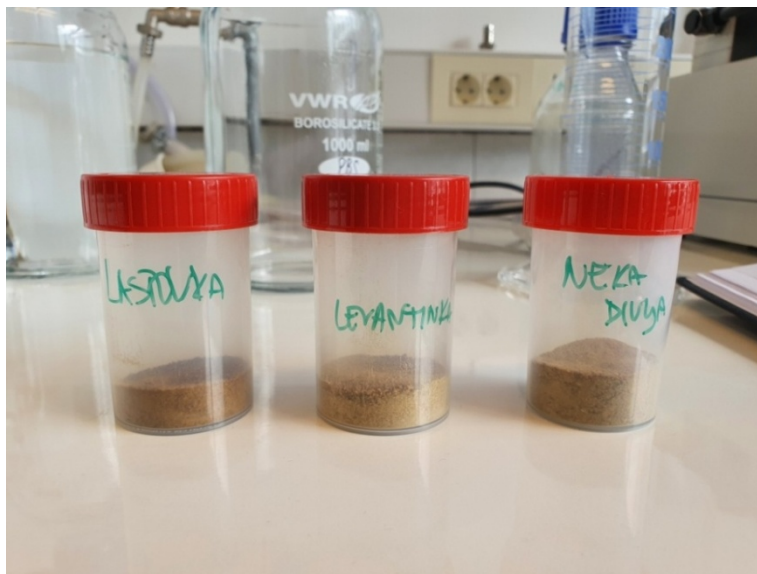
## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni material

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su listovi dviju kultiviranih sorti masline; *Lastovka* i *Levantinka* te listovi divlje masline. Listovi kultiviranih sorti prikupljeni su sa jedinki u 20 godina starom standardiziranom nasadu maslina (Olive ARCHARD) u Planom pored Trogira na nadmorskoj visini od 141 m, dok je lišće divlje sorte masline ubrano na području Marine (Trogir).

### 2.2. Priprema ekstrakata

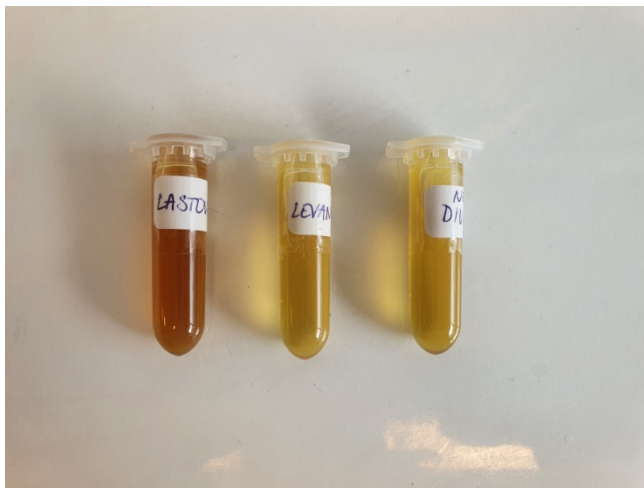
Prije postupka ekstrakcije listovi su osušeni prirodnim putem; na sobnoj temperaturi u tami. Pomoću električnog mlinca, listovi su homogenizirani do finog praha. Potom je 50 g biljnog materijala ekstrahirano s 250 mL 50% etanola u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju (600W, 5 minuta). Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani preko nabranog filter papira, a dobiveni filtrat je liofiliziran.



Slika 7. Liofilizirani uzorci



Masa od 40 mg liofiliziranog ekstrakta otopljena je u 2 mL destilirane vode i tako pripremljeni uzorci koristili su se za daljnje analize. Do ispitivanja, uzorci su čuvani u zamrzivaču pri temperaturi od -18 C.



