استخلاص المركبات الفينولية من أوراق بعض أصناف الزيتون السوري ودراسة تأثيرها في بعض أنواع الجراثيم

أحمد مالو[1] و غيثاء منصور[2]

تاريخ الإيداع 2013/07/14
قبل للنشر في 2013/12/03

الملخص

دُرست الفينولات في أوراق من أصناف الزيتون السوري جمعت من (حرستا وغوطة دمشق، وريف دمشق، والقلمون). استُخلصت المركبات الفينولية من أصناف أوراق الزيتون بعد التخلص من الأصبغة النباتية والمركبات الدَسمة، وفصلت الفينولات الكلية بالمذيب (ميتانول – ماء).

أظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC أن مستخلص الفينولات يتكون من حمض الغاليك Gallic acid وحمض الكافئيك Caffeic acid وحمض الفانيليكVanillic acid وحمض باراهيدروكسي بنزوئيك p-hydroxy benzoic acid وحمض السيرنجيك Syringic acid .

بيّنت الدراسة أن مستخلص مركبات الفينولات من أوراق بعض أصناف الزيتون كان الأكثر تأثيراً في *Staphylococcus aureus* ATCC6538، والأقل تأثيراً في *Typhimurium* *Salmonella* ATCC13311 من أنواع الأحياء الدقيقة المدروسة .

الكلمات المفتاحية: ورق الزيتون، المركبات الفينولية، الأحياء الدقيقة.

[1] أستاذ، قسم الكيمياء، [2] مدرسة، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

Extraction of phenolic compounds from leaves of some Syrian olive varieties and study of their influence on microorganisms

A. Malo[(1)] and Gh. Mansour[(2)]

Received 14/07/2013
Accepted 03/12/2013

ABSTRACT

Phenols were studied in the leaves of Syrian olive varieties collected from (Harasta and Ghouta, Damascus Countryside and Qalamun). Phenolic compounds were extracted from the olive leaf varieties after disposal of plant pigments and fatty compounds, and total phenols separated with solvent (methanol - water).

The results of the analysis of thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography HPLC to extract phenols consists of Gallic acid, Caffeic acid, Vanillic acid, p-hydroxy benzoic acid and Syringic acid.

The study showed that phenolic compounds extract from leaves of some olives varieties was more influential on *Staphylococcus aureus* ATCC6538, and less impact *on Salmonella typhimurium*ATCC13311 types of microorganisms studied.

Keywords: Olive leaves, Phenolic compounds, Microorganism.

[(1)]Prof., Department of Chemistry, [(2)] Assistant Prof., Department of Plant Biology, Faculty of sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة

شجرة الزيتون *Olea europea* من أقدم الأشجار التي تعامل معها الإنسان منذ أقدم العصور وموطنها حوض البحر الأبيض المتوسط (Guinda *et al.*, 2004). وهذه الشجرة الدائمة الخضرة من الفصيلة الزيتونية Oleaceae. وتشير المعطيات أنها تغطي نحو ثمانية ملايين هكتار من بلدان العالم (Tabera *et al.*, 2004). وقد كان تعامل الإنسان مع هذه الشجرة منذ بدء العصور معتمداً على زيت ثمارها لما له من أهمية اقتصادية وغذائية كبيرة جداً. وبدأ الانتباه في العقود الأخيرة لأوراق شجرة الزيتون لأهميته الطبية العالية. وقد بدأ العالم عبر القارات بزراعتها فانتشرت من الولايات المتحدة إلى استراليا وغيرها. تشغل سورية المرتبة الخامسة عالمياً في زراعة هذه الشجرة واستثمارها (وزارة الزراعة، 2010).

كان الاستخدام الرئيس للزيتون مدة طويلة من القرون مقتصراً على الإفادة من زيت ثمرتها في الغذاء (Gordon *et al.*, 2001)، إلا أنه في المدة الأخيرة تنبه العلماء في العالم على أن أوراق هذه الشجرة تحوي مركبات كيميائية شديدة الأهمية لها أهمية طبية واقتصادية يمكن الإفادة منها طبياً، كمتعددات الفينول والتربنات، وقد أشارت البحوث الطبية التي تعود إلى عام 1843م إلى أن أوراق الزيتون كانت تستخدم في العلاج الطبي الشعبي.

