# UKUPNA ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST U LISTOVIMA ČETIRI AUTOHTONA KULTIVARA MASLINA

**Marić, Sanela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:983463

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski znanstveni studij biologije

Sanela Marić

# UKUPNA ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST U LISTOVIMA ČETIRI AUTOHTONA KULTIVARA MASLINA

Diplomski rad

Osijek, 2013.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku** **Diplomski rad**

**Odjel za biologiju**

**Diplomski znanstveni studij biologije**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Biologija**

# UKUPNA ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST U LISTOVIMA ČETIRI AUTOHTONA KULTIVARA MASLINA

**Sanela Marić**

**Rad je izrađen**: Odjel za biologiju, Osijek

**Mentor: Dr.sc.** Ivna Štolfa, **docent**

**Sažetak:**

Listovi masline (*Olea europea* L.) imaju veliki potencijal kao prirodni antioksidansi. Brojna istraživanja dokazala su antioksidativno, antimikrobno i antivirusno djelovanje ekstrakta lista masline. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u koncentraciji askorbinske kiseline i ukupnih fenola te ukupne antioksidativne aktivnosti u listovima četiri autohtona kultivara maslina (Oblica, Dužica, Lastovka i Rošinjola) te utvrditi postojanje korelacija između tih parametara. Koncentracija askorbinske kiseline, fenolnih spojeva te ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakta listova četiri kultivara maslina određeni su spektofotometrijski. Ukupna antioksidativna aktivnost u listovima maslina bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom fenolnih spojeva i koncentracijom askorbinske kiseline. Dobiveni rezultati pokazuju da je ekstrakt lista kultivara Oblica pokazuje najveći potencijal kao prirodni dodatak prehrani budući da je imao najveću antioksidativnu aktivnost i najveću koncentraciju ukupnih fenola koji iznimno povoljno djeluju na zdravlje ljudi i životinja.

**Broj stranica:** 42

**Broj slika:** 16

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 112

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** listovi masline, askorbinska kiselina, fenoli, antioksidativna aktivnost

**Datum obrane:** 19.04.2013.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

**1. Dr.sc.** Elizabeta Has Schön, **izv.prof.**

**2. Dr.sc.** Ivna Štolfa, **doc.**

**3. Dr.sc.** Janja Horvatić, **izv.prof.**

**Rad je pohranjen u:**

Knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University Josip Juraj Stossmayer in Osijek** **MS thesis**
**Department of Biology**
**Graduate Study of Biology**
**Scinetific Area: Natural science**
**Scientific Field: Biology**

# TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY IN LEAVES OF FOUR AUTOCHTHONOUS OLIVE CULTIVARS

**Sanela Marić**

**Thesis performed at:** Department of Biology, Osijek
**Supervisor: Dr.sc.** Ivna Štolfa, **assistant prof.**

**Short abstract**:

The olive leaves (*Olea europaea* L.) have great potential as natural antioxidants. Numerous studies have demonstrated the antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of olive leaf extract. The aim of this study was to investigate differences in the content of ascorbic acid, total phenols and total antioxidant activities of four autochthonous cultivars of olive leaves (Oblica, Duzica, Lastovka and Rosinjola) and to establish correlations between these parameters. The content of ascorbic acid, total phenols and total antioxidant activity in leaf extract of four olive cultivars were determined spectrophotometrically. The total antioxidant activity of olive leaves significantly positively correlated with the content of total phenols. The results obtained show that the extract of cultivar Oblica had the best quality of the four tested olive cultivars due to the highest antioxidant activity and the highest content of total phenols. The results obtained pointed out that the leaf extract of cultivar Oblica show the greatest potential as a natural dietary supplement since it had the highest antioxidant activity and the highest content of total phenols that are extremely beneficial for the human and animal health.

**Number of pages:** 42
**Number of figures:** 16
**Number of tables:** 4
**Number of references:** 112
**Original in:** Croatian

**Key words:** olives, ascorbic acid, phenols, antioxidant activity
**Date of the thesis defence:** 19 April 2013

**Reviewers:**
**1. Dr.sc.** Elizabeta Has Schön, **associate prof.**
**2. Dr.sc.** Ivna Štolfa, **assistant prof.**
**3. Dr.sc.** Janja Horvatić, **associate prof.**

**Thesis deposited in:**
Library of Department of Biology, Univesity of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Ivni Štolfa što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada, također zahvaljujem i na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći tijekom pisanja.

Dragoj obitelji i prijateljima hvala na razumijevanju i velikoj podršci tijekom studiranja.

**1. UVOD ..... 1**
1.1. MASLINA (OLEA EUROPEA L.) ..... 1
1.1.1. Osnovne karakteristike masline ..... 1
1.1.2. Kultivari maslina ..... 3
1.1.3. Hranidbena i zdravstvena vrijednost ..... 8
1.2. ASKORBINSKA KISELINA ..... 9
1.2.1. Struktura i kemijska svojstva askorbinske kiseline ..... 9
1.2.2. Funkcija askorbinske kiseline ..... 11
1.3. FENOLNI SPOJEVI ..... 12
1.3.1. Struktura i kemijska svojstva fenolnih spojeva ..... 12
1.3.2. Funkcija fenolnih spojeva ..... 15
1.3.3. Fenolni spojevi maslina ..... 16
1.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ..... 18
1.4.1. Uloga i značaj antioksidanasa ..... 19
1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 20
**2. MATERIJALI I METODE ..... 21**
2.1. MATERIJALI ..... 21
2.2. METODE RADA ..... 21
2.2.1. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline ..... 21
2.2.2. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva ..... 22
2.2.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti ..... 22
2.2.4. Statistička obrada podataka ..... 23
**3. REZULTATI ..... 24**
3.1. UKUPNA KONCENTRACIJA ASKORBINSKE KISELINE ..... 24
3.2. UKUPNA KONCENTRACIJA FENOLNIH SPOJEVA ..... 25
3.3. UKUPNA ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ..... 26
**4. RASPRAVA ..... 27**
**5. ZAKLJUČCI ..... 30**
**6. LITERATURA ..... 31**

# 1. UVOD

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

### 1.1.1. Osnovne karakteristike masline

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena biljka (Slika 1) iz porodice *Oleaceae* (Tablica 1). Dugovječna je, pa njena stabla mogu doživjeti i više stotina godina. Pojedina živuća stabla stara su preko tisuću godina (Benčić i sur., 2011). Raste na oskudnom tlu, gotovo bez vode, ali uz obilje sunca. Zbog visokog postotka ulja (15-35%) u plodovima, maslina je dobila ime po latinskoj riječi *olea*, što znači ulje. Smatra se jednom od najstarijih namirnica, poznata je već između 5 i 7 000 godina, porijeklom je s Krete.

**Tablica 1.** Sistematika masline (*Olea europea* L.)

| **TAKSONOMIJA** | |
|---|---|
| CARSTVO | *Plantae* |
| PODCARSTVO | *Magnoliophyta* |
| RAZRED | *Magnoliopsida* |
| RED | *Oleales* |
| PORODICA | *Oleaceae* |
| ROD | *Olea* |
| VRSTA | *Olea europea* L. |

Korijenje maslina savijeno je i s mnogo površinskih razgranjenja, koja obavljaju veći dio aktivnosti upijanja vode i mineralnih tvari. Kora stabla je sivo-zelena i glatka do oko 10. godine, kasnije postaje kvrgava, naborana, s dubokim brazdama i poprima tamnu, skoro crnu boju, te je čvrsta i otporna čak i na truljenje. Listovi su nasuprotni, cjeloviti, kožasti, ovalno kopljasti, u prosjeku dugački 5-8 cm, zelenog lica i srebrnastog naličja, prosječnog životnog vijeka oko 3 godine. Cvjetovi su mali, dvospolni, bijelo-zelenkaste boje, pojavljuju se skupljeni u grozdove (maslinove rese). Za vrijeme cvatnje (približno od travnja do lipnja), imaju karakterističan miris. Plod je mesnata koštunica, ovalnog oblika, koja se počinje razvijati tijekom ljeta i oko rujna postiže fazu zrelosti i kod nekih kultivara mijenja boju. Potpuna zrioba postiže se, ovisno o regiji, u razdoblju između studenog i ožujka. Maslina daje plodove nakon sedam godina, a najveći urod tek nakon dvadeset godina. Morfološka svojstva ploda masline ovise o djelovanju okolišnih i agrotehničkih čimbenika uzgoja, dok su svojstva

endokarpa uglavnom pod utjecajem genetskih čimbenika karakterističnih za određenu vrstu (Strikić i sur., 2007).