**Slika 8.** Vodeni ekstrakti lista masline

### **2.3. Kemikalije i uređaji**

Korištene kemikalije u eksperimentalnom dijelu radu su:

- natrijev fosfat dihidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD)
- dinatrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD)
- fluorescein (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany)
- AAPH, 2,2-azobis (2-metilpropionamid) – dihidroklorid (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD)
- Trolox, (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina)  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ,  $M_r=250,29$  g/mol, 97% čistoće (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka)
- natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa} \times \text{H}_2\text{O}$  (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija)
- glacijalna octena kiselina,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija)
- klorovodična kiselina, 37% (Panreac, Barcelona, Španjolska)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$  (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)

- željezo (III) klorid, FeCl<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol p.a. (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil, slobodni radikal) C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Korišteni uređaji u radu su:

- Mlinac za kavu, Joy Delimano, Hrvatska
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, ETHOS X, Milestone Srl, Sorisole, Italija
- Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, UK
- Liofilizator, FreeZone 2,5L, Labconco, Kansas City, SA
- Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise, Tecan Group Ltd, Mannedorf, Švicarska
- Tecan BioTek, model: Synergy HTX, Inc., Winooski, VT
- Mikrotitarske pločice, nesterilne, Sarsted, Njemačka

## 2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

### 2.4.1. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom određuje se sposobnost uzorka, tj. antioksidansa da reducira Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup> u kiselom mediju pri pH= 3,6. Nastali ioni reagiraju s TPTZ reagensom (2,4,6-tripiridil-s-triazin) prilikom čega dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa u plavi što se prati pri 595 nm. (30)

#### Reagensi:

- Acetatni pufer, c (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>×3H<sub>2</sub>O)=300 mmol/L, pH= 3,6.
- Otopina klorovodične kiseline, c (HCl)=40 mmol/L.
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl
- Otopina željezovog(III) klorida, c (FeCl<sub>3</sub>)=20 mmol/L.
- FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine FeCl<sub>3</sub> i 2,5 mL TPTZ-a

**Postupak:**

FRAP reagens je pripravljen miješanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mmol/L), 2,5 mL otopine željezovog(III) klorida (20 mmol/L) i 2,5 mL otopine 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ) u HCl (40 mmol/L). U jažice mikrotitarske pločice otpipetirano 300  $\mu$ L pripravljene otopine FRAP reagensa te se očita absorbancija reagensa pri 592 nm. Zatim se doda 10  $\mu$ L uzorka koji uzrokuje pojavu plavog obojenja koje se očita nakon četiri minute. Razlika između konačne vrijednosti i vrijednosti absorbancije očitane prije dodatka uzorka predstavlja promjenu absorbancije pomoću koje se računa FRAP vrijednost uzorka. Kao standard korišten je sintetski antioksidans (analog vitamina E topiv u vodi) pod nazivom Trolox, a rezultati su izraženi kao  $\mu$ M Trolox ekvivalenata (TE). Sva mjerenja urađena su tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

**2.4.2. ORAC metoda**

ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda je naširoko korištena metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala. Ova metoda spada u HAT skupinu antioksidacijskih metoda i njom se mjeri sposobnost antioksidansa da inhibira peroksil radikale. Kao izvor radikala se najčešće koristi spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se pri temperaturi od 37°C raspada stalnom brzinom. Kod ORAC metode, antioksidansi djeluju na način da doniraju proton radikal, a nastali radikal AAPH reagira s fluoresceinom pri čemu dolazi do pada fluorescencije. Ukoliko u smjesi nema antioksidansa slobodni radikali će brzo "ugasiti" fluorescenciju medija jer antioksidans štiti fluorescentnu molekulu od razgradnje i na taj način održava intenzitet fluorescencije.<sup>(31)</sup> Antioksidacijska aktivnost se određuje iz razlike površina ispod krivulje koja prati pad fluorescencije reakcijske smjese u vremenu za uzorak (antioksidans), a kao standardna otopina korišten je Trolox.