وتشير الدراسات الحديثة أن لمستخلصات أوراق الزيتون فعاليات حيوية طبية متعددة، في معالجة مرض الملاريا (Benavente *et al.*, 2000; Somova *et al.*, 2003) وفي ارتفاع ضغط الدم، وارتفاع الكولسترول والداء السكري فضلاً عن استخدام هذه المركبات في الطب الوقائي كإضافات غذائية مانعه للأكسدة ومضادات بكتيرية (Samuelsson,1951; Gonzalez. 1992)، وهشاشة العظام، ولمعالجة كل من نزلات البرد وبعض الالتهابات البكتيرية والفطرية (Omar, 2010)، كما يمكن استخدامها في حفظ الأغذية وتغليفها كعوامل مضادة للبكتيريا (Appendini and Hotchkiss, 2002) ومضادات للفطريات (Markin *et al.*, 2003) ومضادات للفيروسات (Lee-Huang *et al.*, 2003) وخصوصاً التي تسبب التهاب الكبد. وأوراق الزيتون غنية بمتعددات الفينول كالـ tyrosol, oleuropein (Korukluoglu *et al.*,2010) وهي المسؤولة عن الخصائص الغنية بالمضادات الميكروبية (Aytul, 2010; Kosar *et al.*, 2007).

هدف البحث

هدف البحث إلى استخلاص بعض المركبات الفينولية ودراستها في أوراق أربعة أصناف من أوراق نبات الزيتون، ثم دراسة الفعالية التي تملكها هذه الفينولات في نمو بعض أنواع الأحياء الدقيقة سلبية أو إيجابية الغرام.

مواد البحث وطرائقه

استُخدمت في البحث أوراق شجرة زيتون من الأصناف الآتية: وهي الدان إذْ تم الحصول عليها من موقعين مختلفين من منطقة حرستا وغوطة دمشق، والتفاحي من منطقة القلمون والكالاميتا من ريف دمشق التي جمعت في فصل الشتاء 2010-2011.

السلالات البكتيرية

تم الحصول على السلالات الجرثومية من العينات المحفوظة والمتوافرة في مختبرات كلية العلوم وهي:

سلالات بكتيرية سالبة الغرام وهي:

Escherichia coli ATCC157
Pseudomonas aeruginosa ATCC9027
Salmonella typhimurium ATCC13311

وقد تم الحصول عليها من كلية العلوم.

كما استخدمت سلالات بكتيرية إيجابية الغرام وهي:

Staphylococcus aureus ATCC6538
Staphylococcus epidydems
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus

الأوساط الزرعية المستخدمة في البحث:

استُعملت أوساط زرعية مختلفة كوسط الإيوزين ميتلين بلو آغار EMB Agar، وسط الآغَار المغذي Nutrient Agar، وسط مولرهينتونMueller Hinton Agar بهدف استنبات الأحياء الدقيقة ودراسة فعاليتها الحيوية.

كما استُخدمت في العمل الحموض الفينولية الآتية:

حمض الغاليك، وحمض السينارجيك، وحمض الفانيليك، وحمض بارا هيدروكسي بنزوئيك، وحمض الكافئيك واستخدمت جميعها بشكل نقي من إنتاج شركة ميرك merck.

الكواشف والمواد المستخدمة:

كاشف فولن، ومذيبات عضوية: الميتانول، والايتانول، والأسيتون، وإيتر البترول، وإيتيل أسيتات.

طرائق العمل:

استخلاص الفينولات الكلية:

غُسلتْ أوراق الزيتون المدروسة غسلاً جيداً بالماء للتخلص من الأتربة والعوالق، ثم جففت بتيار من الهواء الجاف، وسحقت على شكل بودرة ناعمة بمطحنة كهربائية.

أُخِذَ 10 غ من مسحوق أوراق الزيتون ونُقِعَ بالإيتر البترولي نحو عشرين ساعة لاستخلاص المركبات اللاقطبية مع الحفاظ على الفينولات دون انحلال، ثم رُشِحَ المسحوق على أوراق الترشيح، وتُرِكَ حتى الجفاف التام.

ولاستخلاص الفينولات من أوراق الزيتون استخدمت الطريقة التي اقترحها Nasir في بحثه (Nasir *et al.*, 2008) مع بعض التعديلات إذْ عُولج 3غ من مسحوق أوراق الزيتون الجاف بالميتانول 70% مدة 24 ساعة مع التحريك المتواصل، ثم نُقِّل بالسرعة القصوى مدة 20 دقيقة وبعدها أُزيل السائل الطافي، أُعيدت العملية السابقة بالميتانول وبعد التثفيل يجمع الطافيان ويتمم الحجم إلى25 مل، ويقطر الميتانول تحت ضغط مخفف باستخدام جهاز المبخر الدوار ثم يجفف ويوزن الناتج.