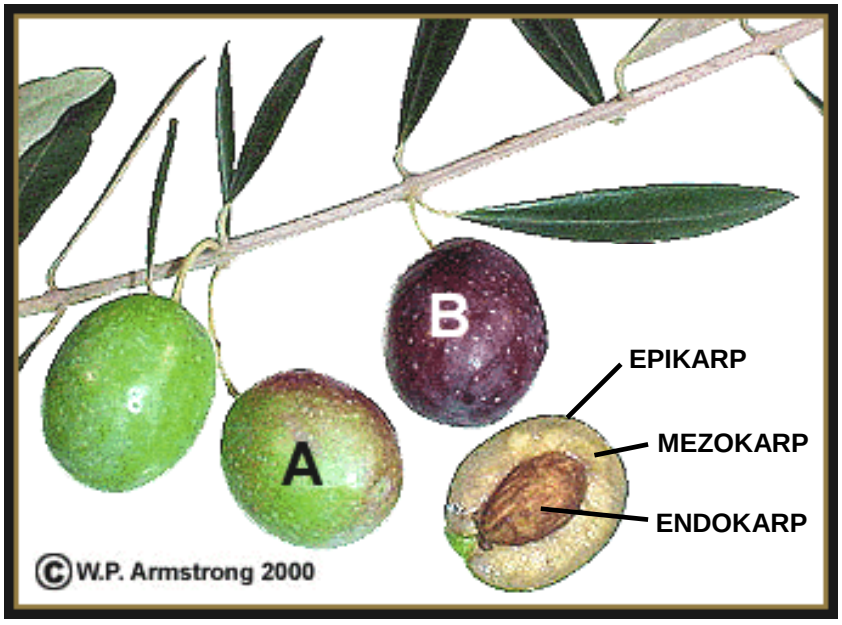
Plod masline sačinjava kožica (epikarp), mesnati dio (mezokarp) koji sadrži oko 70% ulja, te drvenasta koštica (endokarp) iz koje se dobiva preostalih 30% ulja (Slika 2). Ovisno o karakteristikama ploda, različiti kultivari uzgojenih maslina dijele se na one za proizvodnju maslina "za ulje" i one za proizvodnju maslina "za jelo".



**Slika 1.** Prikaz masline

(WEB 1)

U mediteranskim zemljama maslina je vrlo važna poljoprivredna kultura i pokriva oko 8 milijuna hektara, čineći gotovo 98% svjetskog usjeva (Pereira i sur., 2007). Proizvodnja masline (*Olea europea* L.) ima dugu tradiciju u Hrvatskoj. U priobalnom području Hrvatske maslina je najraširenija voćna kultura i zauzima površinu od oko 27 000 ha. U uzgoju je veliki broj kultivara, a najzastupljeniji je kultivar Oblica, koja čini 75% fonda stabala masline u Hrvatskoj (Strikić i sur., 2007).




**Slika 2**. Plod masline; A- poluzreli, B – potpuno zreli

(WEB 2)

### 1.1.2. Kultivari maslina

U Hrvatskoj je identificiran 31 autohtoni kultivar maslina, a introducirano je 44 kultivara, pri čemu je potrebno istaknuti kako nije obavljena potpuna identifikacija asortimana masline u Hrvatskoj. Oblica je naš najrasprostranjeniji kultivar masline. U našem asortimanu masline, zastupljena je s oko 60% (Miljković, 1991), odnosno s oko 80% (Kovačević i Perica, 1994). Najraširenija introducirani kultivar je talijanski kultivar Leccino. U nacionalnu sortnu listu upisana su 32 kultivara masline (Zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo, 2007; Gugić i sur., 2007). Odnos proizvodnje sadnog materijala autohtonih i introduciranih kultivara masline postupno se mijenjao u smjeru veće zastupljenosti proizvodnje sadnog materijala autohtonih kultivara u ukupnoj proizvodnji, a tijekom godina proizvedeno je najviše sadnica kultivara Oblice (Gugić i sur., 2007). Prema svojim gospodarskim, genetskim, selekcijskim, kulturno-povijesnim, krajobraznim, stanišnim vrijednostima, svojoj izvornosti, ugroženosti te po utjecaju na opću bioraznolikost, izdvojeno je sedam najvažnijih autohtonih kultivara: Oblica, Lastovka, Bjelica, Dužica, Paštrica, Levantinka i Drobnica.

Kultivar**: Oblica**

Oblica (Slika 3) se smatra autohtonim kultivarom (Miljković, 1991; Bakarić, 2002). Ovaj je kultivar mješovitih gospodarskih svojstava, odnosno od ploda Oblice se može proizvoditi ulje jer u plodu ima do 21% ulja (Kovačević i Perica, 1994), a zbog krupnoće i čvrste konzistencije (Strikić, 2005) može se i konzervirati. Najrasprostranjeniji je kultivar masline, najviše zastupljen na području Splita, Makarske i otoka Brača. Razvija srednje bujno stablo, prirodno stvara krošnju okruglog oblika. Grane rastu pod kosim kutom; ima veliki broj listova, sivo-maslinaste boje, eliptičnog oblika s valovitom površinom. U vrijeme suše, Oblica spiralno uvija listove radi smanjivanja gubitka vode transpiracijom. Listovi pripadaju kategoriji srednje krupnih listova. Plod Oblice je okruglastog oblika prosječne mase oko 5 grama.



**Slika 3.** Kultivar Oblica - grančica s plodovima
(WEB 3)

Kultivar: **Dužica**

Dužica (Slika 4) je uvezena iz Italije prije 250 godina. Ime je dobila po dugačkom plodu koji je najduži od svih domaćih vrsta maslina. Uzgaja se na cijelom uzgojnom području Hrvatske, ali u malim količinama. Razvija srednje bujno stablo, srednje visokog debla i kuglaste krošnje. Listovi su blijedo-zelene boje, dugi i kopljastog izgleda. Prema međunarodnoj klasifikaciji, listovi Dužice su veliki. Plod je duguljast, blago uvijen prema vrhu, prosječne mase oko 9 g; zelenkaste boje u početku zrenja, koja postupno prelazi u crvenkasto-ljubičastu,

te u crvenu u fazi pune zrelosti. Vrlo je otporna na napad maslinove mušice i maslinovog moljca, što je svrstava u kvalitetne stolne kultivare masline.



**Slika 4.** Kultivar Dužica
(Ozimec i sur., 2009)

Kultivar: **Lastovka**

Lastovka (Slika 5) je autohtoni kultivar masline koji vodi porijeklo s otoka Korčule gdje je i najviše proširen uzgoj. Prema Bakariću (2005), Lastovka je drugi po gospodarskom značenju udomaćeni kultivar masline. Stabla ovog kultivara mogu se procijeniti na starost od 250-300 godina. Razvija srednje bujno stablo s piramidalnom krošnjom koja je posljedica uspravnog rasta grana; ima kratko i račvasto deblo. Listovi su maleni i tamnozelene boje, kopljastog izgleda. Prema međunarodnoj klasifikaciji, Lastovka ima sitni list. Obod lista je ravan kao i sami list. Plod je srednje krupan, eliptično izdužen, intenzivno zelene boje; prosječne mase oko 3 grama. Veoma je osjetljiva na niske temperature te zbog toga ima ograničen areal rasprostranjenja, također veoma je osjetljiva na napad raka masline, ali izuzetno otporna na dugotrajnu sušu.



**Slika 5.** Kultivar Lastovka

**(**WEB 4**)**

Kultivar: **Rošinjola**

Rošinjola (Slika 6) je autohtoni kultivar masline koji uz Istarsku Bjelicu, Bužu i Crnu, jedan od najzastupljenijih u Istri, a interes za sadnjom takvih kultivara sve više raste (Milotić i sur., 2005; Poljuha i sur., 2008); uzgaja se najviše u južnom dijelu Istre. Stablo je srednje bujno, čak i u optimalnim uvjetima; krošnja je kompaktna, okruglasta, gusta. Listovi su tamnozelene boje, plod je simetričan, prosječne mase oko 2,5 g, jajolik, u zriobi tamnoljubičaste boje.