### **Reagensi:**

- Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M
- Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M
- Fluorescein: Stock otopina (c=4,2 mM)
- Radna otopina fluoresceina (c=0,8  $\mu$ M)
- AAPH: 0,207 g AAPH otopi se u 5 ml 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h
- Otopina standarda – Trolox: c=5-50  $\mu$ M

### ***Postupak:***

U svaku jažicu mikrotitarske pločice doda se 150  $\mu$ L fluoresceina i 25  $\mu$ L uzorka. Uzorak predstavljaju 0,075 M fosfatni pufer za slijepu probu (blank), otopina standarda Trolox-a za izradu baždarne krivulje i uzorci ekstrakata lišća maslina (pri odgovarajućem razrjeđenju, 1:1000). Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C. Potom se dodaje 25  $\mu$ L AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{eks} = 485$  nm i  $\lambda_{em} = 520$  nm. Sva mjerenja su urađena tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

### **2.4.3. DPPH metoda**

DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) metoda je jedna od najkorištenijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na redukciji stabilnog, slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil koji u prisutnosti elektron donora, tj. antioksidansa, mijenja boju iz ljubičaste u žutu, što se prati pri valnoj duljini od 492 nm.(32)

### **Reagensi**

- Otopina DPPH radikala, c=0,04 mg/mL
- Radni DPPH pripravlja se razrjeđivanjem otopine DPPH radikala etanolom, sve dok se ne postigne absorbancija otopine 1,2 ( $\pm$ 0,002) pri 492 nm i to neposredno prije mjerenja.

***Postupak:***

U jažice mikrotitarskih pločica dodano je 290  $\mu\text{L}$  radne otopine DPPH reagensa te mu je očitana absorbancija prije dodatka uzorka ( $AC(0)$ ), nakon čega se doda 10  $\mu\text{L}$  uzorka prethodno razrijeđenog s vodom u omjerima 1:2, 1:10 i 1:20 te se očitava absorbancija pri 517 nm nakon 60 minuta ( $AA(t)$ ). Sva mjerenja urađena su tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(AC(0) - AA(t)) / AC(0)] \times 100$$

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Danas je veliki broj metoda kojima se određuje antioksidacijska aktivnost različitih uzoraka, uključujući i antioksidacijsku aktivnost različitih ekstrakata. Obzirom na različit mehanizam djelovanja određene metode, često se primjenjuje veći broj različitih analiza kako bi se odredio ukupni antioksidacijski potencijal.

U ovom radu, za određivanje antioksidacijskog djelovanja ekstrakata lišća različitih sorti maslina, korištene su metode koje se temelje na prijenosu atoma vodika (HAT) i metode koje se temelje na prijenosu elektrona (ET).

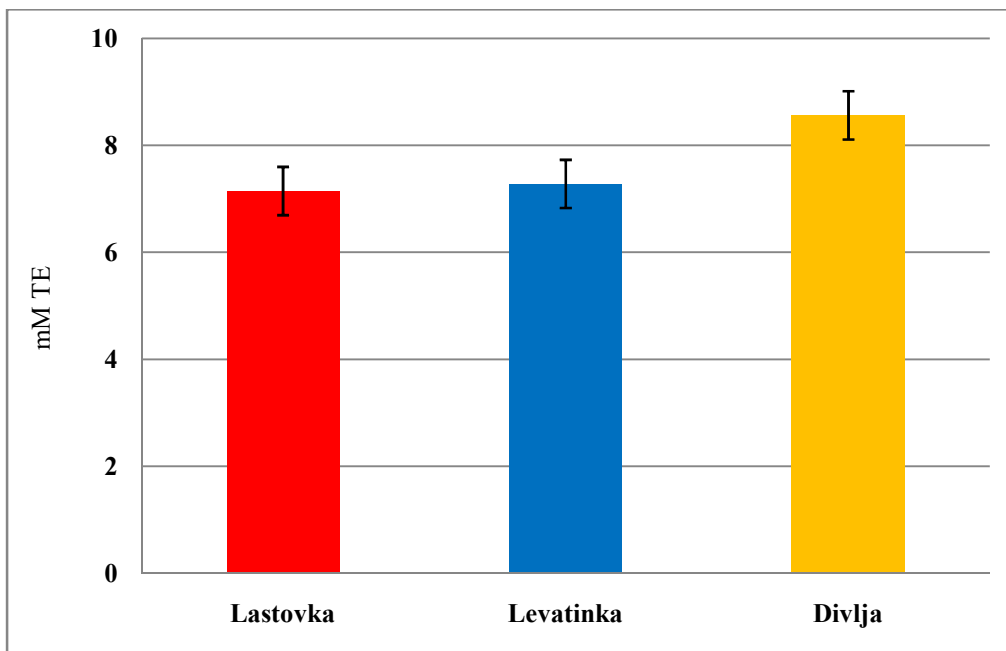
Metode koje se temelje na HAT mehanizmu mjere sposobnost antioksidansa da 'hvata' slobodne radikale donirajući im vodikov atom, a metode ORAC i DPPH pripadaju toj skupini. ET metode mjere redukcijsku sposobnost antioksidansa, a baziraju se na redoks reakciji:

Oksidans + e<sup>-</sup> (iz antioksidansa) → reducirani oksidans + oksidirani antioksidans

ET skupini metoda pripada korištena FRAP metoda. (33)

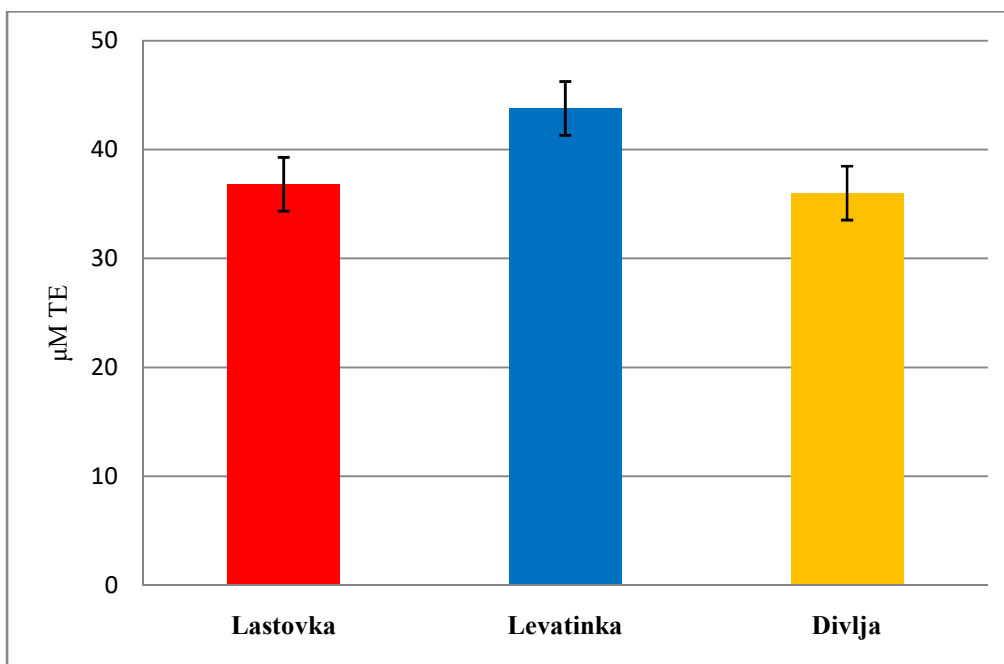
#### 3.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti lišća masline

Redukcijska sposobnost ispitanih uzoraka lišća masline određena FRAP metodom prikazana je na slici 7. Usporedbom dobivenih FRAP vrijednosti može se primjetiti da najbolju redukcijsku sposobnost imao ekstrakt lišća divlje masline s FRAP vrijednosti 8,44 mM TE. Međutim, i ekstrakti lišća *Lastovke* (FRAP vrijednost 7,01mM TE) i ekstrakti lišća *Levantinke* (FRAP vrijednost 7,09mM TE) ne odstupaju značajnosa svojom antioksidacijskom aktivnošću u usporedbi s divljom maslinom.