حلمهة الفينولات:

عُولج مسحوق ورق الزيتون المعالج بالإيتر الايتيلي مع حمض كلور الماء بتركيز1.2 جزيئي؛ وذلك بهدف تفكيك الروابط الاستيرية بين جزيئات الحموض العفصية في حال وجودها، وحضن في حمام مائي مسخن للدرجة 80 °C مدة ساعة، ورشح المستخلص بعد التبريد وبعدها بخر الميتانول من الرشاحة، ثم استخلصت الفينولات في قمع الفصل بخلات الايتيل من الطور المائي. (أعيدت عملية الاستخلاص ثلاث مرات). وتقطر خلات الايتيل تحت ضغط مخفف باستخدام جهاز المبخر الدوار بالدرجة 40 °C، وعولج راسب الفينولات للدراسات اللاحقة (Justesen *et al.*, 1998).

المعايرة الكمية للفينولات في العينات المدروسة:

حُدّدتْ نوعية مكونات المستخلص الفينولي بواسطة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC، كما تم التأكد بشكل نهائي من المكونات باستخدام جهاز كروموتوغرافيا عالية الأداء HPLC، في المخبر المركزي في كلية العلوم.

استُخدم كاشف فولن (Folin-ciocalteau) لتحديد محتوى الفينولات الكلية في المستخلص المدروس، وبمساعدة جهاز الامتصاص الضوئي، حُضّر منحنى المعايرة لحمض الغاليك. ومُدّد المحلول أعلاه باستخدام الميتانول 70 % للحصول على التراكيز المتدرجة الآتية: (5، 10، 20، 25)% (Gamez – Meza *et al.*, 1999)، وعُويرت الفينولات الكلية باستخدام كاشف فولن وفق الخطوات الآتية:

1- إضافة 5ml من محلول كربونات الصوديوم بتركيز (20%)

2- إضافة 2.5ml من كاشف فولن إلى 50ml من العينة المخففة أعلاه. تقاس الامتصاصية بعد مرور 60 دقيقة لإتمام التفاعل عند درجة 20 °C وبطول موجة 725nm مع استخدام الماء المقطر كعينة شاهدة (Asses *et al.*, 2009) .

تقاس شدة الامتصاص للعينات الفينولية المدروسة ويحسب تركيز الفينولات فيها من المعادلة:

$$y = \frac{C * V}{W} * 10^{-1}$$

إذْ:

C: تركيز المستخلصات من الإسقاط على المنحنى المعياري.

V: حجم المستخلص مقدراً بـ (مل).

W: وزن العينة المأخوذة بـ (غ).

دراسة فعالية القدرة التثبيطية لمستخلص ورق الزيتون:

لُقّحتْ أطباق بتري حاوية على الوسط Mueller Hinton Agar بالأحياء الدقيقة للاختبار بماسحة قطنية معقمة من (كثافة 0.5 ماك فارلاند)، ثم وضع مستخلص ورق الزيتون في حفر على الوسط بقطر 6 mm، ووضعت بعدها الأطباق بالبراد مدة ساعتين من أجل انتشار مستخلص ورق الزيتون في الوسط (بوشي، 2005) وبعدئذ حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 °C مدة (18 –24) ساعة (ثلاثة مكررات لكل نوع مدروس من الأحياء الدقيقة)، وبعدها قيست أقطار منطقة التثبيط Inhibition Zone (IZ) الخالية من نمو الجراثيم حول كل حفرة باستعمال مسطرة مليمترية (مم) (Brumfitt *et al*., 1990; Kuete *et al*., 2008).

النتائج والمناقشة

معايرة الفينولات الكلية في أوراق الزيتون:

استخدم للمعايرة 3 غرام من مسحوق أوراق الزيتون التي استُخلصت بواسطة الميتانول وأُجريت حلمهتها بواسطة حمض كلور الماء، وأُجريت المعايرة باستخدام كاشف فولن. كانت كمية الفينولات الكلية في أصناف الزيتون المدروسة اعتماداً على حمض الغاليك العياري كما في الجدول (1) إذْ كانت أعلى كمية للفينولات في الصنف تفاحي وأقلها في صنف الدان من حرستا، في حين كانت كمية الفينولات في دراسة (Aytul, 2010) 197.42±2.97 ملغ/غ.