**Slika 6**. Kultivar Rošinjola

(WEB 5)

## Identifikacija kultivara maslina

Prirodni procesi spontanog križanja i mutacije, kao i selekcija koju su provodili maslinari tijekom dugog razdoblja uzgoja masline, rezultirali su velikom raznolikošću morfoloških svojstava. Dodatni problem u kvalitetnoj identifikaciji kultivara stvara veliki broj sinonima i homonima koji se koriste u različitim i istim uzgojnim područjima (Strikić i sur., 2007). Identifikacija i klasifikacija genotipova masline u svrhu razjašnjavanja mogućih slučajeva sinonimije i homonije od velike je važnosti za očuvanje biljnih genetskih izvora masline (Šatović i sur., 2011). Bioraznolikost maslina uzgajanih u području Mediterana je veća nego u drugim područjima, stoga su važne moderne i pouzdane metode za identifikaciju različitih kultivara maslina. Identifikacija kultivara maslina može se temeljiti na morfologiji (Fabbri i sur., 1995) te su kvalitativne morfološke metode tradicionalno najkorištenije, ali imaju niz prednosti i nedostataka. Između ostalog, navedene metode su subjektivne i nedovoljno standardizirane (Klepo i sur., 2012). DNA markeri, kao što su nasumično umnožene polimorfne DNA (RAPDs), polimorfizmi duljine umnoženih fragmenata (AFLPs) i mikrosateliti (Carriero i sur., 2002; Cipriani i sur., 2002), koriste se za identifikaciju kultivara maslina zbog svoje neovisnosti o okolišnim promjenama. Mikrosatelitni markeri (simple sekvence repeats, SSRs) važni su u identifikaciji kultivara maslina jer su prenosivi, kodominantni, vrlo polimorfni, široko raspodijeljeni po genomu i lako ponovljivi (Rallo i sur., 2000). Dokazano je da su mikrosateliti učinkoviti za karakterizaciju kultivara, a nekoliko lokusa je razvijeno za *Olea europaea* (Carriero i sur., 2002; Cipriani i sur., 2002; De la Rosa i sur., 2002; Baldoni i sur., 2009). Osim DNA markera, razvijena je i metoda za klasifikaciju kultivara maslina po sadržaju bifenola u listovima (Japón-Luján i sur., 2006).

### 1.1.3. Hranidbena i zdravstvena vrijednost

Plodovi maslina važni su u proizvodnji ulja. Vrijeme, način berbe i mljevenje maslina vrlo su važni za dobivanje ulja visoke kakvoće, pri čemu je potrebno plodove maslina mljeti istog dana kad su ubrane ili ih pohraniti u dobro prozračnom, hladnom prostoru, bez stranih mirisa, u razdoblju ne duljem od 3-4 dana. Osim u proizvodnji ulja, plodovi maslina koriste se za jelo, zbog visoke nutritivne vrijednosti (Tablica 2).

**Tablica 2.** Prosječni kemijski sastav maslina (zrele, konzervirane) na 100 g ploda (USDA National Nutrient Database, 2003)

| sastojak | jedinica | |
|---|---|---|
| Energija | kcal | 115 |
| Voda | g | 79,99 |
| Proteini (ukupno) | g | 0.84 |
| Masti (ukupno) | g | 10,68 |
| Ugljikohidrati (ukupno) | g | 6,26 |
| Dijetalna vlakna | g | 3,2 |
| Vitamin E | mg | 0,29 |
| Vitamin $B_1$ | mg | 0,003 |
| Vitamin $B_3$ | mg | 0,037 |
| Vitamin $B_6$ | mg | 0,009 |
| Vitamin C | mg | 0,9 |
| Vitamin E | mg | 1,67 |
| Vitamin K | µg | 1,4 |
| Natrij | mg | 735 |
| Kalij | mg | 8 |
| Kalcij | mg | 88 |
| Fosfor | mg | 3 |
| Magnezij | mg | 4 |
| Željezo | mg | 3,30 |
| Cink | mg | 0,22 |
| Zasićene masne kiseline | g | 1,415 |
| Mononezasićene masne kiseline | g | 7,888 |
| Polinezasićene masne kiseline | g | 0,911 |

Listovi masline su korišteni u narodnoj medicini već nekoliko tisuća godina na mediteranskom području (Gucci i sur., 1997). Povijesno gledano, koristili su se za liječenje malarije i gripe (Benavente-Garcia i sur., 2000). Njihova ljekovitost je potvrđena mnogim istraživanjima. Pokazalo se da upravo maslinov list pokazuje vrlo dobra svojstva u borbi protiv infekcija i bolesnih stanja organizma. Listovi masline imaju veliki potencijal kao

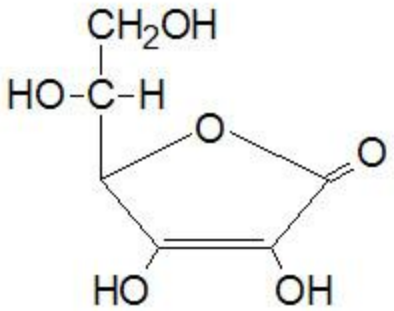
prirodni antioksidansi (Somova i sur, 2003; Skerget i sur, 2005); sadrže značajne količine oleuropeina i ostalih fenola, važnih čimbenika za njihovu antioksidativnu aktivnost (Lee i sur., 2009).

## 1.2. ASKORBINSKA KISELINA

Najvažniji vitamin u voću i povrću za ljudsku prehranu je askorbinska kiselina ili vitamin C (Lee i Kader, 2000). Askorbinska kiselina je bijela kristalna tvar kiselog okusa, bez mirisa, lako topiva u vodi. Prvi koji je uspio izolirati askorbinsku kiselinu bio je mađarski znanstvenik Albert Szent-Gyorgyi. Tijekom 1951.g otkriveno je antivirusno i antibakterijsko djelovanje askorbinske kiseline. Prisutna je u citosolu, kloroplastima, vakuoli, mitohondriju i staničnoj stijenci (Rautenkranz i sur., 1994). Koncentracija u kloroplastima može biti visoka (do 50 mmol u špinatu) i smatra se da je povezana s njezinom ulogom u fotosintezi (Foyer, 1993).

### 1.2.1. Struktura i kemijska svojstva askorbinske kiseline

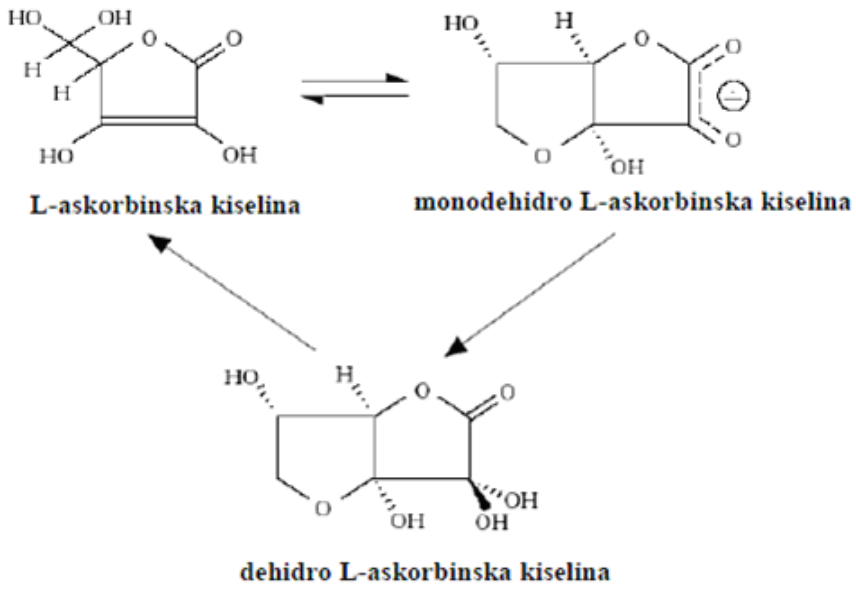
Po svojoj strukturi, askorbinska kiselina je ketolakton sa šest ugljikovih atoma pa je kemijski gledano molekula slična glukozi (Slika 7). U organizmu reverzibilno oksidira do dehidroaskorbinske kiseline, koja posjeduje potpunu vitaminsku aktivnost. Na zraku je izuzetno nestabilna i lako gubi svojstva skladištenjem i prokuhavanjem. Podložna je oksidaciji, posebno na zraku i pod utjecajem lužina, željeza i bakra.