**Slika 7.** Usporedni prikaz rezultata redukcijske sposobnosti ekstrakata lišća masline određene FRAP metodom

Usporedbom sadržaja ukupnih fenola s dobivenim FRAP vrijednostima, može seuočiti povezanost između dobivenih rezultata. Naime, ekstrakt lista divlje masline imao je najveći udio ukupnih fenola (2080,56 mg ekvivalenata galne kiseline (GAE/L) u odnosu na ekstrakt lista *Levantine* (1906,25 mg GAE/L) i ekstrakt lista *Lastovke* (1505,56 mg GAE/L). Ekstrakt lista divlje masline s najvećim sadržajem ukupnih fenola pokazao je najbolju redukcijsku sposobnost, dok je ekstrakt lista *Lastovke* s najmanjim sadržajem fenola pokazao najslabiju redukcijsku sposobnost.



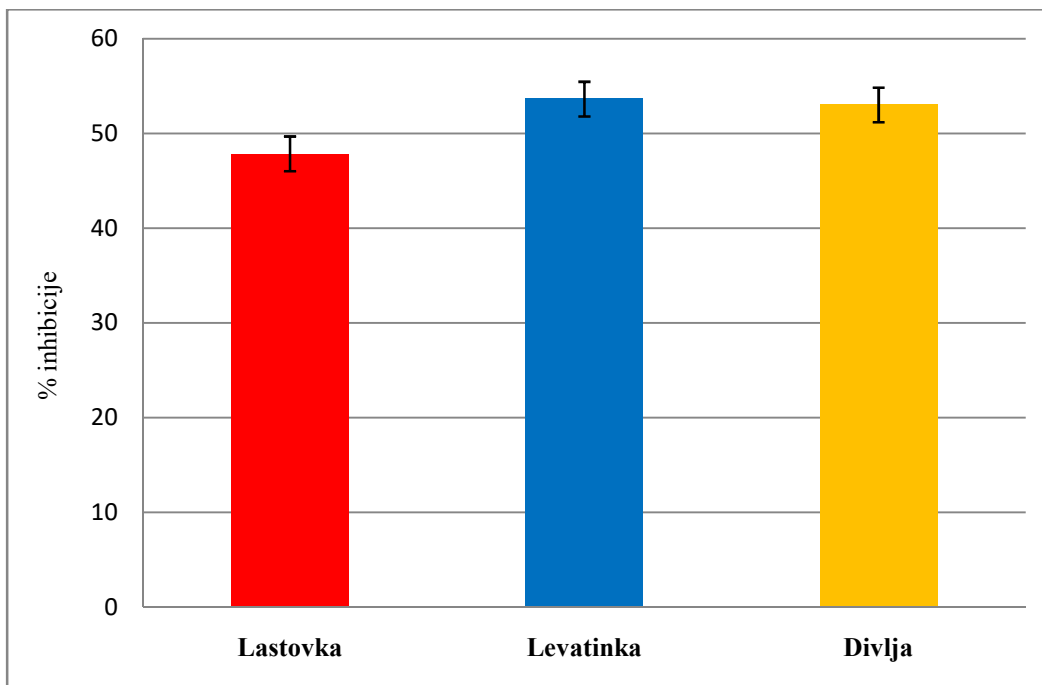
**Slika 8.** Usporedni prikaz antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lišća masline određene ORAC metodom

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lišća masline ORAC metodom određena je pri razrjeđenju 1:1000, a dobiveni rezultati su prikazani na slici 8.

Usporedbom rezultata dobivenih ORAC metodom može se uočiti da najbolju sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala ima ekstrakt lišća sorte *Levatinka* s ORAC vrijednošću 42,40 μM TE. Nešto slabiju antioksidacijsku aktivnost pokazao je ekstrakt lišća sorte *Lastovka* s ORAC vrijednosti 36,10 μM TE i ekstrakt lišća divlje masline s 34,45 μM TE.

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata lišća masline DPPH metodom određena je pri razrjeđenju 1:10, a dobiveni rezultati su prikazani na slici 9. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ukazuju na vrlo dobar antioksidacijski kapacitet svih testiranih ekstrakata. Ekstrakt lista *Levantine* pokazao je najbolju aktivnost, tj. postigao je 50,6% inhibicije DPPH radikala. Slijedi ga ekstrakt lista divlje masline koji je ovom metodom postigao 49,9% inhibicije DPPH radikala. Ekstrakt lista *Lastovke* s najmanjim udjelom ukupnih fenola je uhvatio gotovo 44% molekula slobodnih DPPH radikala što pokazuje da i ovaj ekstrakt također ima dobar antioksidacijski potencijal.