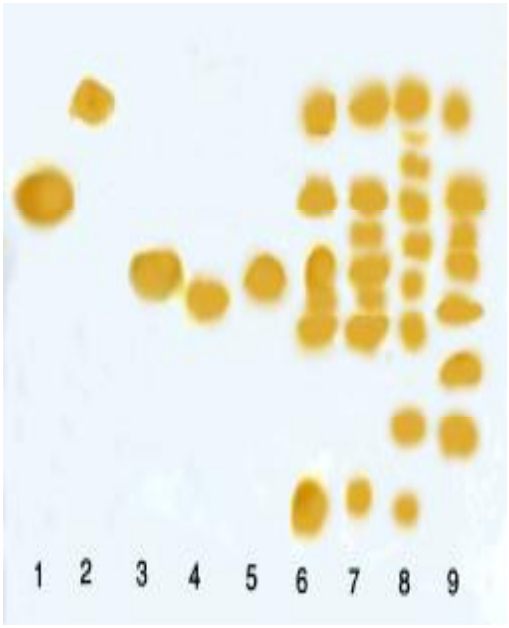
الجدول (1) كمية الفينولات الكلية في أصناف ورق الزيتون المأخوذة (ملغ/ غ).

دان حرستا	دان	تفاحي	كالاميتا
190.12±1.17ملغ/غ	191.17±1.11 ملغ/غ	193.15±1.16 ملغ/غ	191.13±1.18 ملغ/غ

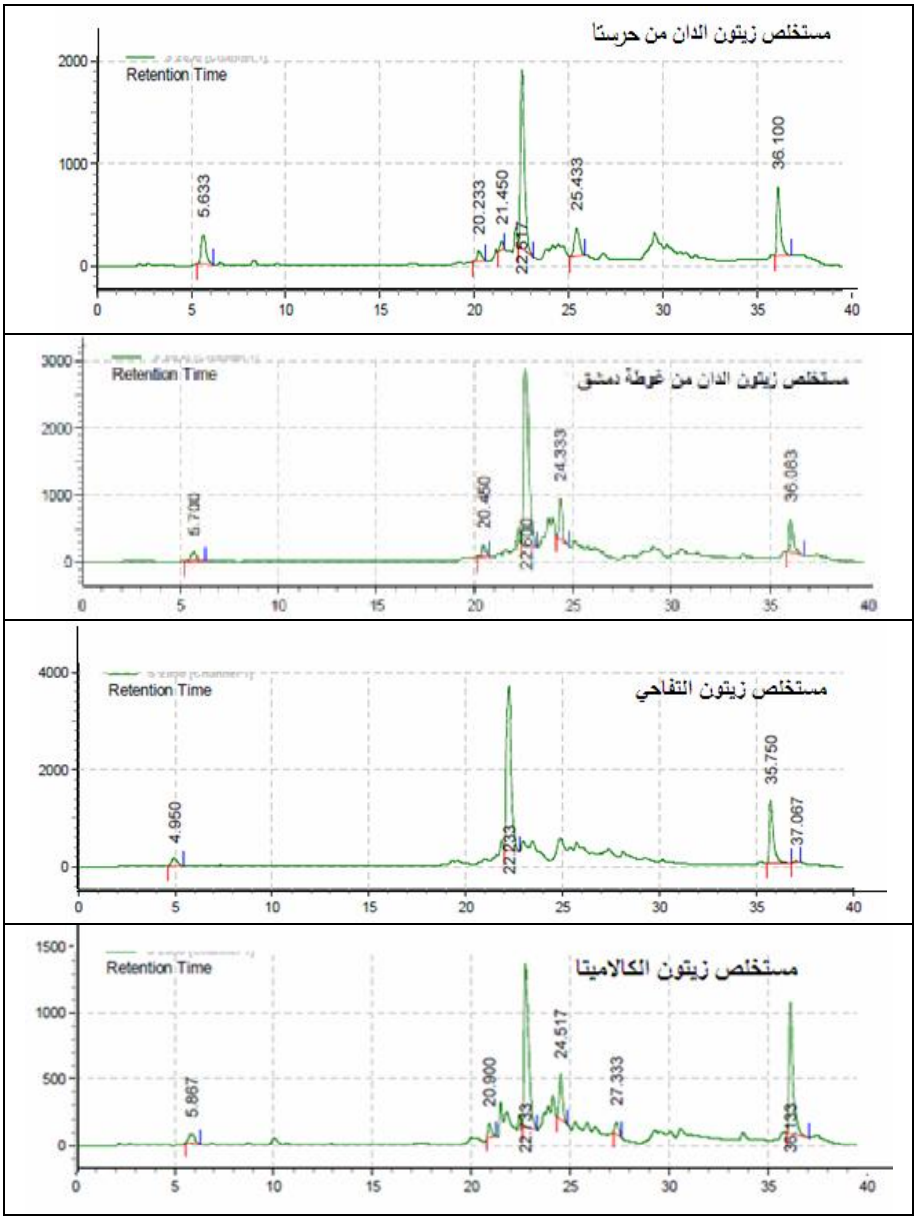
كشف الفينولات من أوراق الزيتون:

استخدمت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لكشف الفينولات المستخلصة باستخدام مزيج (كلوروفورم، حمض الخل) بنسبة (2:5)، إذْ ظهرت بقع المركبات الفينولية في المستخلصات على الطبقة الرقيقة مقارنة بالمحاليل العيارية للفينولات بشكل واضح عند استخدام أبخرة اليود وقد تلونت بلون بني (الشكل1). وكانت المحاليل العيارية الفينولات (1، 2، 3، 4، 5) على التتالي: حمض السنرجيك، وحمض الفانيليك، وحمض الغاليك، وحمض الكافئيك، وحمض بارا هيدروكسي البنزويك. وظهرت بقع في العينات (6، 7، 8، 9) يمكن أن تقابل حمض الكافئيك Rf = 0.58، وحمض بارا هيدروكسي البنزويك Rf = 0.64 وحمض الغاليك Rf = 0.63. فضلاً عن حمض السينرجيك Rf =0.72، وحمض الفانيليك Rf = 0.82.

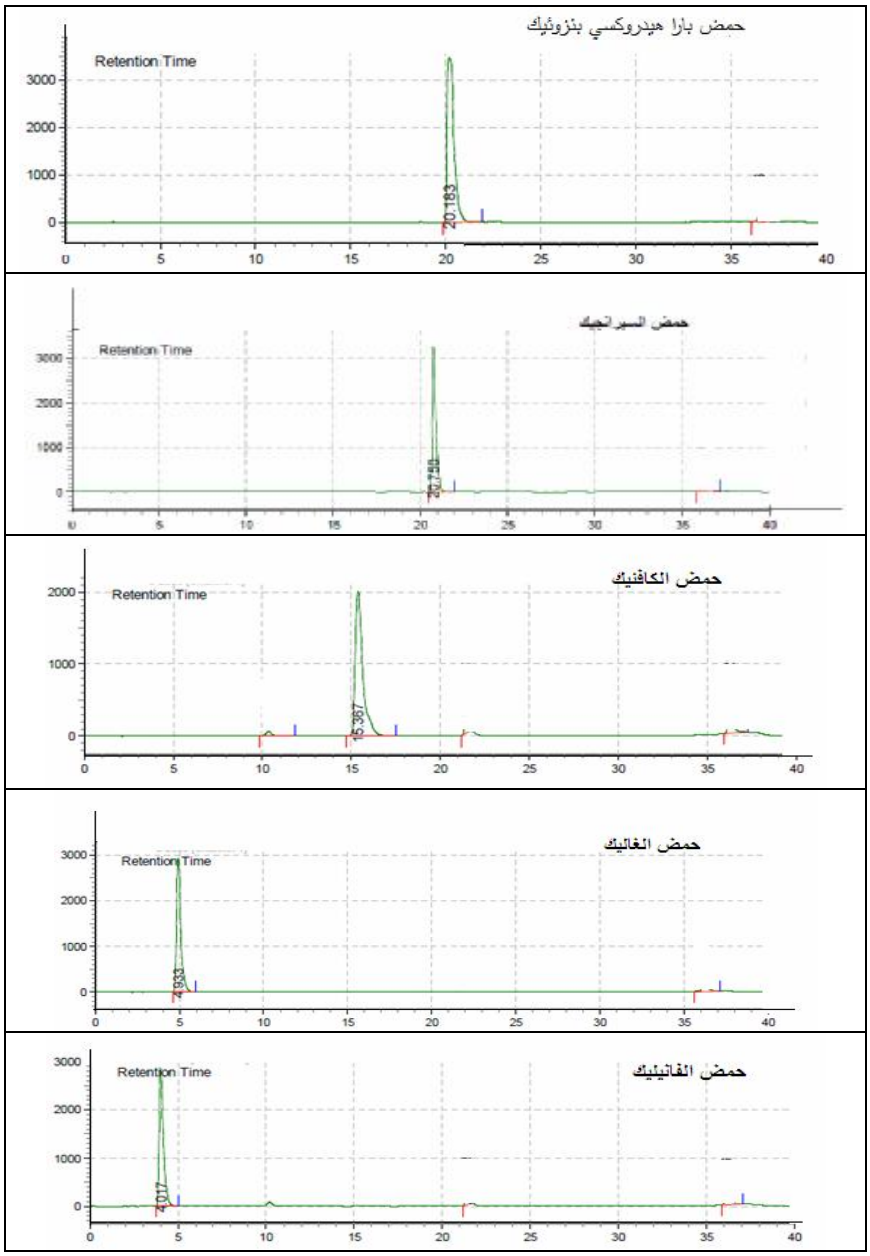
ويبيّن الكروماتوغرام HPLC أن الفينولات في مستخلصات أوراق أصناف الزيتون الأربعة المدروسة متشابهة (الشكل 2) مقارنة بالمحاليل العيارية للفينولات وبحسب زمن الحجز R.time ويوجد فيها حمض بارا هيدروكسي البنزويك، وحمض السنرجيك، وحمض الكافئيك، وحمض الغاليك وحمض الفانيليك (الشكل 3).