**Slika 7.** Struktura askorbinske kiseline

(WEB 6)

Ljudi i životinje ne mogu sintetizirati askorbat zbog gubitka funkcionalnog oblika posljednjeg enzima (*l*-gulono-*1,4*-laktonoksidaza) u biosintetskom putu. Askorbinska kiselina je jedan od najistraživanijih vitamina i ujedno prvi sintetski dobiveni vitamin. Oksidacijom askorbinske kiseline nastaje monodehidroaskorbatni radikal, koji disproporcionira na askorbinsku kiselinu i dehidroaskorbinsku kiselinu (Slika 8). Budući da je dehidroaskorbinska kiselina nestabilna iznad pH 7, potrebno je održati askorbinsku kiselinu u reducirajućem stanju kako bi se spriječio njen gubitak. Askorbinska kiselina reducira se za oko 90% pri normalnim uvjetima (Foyer, 1993). Za održavanje askorbinske kiseline u reducirajućem obliku važna su dva enzima: monodehidroaskorbat reduktaza (MDAR), koja koristi NAD(P)H kao reducens, i dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) koja koristi glutation kao reducens (Smirnoff, 1996). DHAR veže askorbinsku kiselinu na glutation koji je drugi glavni topljivi antioksidans u biljnim stanicama. Te reakcije zajedno čine askorbat-glutationski (Halliwell-Asada) ciklus (Foyer, 1993). Dva enzima koja kataliziraju oksidaciju askorbinske kiseline su askorbat oksidaza i askorbat peroksidaza (Asada, 1994).




**Slika 8.** Struktura askorbinske kiseline i njenih oksidiranih oblika (Smirnoff, 1996.)

Najbolji izvori askorbinske kiseline u hrani su raznoliko voće i povrće: crni ribiz, brokula, kupus, grejp, paprika, kelj, limun, mango, naranče, papaja, krumpir, šipak, špinat, jagode i borovnice (Tablica 3).

**Tablica 3.** Sadržaj askorbinske kiseline u voću i povrću (mg)

| Namirnica | Vitamin C (mg) |
|---|---|
| Sok od naranče | 75 |
| Sok od grejpa | 60 |
| Naranča | 70 |
| Grejp | 44 |
| Jagode | 82 |
| Rajčica | 23 |
| Brokula | 58 |
| Krumpir | 26 |
| Masline | 0,9 |

### 1.2.2. Funkcija askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina je snažan reducens te ima funkciju kao hvatač radikala (Zhang i sur., 2003). Važan je antioksidans, i u suradnji s drugim komponentama antioksidativnog sustava, štiti biljke od oksidativnih oštećenja. Osim antioksidativnog djelovanja, askorbinska kiselina ima važnu ulogu u fotosintezi i fotoprotekciji (Smirnoff, 1996). Jedna od vrlo bitnih uloga askorbinske kiseline je zaštita tokoferola (vitamina E) od oksidacije. Biokemijske funkcije askorbinske kiseline mogu se podijeliti u nekoliko kategorija: (1) Antioksidativno djelovanje gdje askorbinska kiselina reagira brzo sa superoksidom, singletnim kisikom, ozonom i vodikovim peroksidom. Tako sudjeluje u uklanjanju ovih reaktivnih oblika kisika koji nastaju tijekom aerobnog staničnog metabolizma, dok se pojačano stvaraju tijekom izlaganja biljke stresnim činiteljima visoke i niske temperature, suša, zagađivači, herbicidi. (2) MDA i DHA se reduciraju do askorbata u askorbat-glutationskom ciklusu. (3) Transport elektrona- askorbinska kiselina je donor elektrona *in vitro* u transportu elektrona. Nedavni dokazi upućuju na to da MDA može djelovati kao akceptor elektrona iz PS II *in vivo* (Miyake

i Asada, 1992), te može djelovati i kao donor elektrona i akceptor elektrona u transmembranskom transportu. (4) Sinteza oksalata i tartarata (Saito, 1996). Dosadašnja znanstvena istraživanja nisu obuhvatila koncentraciju askorbinske kiseline u samim listovima maslina.

## 1.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su velika skupina biološki aktivnih fitokemikalija koji imaju veliku antioksidativnu aktivnost i stoga sposobnost smanjenja nastanka oštećenja biljnih stanica uslijed pojave oksidativnog stresa. Prisutni su u svim višim biljkama, iako postoje velike kvalitativne i kvantitativne razlike između vrsta (Kähkönen i sur., 1999, Macheix i sur., 1990). Kähkönen i sur. (1999) analizirali su ukupni fenolni sadržaj 92 biljne vrste. Dokazali su da se velike količine fenolnih spojeva nalaze u bobičastom voću, dok je njihov sadržaj relativno nizak u žitaricama i povrću.

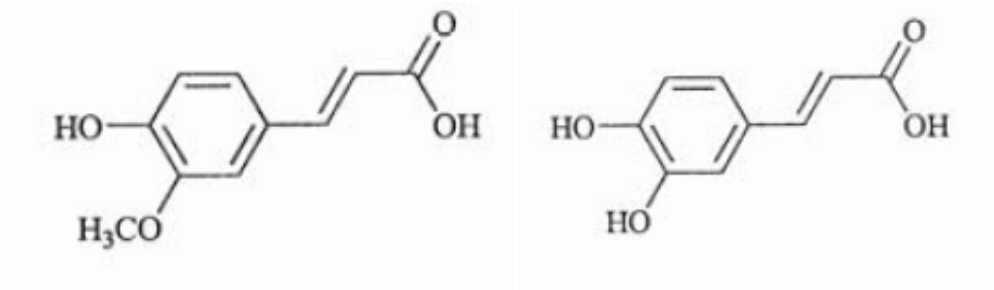
### 1.3.1. Struktura i kemijska svojstva fenolnih spojeva

Fenolni spojevi imaju jedan ili više aromatskih prstenova, s jednom ili više hidroksilnih skupina. Heterogena su skupina spojeva, od kojih su neki topivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su netopivi polimeri.

Sinteza biljnih fenola može se odvijati na nekoliko načina. Dva najvažnija puta biosinteze uključuju: put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline (acetil-malatni put). Kroz put šikiminske kiseline sintetizira se većina biljnih fenola. Put jabučne kiseline ima neznatnu ulogu u sintezi biljnih fenolnih spojeva, ali je značajan za sintezu fenola kod gljiva i bakterija. U višim biljkama većina sekundarnih fenola nastaje uglavnom iz fenilalanina, produkta puta šikiminske kiseline. Put šikiminske kiseline počinje od jednostavnog ugljikohidrata i nastavlja se do aromatskih aminokiselina. Jedan od međuspojeva je šikiminska kiselina, po kojoj je taj put nazvan.

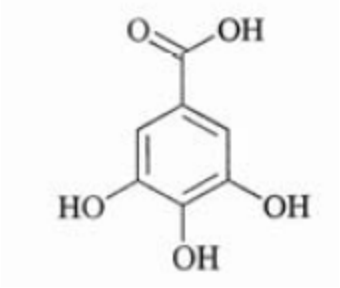
Fenolni spojevi mogu se na temelju aglikonske strukture podijeliti u nekoliko podskupina. Aglikoni se obično dalje modificiraju konjugacijom sa šećerima i karboksilnim kiselinama. Tako je ukupan broj mogućih struktura velik. Trenutno je poznato više od 8 000 fenolnih struktura u rasponu od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline, do visoko polimernih spojeva, kao što su kondenzirani tanini (Urquiaqa i sur., 2000). Biljni polifenoli uključuju fenolne kiseline, flavonoide i tanine, ali i manje uobičajene lignane i stilbene (Dai i

Mumper, 2010). Fenolne kiseline podijeljene su u 2 skupine: hidroksicimetna (Slika 9) i hidroksibenzojeva kiselina (Slika 10).