**Slika 9.** Usporedni prikaz antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata lišća masline određenog DPPH metodom

Usporedbom rezultata dobivenih DPPH i ORAC metodom može se uočiti da je ekstrakt lista *Levantinke* pokazao najbolju antioksidacijsku aktivnost u ovim dvjema metodama. Rezultati ovih dviju metoda su slični, što je i očekivano budući da se obje metode temelje se na istom mehanizmu djelovanja (HAT; prijenost atoma vodika). Dok s druge strane, FRAP metoda pokazuje drugačiji rezultat gdje je *Levantinka* imala najslabiji antioksidacijski potencijal, što je znak da ovaj ekstrakt ima najnižu redukcijsku aktivnost.

Kiritsakis i sur. (2009) proučavali su sastav i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lišća tri različita grčka kultivara maslina. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenjena je DPPH metoda, a korištena su i različita otapala. Uočene su neznatne razlike u djelovanju među ekstraktima lista masline različitih sorti. Istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju između antioksidacijskog djelovanja ekstrakta lista masline i udjela ukupnih fenola. (34)

Također, Mujić i sur. (2011) promatrali su povezanost antioksidacijskog potencijala i sadržaja fenola u ekstraktima lišća različitih istarskih kultivara maslina. Svi ispitivani uzorci pokazali su

visoku sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala te je antioksidacijsko djelovanje bilo u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola. (35)

Hayes i sur. (2012) proveli su istraživanje na ekstraktu lista masline koristeći FRAP, ORAC i DPPH metodu te su određivali sadržaj ukupnih fenola. Ekstrakt lista masline pokazao je visok udio ukupnih fenola (oko 160 mgGAE/g) te vrlo dobru antioksidacijsku aktivnost kod svih prethodno navedenih metoda. Time je dokazana veza između ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. U njihovom istraživanju, korelacije između dobivenih rezultata pokazuju da se antioksidacijski kapacitet ekstrakta masline može predvidjeti s obzirom na provedena ispitivanja, no isto se ne može zaključiti za rezultate ovog diplomskog rada obzirom da su korišteni drugačiji standardi za izražavanje rezultata. (36)

Brahni i sur. (2012) istraživali su antioksidacijski potencijal DPPH metodom te sadržaj ukupnih fenola u lišću masline branom u veljači i listopadu. Prilikom pripremanja ekstrakata korištena su različita otapala za ekstrakciju što može utjecati na antioksidacijsko djelovanje pripremljenih ekstrakata. Očekivano, uočeno je kako vrsta otapala i vrijeme berbe utječu na rezultate. Rezultati navedenog istraživanja podudaraju se s drugim dostupnim izvješćima koji ukazuju da je visoki sadržaj polifenola bio značajno povezan s antioksidacijskom aktivnošću. (37)

U istraživanju koje su proveli Generalić Mekinić i sur. (2014), *Lastovka* je pokazala veći udio ukupnih fenola i bolji antioksidacijski kapacitet u usporedbi sa *Levantikom* u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu. No nužno je istaknuti i činjenicu da su autori koristili potpuno drugačiju metodu ekstrakcije, kao i otapala tijekom pripreme ekstrakta što značajno može utjecati na dobivene razlike. (38)

Yancheva i sur. (2016) istraživali su i usporedili sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost lišća masline različitih sorti. Za određivanje ukupnih fenola korišten je Folin-Ciocalteu reagens, a za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metoda. Ustanovljena je poveznica između visokog sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta uzoraka. (39)

Kovačić i sur. (2017) istraživali su fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost lišća istarskih sorti maslina. Sorta koja je pokazala najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjereno FRAP metodom imala je i najveći sadržaj ukupnih fenola. Time je dokazana povezanost između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola. (40)