الشكل (1) يظهر نتائج ترحيل العينات (6, 7, 8, 9) مع الشواهد القياسية (1, 2, 3, 4, 5) من المركبات الفينولية على صفيحة الـ TLC.



الشكل(2) كروماتوغرام HPLC لمستخلصات أصناف الزيتون المدروسة والفينولات المدروسة



الشكل (3) كروماتوغرام HPLC لبعض الشواهد الفينولية

الجدول (2) كمية الفينولات المدروسة في أصناف ورق الزيتون المأخوذة (ملغ/ مل)

أصناف الزيتون	حمض بارا هيدروكسي بنزوئيك	حمض السيرانجيك	حمض الكافئيك	حمض الغاليك	حمض الفانيليك
الدان من حرستا	7.4±0.053	6.5±0.016	15.4±0.04	10.4±0.03	7.4±0.08
الدان غوطة دمشق	9.2±0.034	8.37±0.79	14.3±0.01	12.5±0.04	14.2±0.10
التفاحي	11.1±0.036	16.4±0.031	8.30±4.88	8.50±0.16	6.4±0.05
الكالاميتا	11.4±0.013	7.4±0.02	16.2±0.017	7.30±0.29	12.5±0.20

الرقم يمثل المتوسط الحسابي ± يمثل الانحراف المعياري

يوضح الجدول (2) نتائج قيم متوسط أنواع الفينولات المدروسة في أصناف ورق الزيتون المأخوذة، ويلاحظ أن المتوسط الحسابي لحمض بارا هيدروكسي بنزوئيك في الأصناف المدروسة يراوح بين 7.4±0.053 ملغ/ مل للدان في حرستا و11.4±0.013 ملغ/ مل للكالاميتا. وكان حمض السيرانجيك يراوح بين 6.5±0.016 ملغ/ مل لصنف الدان من حرستا و16.4±0.031 ملغ/ مل للتفاحي. والمتوسط الحسابي لحمض الكافئيك كانت أعلى قيمه له في صنف الكالاميتا 16.2±0.017 ملغ/ مل. أمَّا حمض الغاليك فقد راوحت نسبته بين7.30±0.29 ملغ/ مل في صنف الكالاميتا و12.5±0.04 ملغ/ مل في صنف الدان من غوطة دمشق. أمَّا كمية حمض الفانيليك فكانت أقلها في صنف التفاحي6.4±0.05 ملغ/ مل وأكثرها في صنف الكالاميتا12.5±0.20 ملغ/ مل وهذا يتوافق مع معطيات المركبات الفينولية التي وجدها كل من (Altıok *et al.*, 2008 ;Erdohan and Turhan, 2011) للمركبات الفينولية في مستخلص ورق الزيتون، والاختلاف في عدد المركبات الناتجة عن الاستخلاص قد يكون مردها، الاختلاف في طرائق الاستخلاص والبيئة المأخوذة منها أصناف الزيتون، إذْ كانت عينات الدراسة لأصناف الزيتون مأخوذة من البيئة السورية ومن الطبيعي أن تختلف شروط التغذية والمناخ والظروف البيئية التي أحاطت بالعينات في أثناء نموها عن ما هي عليه في أصناف الزيتون في البحوث الأخرى.

دراسة فعالية مستخلص ورق الزيتون:

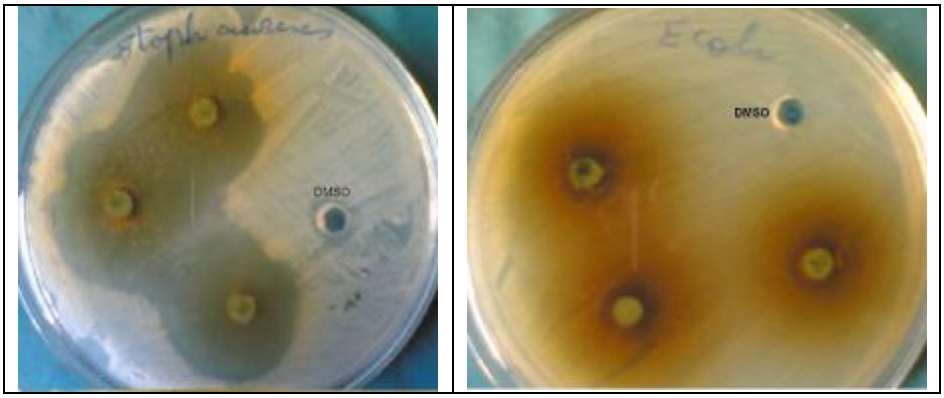
تشابه تأثير مستخلصات أصناف ورق الزيتون في الأحياء الدقيقة المدروسة سالبة وإيجابية الغرام (شكل 4)، إذْ نلاحظ في الجدول (3) أن تأثير مستخلص صنف زيتون الدان من منطقة حرستا في *Staphylococcus aureus ATCC653* بقياس قطر هالة التثبيط 34±0.90 مم ومن الغوطة 34±0.31 مم ومن مستخلص التفاحي 36±0.61 مم

ومن مستخلص الكالاميتا 32±0.13 مـم. وأمَّـا تـأثير المـستخلص فـي *epidydems Staphylococcus* فكان على التتـالي 12±35 مـم، 0.22±36 مـم، 0.12±40 مـم، 1.82±38 مم وأما قطـر هالـة التثبـيط عنـد*Escherichia coli ATCC 157* فكـان 0.12±12مـم، 0.21±13مـم، 0.02±14مـم، 0.10±12مـم. وهـذا يتوافـق مـع (Pereira *et al.*, 2007) إذْ وجد في دراسته أن مستخلص الفينولات من ورق الزيتـون يؤثر فـي*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* والـ *Bacillus subtilis*. وأكد (Bisignano *et al.*, 1999) في دراستهم للفعالية الحيوية للمركبات الفينولية المستخلصة من أوراق الزيتون في بعض الأحياء الدقيقة فلاحظوا تأثير المستخلص في الـ *Staphylococcus aureus* وفي الـ *Salmonella sp* وقـد أكـد (Aliabadi *et al.*, 2012) في دراستهم أن مستخلص أوراق الزيتون يملك تأثيراً أكبر في الجراثيم إيجابية الغرام وخصوصاً الـ *Staphylococcus sp*، وقد يعـود التـشابه فـي المركبات الفينولية لأصناف الزيتون المدروسة أنّها مأخوذة من البيئـة المحليـة حيـث الظروف البيئية والمناخية متشابهة.

الجدول (3) يوضح فعالية مستخلص ورق أصناف الزيتون المدروسة بقياس قطر منطقة التثبيط /مم.

أصناف الزيتون / البكتيريا	دان حرستا	دان	تفاحي	كالاميتا
Escherichia coli ATCC 157	0.12±12مم	0.21±13مم	0.02±14مم	0.10±12مم
Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	0.14±3مم	0.03±2.8مم	0.12±1.8	0.12±2 مم
Salmonella typhimurium ATCC13311	*R*	*R*	*R*	*R*
Staphylococcus aureus ATCC6538	0.90±34 مم	0.31±34مم	0.61±36مم	0.13±32مم
Staphylococcus epidydems	0.12±35 مم	0.22±36مم	0.12±40مم	1.82±38مم
Bacillus subtilis	0.62±17 مم	0.84±18مم	1.24±19مم	1.14±19مم
Micrococcus luteus	0.14±16مم	0.21±16مم	0.61±17مم	0.11±18مم

الرقم يمثل المتوسط الحسابي ± يمثل الانحراف المعياري *R* مقاومة(لم تتأثر بالمستخلص)



الشكل(4) يوضح تأثير مستخلص الفينولات من أصناف ورق الزيتون في *Escherichia coli* وفي *Staphylococcus aureus* ATCC6538 مقارنة بمادة الـــ DMSO المحلول بها.

الاستنتاجات

- تتشابه المركبات الفينولية لأصناف ورق الزيتون المدروسة، وقد يعود تشابهها إلى تشابه الظروف البيئية المحلية المأخوذة منها.
- لوحظ أن تأثير مستخلص أوراق الزيتون كان الأكبر تأثيراً في الـ *Staphylococcus aureus* ATCC6538، والأقل تأثيراً في الجراثيم سلبية غرام.

التوصيات

يمتلك ورق الزيتون خصائص طبية مهمة لغناه بمركبات كيميائية لها تأثير في عدد من الأمراض؛ لذا ننصح باستخدام ورق الزيتون في العلاج لخصائصه الطبية المهمة عن طريق كبسولات وبإشراف وزارة الصحة.