(A) (B)

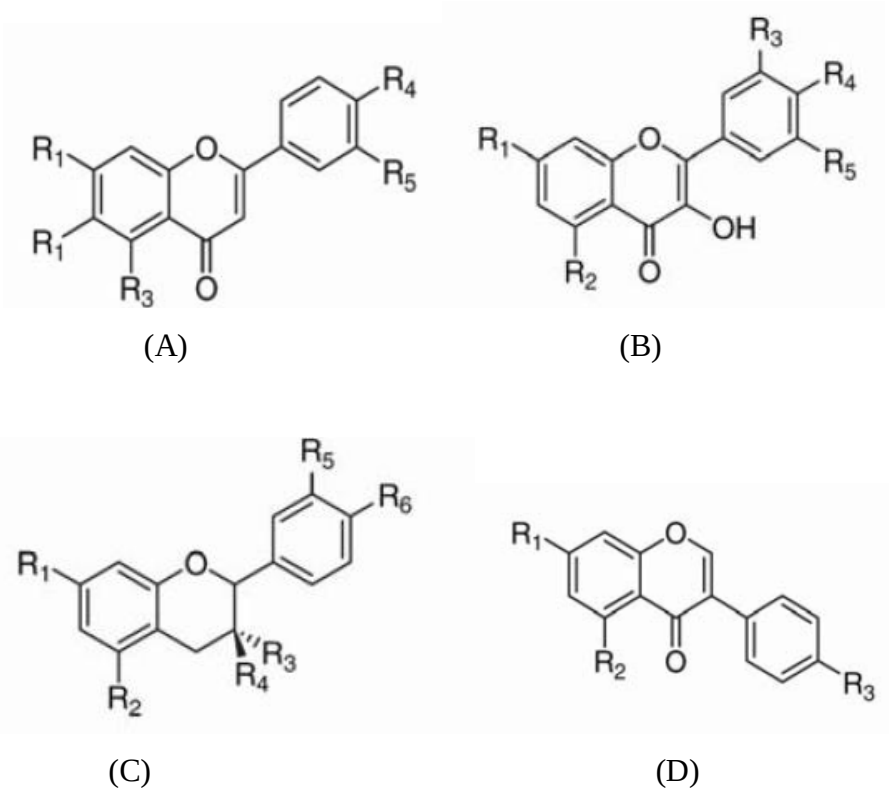
**Slika 9.** Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina:
ferulinska kiselina (A) i kavina kiselina (B)




**Slika 10.** Kemijska struktura hidroksibenzojeve kiseline: galna kiselina
(Dai i Mumper, 2010)

Flavonoidi (Slika 11) su jedna od najvećih i najčešće proučavanih skupina biljnih fenola. Široko su rasprostranjeni u biljkama. Građeni su od 2 benzenska prstena (Pietta, 2009). Osnovni kostur flavonoida može imati brojne supstituente: hidroksilne skupine (najčešće na položajima 4, 5 i 7) te šećere (većina flavonoida prirodno postoje kao glikozidi). Dok hidroksilne skupine i šećeri povećavaju topivost flavonoida u vodi, drugi supstituenti, npr. metil eteri čine ih lipofilnima. U biljkama imaju različite uloge, npr.u pigmentaciji i obrani od napada patogenih mikroorganizama. Nalaze se u voću, povrću, mahunarkama, žitaricama, orašastim plodovima, ljekovitom bilju, začinima i piću (pivo, vino, čaj). Flavonoidi se klasificiraju na osnovi stupnja oksidacije središnjeg C-prstena u 6 skupina: flavone, flavonole, flavonone, izoflavone i antocijanine (Dai i Mumper, 2010).

Flavoni sadrže jednu karboksilnu skupinu. Najpoznatiji su apigenin i luteolin. Najvažniji izvori flavona su masline, peršin i celer (Manach i sur., 2008). Flavonoli su najčešći tip flavonoida. Najraširenij flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin. Važni izvori flavonola su luk, kelj, jabuke i crveno vino (King i Young, 1999; Manach i sur., 2008). Flavanoli se mogu naći u obliku monomera kao katehini i polimera kao proantocijanidini (Manach i sur., 2008). Izoflavoni su flavonoidi strukturno slični estrogenima, iako nisu steroidi. Zahvaljujući ovoj sličnosti, izoflavoni se vežu za estrogenske receptore (Manach i sur., 2008). Tanini su fenolni polimeri, a mogu biti hidrolizabilni i kondenzirani. Hidrolizabilni tanini sadrže središnju srž polihidroksilnih alkohola, kao što je glukoza i hidroksilne grupe, koje su djelomično ili potpuno esterificirani te od galne kiseline (galotanini) ili elaginske kiseline (elagitanini). Kondenzirani tanini su oligomerni derivati flavonola (flavon-3-oli, flavon-3,4-oli ili oboje) kao što su katehin i epikatehin. Složeniji su nego hidrolizabilni tanini. Nalaze se u voću i povrću, posebno mahunarkama (Manach i sur., 2008).




**Slika 11**. Kemijska struktura flavonoida: flavon (A), flavonol (B), flavanol (C), izoflavon (D) (Dai i Mumper, 2010)

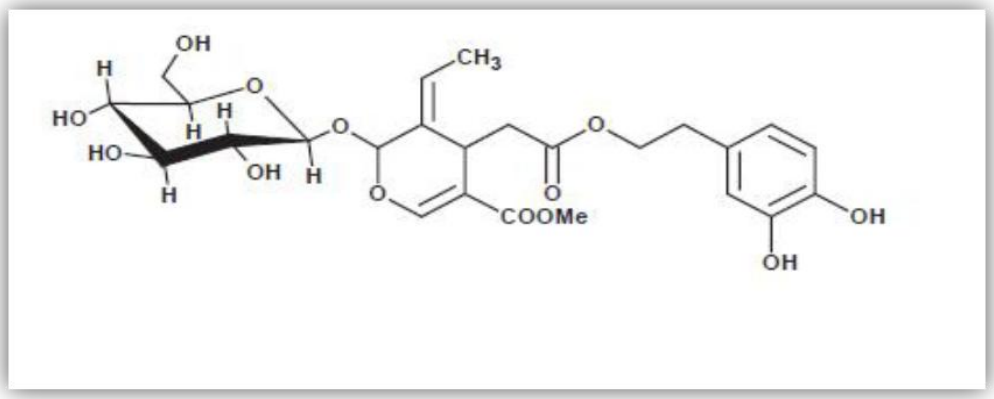
### 1.3.2. Funkcija fenolnih spojeva

Jednostavni fenolni spojevi imaju važne uloge u biljnim stanicama. Flavonoidi posjeduju mnoge biokemijske i farmakološke učinke, uključujući antioksidativna i antialergijska svojstva (Rice-Evans i sur., 1995). Kavina i ferulinska kiselina mogu inhibirati klijanje i rast susjednih biljaka. Salicilna kiselina česta je u mnogim biljkama, a uključena je u otpornost biljaka na patogene. Neki fenolni spojevi, poput lignina mogu pružiti mehaničke barijere koje imaju ulogu u sprječavanju napada različitih patogena (Nicholson i Hammerschmidt 1992), dok drugi imaju antimikrobno djelovanje (Cowan 1999).

Istraživanja *in vitro* dokazala su antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva u borbi protiv humanih patogenih bakterija (Puupponen-Pimiä i sur., 2001), čak i virusa (Knox i sur., 2003). Antimikrobno djelovanje fenola utvrđeno je na bakterijama kao što su: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus aereus*, *Salmonela typhi* i *Vibrio parahaemolyticus* (Markin i sur., 2003). Prema Sudjana i sur. (2009), ekstrakt maslinovih listova ima značajnu antimikrobnu aktivnost na *Heliobacter pylori*. Stoga, fenolni spojevi imaju potencijal za sprječavanje kroničnih upalnih infekcija (Ames i sur., 1993). Antimikrobna svojstva fenolnih spojeva temelje se na njihovoj sposobnosti da narušavaju strukturu membrane i denaturiraju proteine (Cowan 1999). Fenolni spojevi inhibiraju enzime poput prostaglandin sintaze, lipoksigenaze i ciklooksigenaze, usko povezanih s tumorogenezom (Laughton i sur., 1991); inhibiraju rast tumora uključujući modulaciju onkogena i tumor supresorskih gena, prijenos signala, kao i apoptozu (Scalbert i sur., 2005).