Goldschmidt Lins i sur. (2018) odredili su antioksidacijsku aktivnost lišća masline FRAP i DPPH metodom kao isadržaj ukupnih fenola. Rezultati FRAP i DPPH analiza potvrđeni su već provedenim studijama, a odstupanja u rezultatima mogu se pripisati korištenju različitih metodologija i postupaka ekstrakcije. Biološki učinci lišća maslina pripisuju se fenolnim spojevima, a oni mogu varirati od sorte do sorte. Proučavali su različite fenolne spojeve ekstrakta lista maslina koji su pripremljeni različitim metodama ekstrakcije. I ova studija sugerira da fenolni spojevi imaju sinergijski učinak na antioksidacijski potencijal, posebice kad djeluju zajedno, a ne kad se gleda učinak svakog spoja zasebno. (41)

Pregledom dostupne literature i radova koji su se bavili fenolnim profilom i antioksidacijskim potencijalom lišća masline možemo uočiti da svi autori povezuju dobro antioksidacijsko djelovanje ekstrakata lišća masline sa bogatim sadržajem fenolnih spojeva u lišću.

#### 4. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih istraživanja i dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

- FRAP metodom ekstrakt lista divlje masline pokazao je najveću, a ekstrakt lista *Lastovke* najmanju redukcijsku sposobnost.
- ORAC metodom najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je ekstrakt lista *Levantinke*, dok je ekstrakt lista divlje masline imao najslabiju sposobnost neutralizacije radikala.
- Najbolju inhibiciju slobodnog DPPH radikala imao je ekstrakt lista *Levantinke*, s više od 50%, dok je ekstrakt lista *Lastovke* pokazao najslabiju antiradikalnu aktivnost
- ORAC i DPPH metoda koje se temelje na istom mehanizmu djelovanja pokazale su slične rezultate, kod kojih je ekstrakt lista *Levantinke* imao najbolju antioksidacijsku aktivnost.
- Ukupna antioksidacijska aktivnost listova masline je povezana s udjelom ukupnih fenola, a osobito se ističu rezultati dobiveni zališće divlje masline.
- Obzirom na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski potencijalsvi testirani uzorci ukazuju na veliki biološki potencijal ekstrakta lista masline te mogućnost njegove primjene u prehrambenoj industriji.

## 5. LITERATURA

1. Vogel P, Machado IK, Garavaglia J, Valdeni ZT, De Souza D, Dal Bosco SM. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutricion Hospitalaria*. 2015; 31:1427-1433.doi: 10.3305/nh.2015.31.3.8400
2. Vossen P. Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils.*Journal of Horticultural Sciences*. 2007; 42(5):1093-1100.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1093>
3. Zec, J. Sortiment maslina u Dalmaciji, Biljna proizvodnja. 1951;1:1-20.
4. URL: <https://croatia.hr/en-GB/lun-poi> (PRISTUPLJENO 28.8.2021.)
5. Miljković I, Gašparec-Skočić Lj, Milat V, Strikić F, Oplanić M, Bjeliš M. i sur. Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo. Zagreb, Hrvatska; 2011.
6. Morettini, A. Olivicoltura, Ramo editoriale degli Agri coltori. 1972.
7. Gugić, M, Šarolić M, Marijanović Z, Ordulj I. Maslina–kemija i tehnologija prerade, interna skripta, veleučilište Marko Marulić, Knin, Hrvatska; 2009.
8. Nikolić T. Praktikum sistematske botanike- raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d. 2013; 1-256.
9. URL:<https://www.rtl.hr/zivotistil/vrt-i-sobno-bilje/3278287/lastovka-maslina-autohtona-uljna-sorta-maslina/> (PRISTUPLJENO 28.8.2021.)
10. Družetić, E. Maslinarski priručnik. Slobodna Dalmacija d.d, Split, Hrvatska; 2014.
11. URL:<https://www.agroportal.hr/agro-baza/sortne-liste/maslina-sortne-liste/8136> (PRISTUPLJENO 28.8.2021.)
12. URL:<https://www.maslinar.com/povratak-ulja-od-divljih-maslina/> (PRISTUPLJENO 28.8.2021.)
13. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M.Olive Tree (*Olea europaeae* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*.2015; 4(4):682–98.doi: 10.3390/antiox4040682
14. URL: (PRISTUPLJENO 28.8.2021.)