المراجع References

وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2010. الموقع الرسمي لوزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، المجموعة الإحصائية، الأشجار المثمرة والحراجية.

http://www.syrian-agriculture.org/site_ar/agristat/2010./4.pdf

بوشي، كنده. 2005. عزل أورمات جرثومية من رتبة Actinomycetalees منتجة للمضادات الحيوية من بيئات مختلفة في شمال سورية – أطروحة ماجستير – جامعة حلب.

Aliabadi, M. Darsanaki, R, Rokhi, M. Nourbakhsh, M. Raeisi, G. 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract Scholars Research Library Annals of Biological Research, 3 (8):4189-4191

Altıok E, Baycin D, Bayraktar O, Ulku S. 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology. 62(2): 342-348.

Appendini P, Hotchkiss JH. 2002. Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science and Emerging Technologies; 3(2): 113-126.

Asses, N., L. Ayed, H. Bouallagui, S. Sayadi, and M. Hamdi, 2009. Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewatersb by Geotrichum candidum Int. Biodeter. Biodegr. 63: 407-413

Aytul, K. 2010. Antimicrobial and Antioxidant Activities OF Olive Leaf Extract And Its Master Of Science ,Izmir p 51- 52

Benavente-Garcõa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio JA. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food Chemistry; 68: 457-462.

Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R., Lo Crisafi, G., Uccella, N. and Saija, A. 1999. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51: 971–974

Brumfitt W., Hamilton-Miller J. M., and I. Franklin. 1990. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. Microbios 62 (250), 19 – 22

Erdohan, Z, and Turhan, K. 2011. Olive leaf extract and usage for development of antimicrobial food. Journal of Food Science 33343, 1094-1101

Gamez-Meza, N.; Noriega-Rodrguez, J. A.; Medina-Juarez, L. A.; Ortega-Garca, J.; Cazares- Casanova, R. & Angulo-Guerrero, O. 1999. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. Journal of American Oil Chemists Society, 76(12), 1445–1447. ISSN: 0003-021X.

Gonzalez, M.; Zarzuelo, A.; Gamez, M. J.; Utrilla, M. P.; Jimenez, J.; Osuna, I. 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. Planta Med 58, 513-515.

Gordon, M. H.; Paiva-Martins, F.; Almeida, M. 2001. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem*. *49*, 2480–2485.

Guinda, A.; Albi, T.; Camino, M. C. P.; Lanzón, A. 2004. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (Olea europaea). Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106, 22–26.

Justesen, U Knuthsen, P. Leth, T. 1998. Quantitative analaysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverage by HPLC with photo-diode array and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A; 799(1998), PP. 101-110

Kosar, M. Bozan, B. Temelli, F and Baser, K. 2007. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (Rhus coriaria L.) extracts. Food Chem., V:103:Issue3,p: 952-959

Korukluoglu M, Sahan Y, Yigit A, Ozer ET, Gucer S. 2010. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts. Journal of Food Processing and Preservation; 34: 383-396.

Kuete V, Ngameni B, Simo CCF, Tankeu RK, Ngadjui BT, Meyer JJM, Lall N, Kuiate JR, 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from Ficus chlamydocarpa and Ficus cordata (Moraceae). *J Ethnopharmacol* 120:17-24.

Lee-Huang S., Zhang L., Huang P. L., Chang Y. T. and Huang P. L. 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. Biochemical and Biophysical Research Communications 307:1029–1037.

Markin D, Duek L, Berdicevsky I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses.; 46: 132–136.

Nasir, S., Malik, A. and Bradford, M. 2008. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extractionand processing of olive (Olea europaea L.) leaves Journal of Food, Agriculture & Environment Vol. 62) 8-13.

Omar, S. H. 2010. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, Sci Pharm, 78, 133-154.

Pereira, A, Ferreira, I, Marcelino, F, Valentão, P; Andrade, P, Seabra, R Estevinho, L, Bento, A and José Alberto Pereira. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive *(Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves; MoleculesMay 6;12(5):1153-62.

Samuelsson, G. 1951. The blood pressure lowering factor in leaves of Olea europaea. Farmacevtisk Revy, 15, 229–239.

Somova, LI, Shode, FO, Ramnanan, P. and Nadar, A. 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activities of triterpenoids isolated from Olea cupaea subspecies of africana leaves. J. Ethnopharm. 84: 299-305.

Tabera, J.; Guinda, A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Senorans, J. F.; Ibanez, E.; Albi, T., Reglero, G. 2004. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction And Fractionation Of High-Added-Value Compounds From A Hexane Extract Of Olive Leaves. J. Agric. Food Chem, 52, 4774–4779.