### 1.3.3. Fenolni spojevi maslina

Flavonoidi i ostali fenolni spojevi dobiveni iz maslinovog lista imaju različite biološke aktivnosti, a također mogu biti odgovorni za učinkovito farmakološko djelovanje maslinovih listova (Abaza i sur., 2007). Dokazano je da kombinacija fenola u ekstraktu maslinova lista ima antioksidativno i antimikrobno djelovanje (Lee i Lee, 2010; Sudjana i sur., 2009). Iako pojedinačni fenolni spojevi imaju jaku aktivnost *in vitro*; pokazalo se da antioksidativna i antimikrobna aktivnost fenolnih spojeva u kombinaciji, ima slične ili bolje učinke nego pojedinačni fenoli (Lee i Lee, 2010). Ekstrakt maslinovih listova (OLE) tamnosmeđe je boje i gorkog okusa. Glavni polifenolni spojevi u ekstraktu maslinova lista su: oleuropein, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, hidroksitirosol, i tirosol (Hayes i sur., 2011). Najaktivniji spoj u listovima masline, sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem je oleuropein (Mazziotti i sur., 2007) (Slika 12). Oleuropein, pripada vrlo specifičnoj skupini spojeva poput kumarina, pod nazivom sekoiridoidi (Bendini i sur., 2007). Bourquelot i Vintilesco otkrili su ovaj spoj 1908. godine (Benevente-Garcia i sur., 2000). Uglavnom je prisutan u plodu masline, dok ga u ulju ima vrlo malo. Također se nalazi i u listovima masline (Markin i sur., 2003; Benevente-Garcia i sur., 2000). Atiok i sur. (2008) su utvrdili da je oleuropein (29%) najzastupljeniji fenol u sirovom ekstraktu listova masline. Pereira i sur. (2007) također su dokazali da su oleuropein i luteolin-7-O-glukozid najzastupljeniji fenolni spojevi u liofiliziranom ekstraktu maslinova lista (Tablica 4). Antioksidativna aktivnost fenolnih hidroksilnih spojeva, kao što su oleuropein, hidroksitirosol i luteolin-7-O-glukozid, rezultat je prisutnosti hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi (Benavente-García i sur., 2000).




**Slika 12**. Struktura oleuropeina
(Aytul i sur., 2010; Al-Azzawie i sur., 2006)

Oleuropein ima mnoge zdravstvene prednosti: smanjuje intenzitet lipidne peroksidacije, poboljšava metabolizam lipida, ima važnu ulogu u sprječavanju srčanih bolesti i pretilosti (Gilani i sur., 2005), te u snižavanju krvnog tlaka i razine šećera u krvi (Gonzalez i sur., 1992). Oleuropein ima brojna djelovanja: antiaritmijsko, spazmolitično, hipoglikemijsko i antivirusno (Lee-Huang i sur., 2003; Ranalli i sur., 2006), te imunostimulacijsko, i kardioprotektivno (inhibirajući oksidaciju lipoproteina niske gustoće). Sprječava nastanak slobodnih radikala, zahvaljujući sposobnosti vezanja metala poput bakra i željeza, koji kataliziraju reakcije kao što je lipidna peroksidacija. Oleuropein može izravno neutralizirati slobodne radikale (Galli i Visioli, 1999). Osim oleuropeina, i kavina kiselina pokazuje inhibicijske učinke protiv mikroorganizama, dok apigenin-7-glukozid, također pronađen u maslinovom listu djeluje protiv Alzheimerove bolesti i bolesti jetre (Japón-Luján i sur., 2006).

**Tablica 4.** Fenolne skupine u ekstraktu lista masline (OLE), njihovi primjeri, i relativni sadržaji (Benavente-Garcia i sur., 2000).

| Ime skupine | Primjeri spoja | % sadržaj u OLE |
|---|---|---|
| Oleuropeozidi | Oleuropein | 24,54 |
| | Verbaskozid | 1,11 |
| Flavoni | Luteolin-7-glukozid | 1,38 |
| | Diosmetin-7-glukozid | 1,37 |
| | Luteolin | 0,54 |
| | Diosmetin | 0,21 |
| Flavonoli | Rutin | 0,05 |
| Flavan-3-oli | Katehin | 0,04 |
| Supstituirani fenoli | Tirosol | 0,71 |
| | Hidroksitirosol | 1,46 |
| | Kavina kiselina | 0,34 |

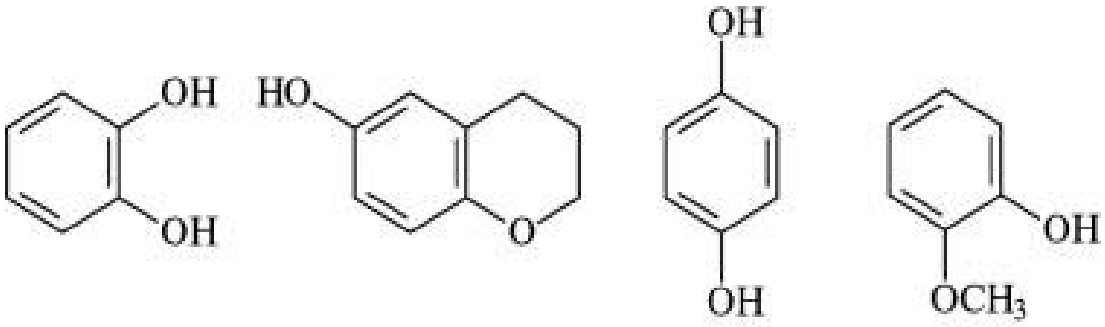
## 1.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Antioksidansi (Slika 13) su skupina različitih prirodnih spojeva koji igraju važnu ulogu u zaštiti od štetnog djelovanja slobodnih radikala, na način da neutraliziraju već nastale slobodne radikale ili sprječavaju njihovo nastajanje. Antioksidansi mogu biti enzimi ili različite male neenzimatske molekule kao što su npr. fenoli, glutation, askorbinska kiselina. Vitamini i polifenoli su važne komponente u voću i povrću koje posjeduju antioksidativnu aktivnost (Shi i sur., 2001).

Antioksidansi djeluju na 2 načina:

1. HAT (Hydrogen Atom Transfer)- hvataju slobodne radikale, donirajući atom vodika
2. SET (Single Electron Transfer) - prenose 1 elektron, da bi reducirali metalne ione, radikale i karbonile (Antolović i sur., 2002).

Dva su izvora antioksidansa: naš vlastiti organizam je sposoban proizvesti antioksidanse, uz pomoć vitamina i minerala. Drugi, vanjski, izvor antioksidansa je hrana. Podijeljeni su u 2 skupine: primarni i sekundarni (Antolović i sur., 2002). Primarni antioksidansi inhibiraju ili usporavaju oksidaciju uklanjanjem slobodnih radikala, dok sekundarni antioksidansi djeluju mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala.




**Slika 13.** Kemijska struktura antioksidanasa
(Aytul i sur., 2010; Pokorny, 2007)

### 1.4.1. Uloga i značaj antioksidanasa

Antioksidansi su odgovorni za zaštitu biljnih stanica u kojima su prisutni, za održavanje kvalitete voća i povrća ta za pozitivan učinak na zdravlje ljudi koji konzumiraju voće i povrće bogato antioksidansima. Postoje jasni epidemiološki dokazi koji povezuju prehranu bogatu antioksidansima sa smanjenim rizikom od razvoja bolesti (Kaur i Kapoor 2001). Antioksidansi i enzimski sustavi uključeni u njihovu sintezu i obnovu, štite stanične membrane i organele od oštećenja uzrokovanih štetnim učincima reaktivnih kisikovih jedinki (ROS). ROS nastaju i tijekom normalnog staničnog metabolizma, dok se pojačano stvaraju u uvjetima stresa uslijed nepovoljnog djelovanja različitih biotičkih i abiotičkih činitelja. ROS uzrokuju oksidativna oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Stoga, antioksidansi, koji mogu neutralizirati slobodne radikale, mogu biti od središnji važnosti u prevenciji tih bolesti.

Flavonoidi i drugi biljni fenoli, kao što su fenolne kiseline, tanini, lignani i lignini, posebno su važni antioksidansi jer oni obično imaju visok redoks potencijal (Kahkonen i sur., 1999).

Od ne-enzimskih antioksidanasa, koji su općenito male molekule, askorbinska kiselina igra važnu ulogu u uklanjanju ROS-a, a glutation je bitan za obnavljanje dehidroaskorbinske kiseline (DHAA), koja nastaje u procesu uklanjanja ROS-a askorbat-glutationskim ciklusom (Lee i Kader 2000).

Enzimski antioksidativni sustavi uključuju širok spektar enzima, kao što su superoksid dismutaza, askorbat peroksidaza, katalaza i dr., imaju važnu ulogu u nastajanju i razgradnji $H_2O_2$, a time i u aklimatizaciji biljaka na nepovoljne biotičke i abiotičke uvjete u okolišu (Lee i Kader 2000).

## 1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u koncentraciji askorbinske kiseline, ukupnih fenola, ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakta listova četiri kultivara maslina (Oblica, Dužica, Lastovka i Rošinjola) te utvrditi postojanje korelacija između tih parametara.