15. Bouaziz M, Sayadi S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2005; 107(7–8):497–504.  
doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200501166>
16. Sedef N El, Sibel Karakaya. Olive tree (*Olea europaea* L) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*. 2009; 67(11):632–638.  
doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x
17. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*. 2000; 68: 457-462.  
doi: 10.1016/S0308-8146(99)00221-6
18. Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho AV, Vilas Boas L. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*. 2006; 12:385–396.  
doi: <https://doi.org/10.1177/1082013206070166>
19. Sahin S, Bilgin M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018; 98(4):1271-9.  
doi: 10.1002/jsfa.8619
20. Briante R, La Cara F, Febbraio F, Patumi M, Nucci R. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*. 2002; 93:109-119.  
doi: 10.1016/s0168-1656(01)00387-x
21. URL:<https://sh.wikipedia.org/wiki/Oleuropein#/media/Datoteka:Oleuropein.png>  
(PRISTUPLJENO 28.8.2021.)
22. Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1108: 76–82.doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.106
23. Boss A., Bishop KS, Marlow G, Barnett MP, Ferguson LR. Evidence to support the Anti-Cancer effect of olive leaf extract and future Directions. *Nutrients*. 2016; 8:513.  
doi: 10.3390/nu8080513

24. Sito S, Dovečer S, Borić V, Ploh M, Borić M. Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista. *Glasnik zaštite bilja*. 2015; 38:28-32.
25. Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;84:299–305.  
Doi: 10.1016/s0378-8741(02)00332-x
26. Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. 2007;12:1153–1162. doi: 10.3390/12051153
27. Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44:903–915. doi: 10.1016/j.fct.2006.01.008
28. Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, Bastos ML, Pereira JA. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*. 2007;103:188–195.
29. Molina-Alcaide E, Yáñez-Ruiz DR. Potential use of olive by-products in ruminant feeding. *Animal Feed Science and Technology*. 2008;147:247–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021>
30. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic acid Concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299,15-27. doi: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5
31. Badarinath AV, Mallikarjuna K, Chetty CMS, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(2):1276-1285.
32. Von Gadow A, Joubert E, Hunsmann CF. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Polyphenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45(3):632-638.  
<https://doi.org/10.1021/jf960281n>
33. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant

- capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:4290-4302.<https://doi.org/10.1021/jf0502698>
34. Kiritsakis K, Kontominas MG, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D, Moustakas A, Kiritsakis A. Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *Journal of American Oil Chemists Society*. 2010; 87:369–376.  
doi: 10.1007/s11746-009-1517-x
  35. Mujić I, Živković J, Nikolić G, Vidović S, Trutić N, Kosić U, Jokić S, Ruznic A. Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract as a Source of Useful Antioxidants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2011;6:129-133.
  36. Hayes JE, Allen P, Brunton N, O’Grady MN., Kerry JP. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid, *Food Chemistry*. 2011; 126, 948-955.
  37. Brahmi F, Mechri B, Dabbou S, Dhibi M, Hammami M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*. 2012; 38, 146-152.
  38. Generalić Mekinić I, Gotovac M, Skroza D, Ljubenković I, Burčul F, Katalinić V. Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. Oblica, Lastovka and Levantinka) extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 2014; 6(1): 7-14.
  39. Yancheva S, Mavromatis P, Georgieva L. Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from olive leaves. *Journal of Central European Agriculture*. 2016; 17(1):154-163.  
doi: /10.5513/JCEA01/17.1.1684
  40. Kovačić I, Bilić J, Dudaš S, Poljuha D. Phenolic content and antioxidant capacity of istrian olive leaf infusions. *Poljoprivreda*. 2017; 23(2):38-45.  
doi: <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.23.2.6>
  41. Goldschmidt Lins P., Piccoli Pugine S. M., Scatolini A. M., Pires de Melo M. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon*. 2018;4(9):e00805.doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00805