# 2. MATERIJALI I METODE

## 2.1. MATERIJALI

U istraživanju su korišteni listovi 4 kultivara dvogodišnjih sadnica maslina: Oblica, Dužica, Lastovka i Rošinjola. Sadnice su uzgajane u stakleniku pri kontroliranim uvjetima uzgoja. Sva laboratorijska mjerenja napravljena su u Laboratoriju za biokemiju na Odjelu za biologiju u Osijeku.

Uzorkovani su dvogodišnji listovi masline. Nakon što su ubrani, listovi su oprani destiliranom vodom te sušeni u sušioniku 48h na 37 °C. Suhi listovi usitnjeni su u prah, te je napravljena ekstrakcija sa 70%-tnim etanolom u omjeru 1:4. Ekstrakti su zatim stavljeni u vodenu kupelj 30 minuta na 40 °C, zatim 4h u na tresilicu na 40 °C i 30 min na sonikaciju u vodenoj kupelji na 60 °C. Supernatant je od taloga odvojen pomoću Büchnerovog lijevka. Ekstrakt je profiltriran prvo kroz obični filtar papir, a zatim kroz fini filtar papir veličine pora 45 µm. Etanolni ekstrakti držani su na -20 °C do mjerenja.

## 2.2. METODE RADA

Tijekom istraživanja u ekstraktu maslinovih listova određeni su:

- Ukupna askorbinska kiselina
- Ukupni fenolni spojevi
- Ukupna antioksidativna aktivnost

### 2.2.1. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline

Svježe ubrani listovi masline usitnjeni su pomoću tučka i tarionika u tekućem dušiku. 0,1 g tog finog praha odvagano je u plastičnu tubu od 15 mL i na prah je dodano 10 mL destilirane vode. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 3 500 *g* supernatant je korišten za spektrofotometrijsko određivanje ukupne askorbinske kiseline prema Benderitter i sur. (1998). Na 500 µl reakcijske smjese koja se sastoji od 300 µl vodenog ekstrakta maslinovog lista, 100 µl 13,3% trikloroctene kiseline i 25 µl destilirane $H_2O$ dodaje se 75 µl otopine *2,4*-dinitrofenilhidrazina (DNPH) otopine. Reakcijske smjese se inkubiraju 3 h na 37 °C i nakon toga se u njih dodaje 500 µl 65% $H_2SO_4$. Slijepe probe se procesiraju na isti način kao i

uzorci, ali se u njih otopina DNPH dodaje nakon inkubacije u vodenoj kupelji. Apsorbancija tako priređenih uzoraka se određuje pri 520 nm, a koncentracija ukupne askorbinske kiseline u vodenim ekstraktima listova maslina se računa iz baždarnog pravca u kojem se askorbinska kiselina koristi kao standard.

### 2.2.2. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva

Koncentracija fenolnih spojeva iz dobivenih etanolnih ekstrakata listova masline određena je spektrofotometrijski, metodom po Folin-Ciocelteu (Singleton i Rossi, 1965). Ova metoda se bazira na reakciji Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) s reducirajućim reagensom (fenolni spoj) pri čemu dolazi do nastanka plave boje. U reakcijsku smjesu dodano je 20 µl etanolnog ekstrakta masline (ekstrakt je razrijeđen 2 puta), 1,58 ml destilirane $H_2O$ i 100 µl Folin-Ciocalteu reagensa uz miješanje na rotacijskoj miješalici. Nakon toga u periodu od najmanje 30 sekundi, a najviše 8 minuta dodano je 300 µl zasićene otopine $Na_2CO_3$ i dobro promiješano. Uzorci su zatim inkubirani u vodenoj kupelji 1 h na 37 °C. Apsorbancija tako priređenih uzoraka se određuje pri 765 nm, a sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima masline se računa iz baždarnog pravca u kojem se galna kiselina koristi kao standard.

### 2.2.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata listova maslina određena je metodom po Brand-Williamsu (Brand-Williams i sur., 1995). Metoda se zasniva na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Uklanjanje radikala se prati smanjenjem apsorbancije na 515 nm, do kojeg dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa (AH) ili reakcije s radikalima ($R^{\cdot}$).

$$DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$$
$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

U zatvorene mikroepruvete dodano je 5 µl ekstrakta maslina i 950 µl otopine DPPH. Reakcija se odvija u čvrsto zatvorenim mikroepruvetama uz lagano miješanje pri 20 °C tijekom 15 minuta. Nakon završene reakcije, sadržaj mikroepruveta prebačen je u kivetu, te je mjerena apsorbancija pri 515 nm, uključujući apsorbanciju slijepe probe. Ukupna

antioksidativna aktivnost određena je iz baždarnog pravca u kojem se Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koristio kao standard i izražava se u ekvivalentima Troloxa.

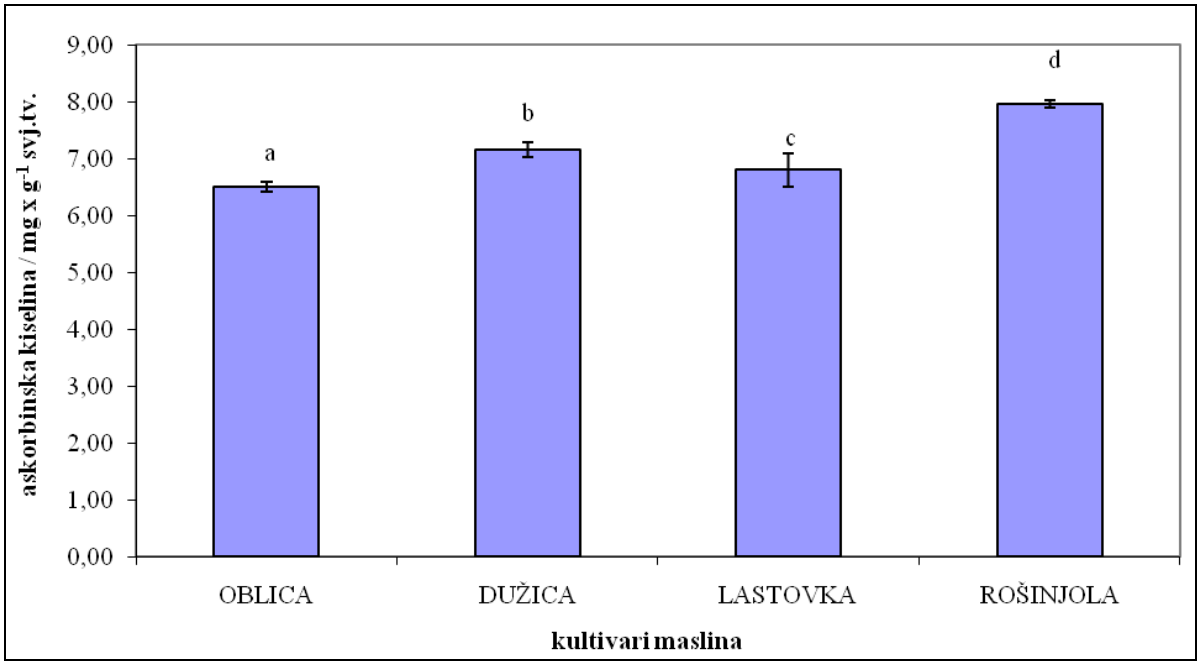
### 2.2.4. Statistička obrada podataka

U okviru statističke obrade podataka napravljena je analiza varijance (ANOVA) uz post hoc LSD (eng. *least significant difference*) test na razini značajnosti 5% ($p \leq 0,05$) korištenjem statističkog paketa Statistica 8.

# 3. REZULTATI

## 3.1. UKUPNA KONCENTRACIJA ASKORBINSKE KISELINE

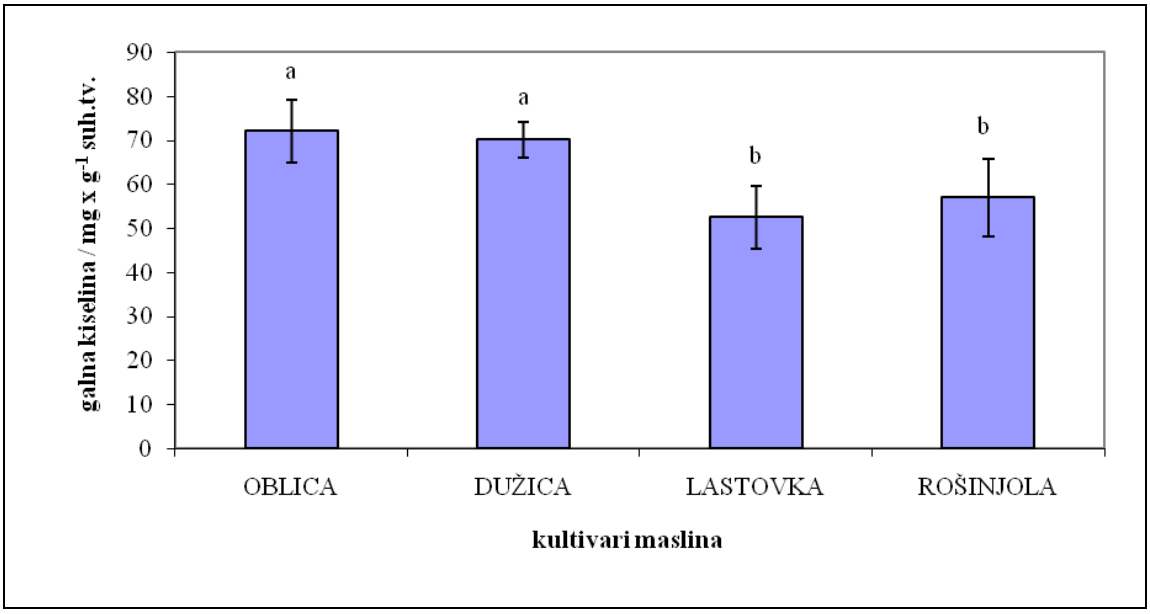
Najveću koncentraciju askorbinske kiseline imali su listovi kultivara Rošinjola (7,95 mg askorbinske kiseline/ g svježe tvari) i ta vrijednost se statistički značajno razlikovala od koncentracije askorbinske kiseline u listovima kultivara Dužice (7,16 mg askorbinske kiseline/ g svj.tv.). Listovi Lastovke imali su nešto nižu koncentraciju askorbinske kiseline (6,81 mg askorbinske kiseline/ g svj.tv.) koja se statistički značajno razlikovala od vrijednosti kod već navedenih kultivara. Listovi Oblice su imali najnižu koncentraciju askorbinske kiseline u odnosu na listove ostalih kultivara (6,51 mg askorbinske kiseline/g svj.tv.) (Slika 14).




**Slika 14.** Ukupna koncentracija askorbinske kiseline u listovima četiri kultivara maslina. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) se ne razlikuju prema LSD testu; $p \leq 0,05$.

## 3.2. UKUPNA KONCENTRACIJA FENOLNIH SPOJEVA

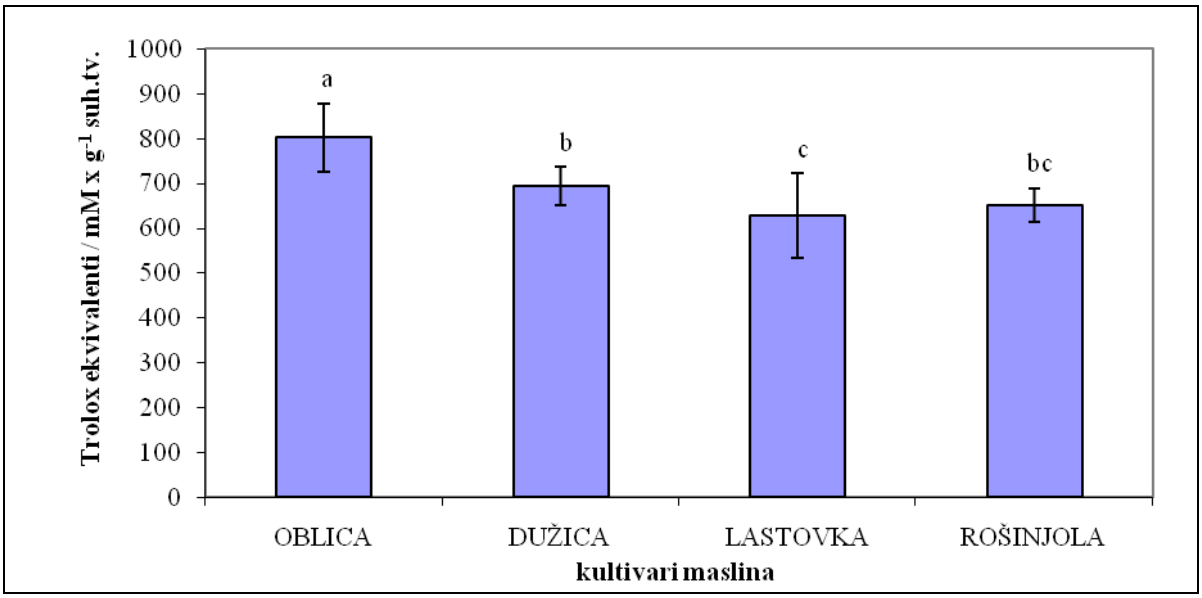
Listovi Oblice imali su najveću koncentraciju fenolnih spojeva (72,20 mg galne kiseline/g suh.tv.), ali ta vrijednost nije se statistički značajno razlikovala od koncentracije fenolnih spojeva u listovima Dužice (70,13 mg galne kiseline/g suh.tv.). Najmanju koncentraciju fenolnih spojeva imali su listovi Lastovke (52,62 mg galne kiseline/g suh.tv.), no ta se vrijednost nije statistički značajno razlikovala od vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva u listovima Rošinjole (57,08 mg galne kiseline/g suh.tv.) (Slika 15).




**Slika 15.** Ukupna koncentracija fenolnih spojeva u listovima četiri kultivara maslina. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) se ne razlikuju prema LSD testu; $p \leq 0,05$.

### 3.3. UKUPNA ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Najveću antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata listova imao je kultivar Oblica (801,63 mM Trolox/g suh.tv.) te se ta vrijednost statistički značajno razlikovala u odnosu na antioksidativnu aktivnost ekstrakta lista Dužice (694,69 mM Trolox/g suh.tv.). Između ostala dva kultivara nije bilo statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti etanolnih ekstrakata: Rošinjola (650,66 mM Trolox/g suh.tv.) te Lastovka s najmanjom antioksidativnom aktivnosti (627,56 mM Trolox/g suh.tv.) (Slika 16).




**Slika 16.** Ukupna antioksidativna aktivnost u listovima četiri kultivara maslina. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) se ne razlikuju prema LSD testu; $p \leq 0,05$.

# 4. RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio ispitati razlike u koncentraciji, ukupnih fenola i askorbinske kiseline, te razlike u vrijednostima ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima listova četiri kultivara maslina (Oblica, Dužica, Lastovka i Rošinjola). Listovi masline imaju veliki potencijal kao prirodni antioksidansi (Somova i sur, 2003; Skerget i sur, 2005) jer sadrže značajne količine oleuropeina i ostalih fenola, važnih čimbenika za njihovu antioksidativnu aktivnost (Lee i sur., 2009). Fenolni spojevi ekstrahirani iz maslinovih listova osim što imaju antioksidativno djelovanje (Somova i sur., 2003; Skerget i sur., 2005; Visioli i sur., 1998; Benavente-García i sur., 2000); pokazuju i antimikrobna svojstva (Sudjana i sur., 2009; Markin i sur., 2003), uključujući antibakterijsko (Owen i sur., 2003) i antivirusno djelovanje (Fredrickson, 2000). Visok sadržaj oleuropeina, i drugih fenolnih spojeva identificiranih u ekstraktu može pridonijeti njihovom antimikrobnom djelovanju (Pereira i sur., 2007). Hidroksitirosol i oleuropein su fenolni spojevi za koje je dokazano da sprječavaju ili odgađaju stopu rasta nekoliko patogena, koji uzrokuju infekcije dišnog i probavnog sustava (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio alginolyticus*) (Bisignano i sur., 1999), a antimikrobnu aktivnost pokazala je i kavina kiselina (Lee i Lee, 2010). Oleuropein smanjuje visoki krvni tlak, ali i ima ulogu u sprječavanju pojave visokog krvnog tlaka. Djeluje tako da opušta krvne žile, također sprječava nakupljanje plaka na površini krvnih žila koji dovodi do ateroskleroze. Mnoga istraživanja dokazala su da ekstrakt maslinova lista ima hipotenzivni učinak (Zarzuelo i sur., 1991; Cherif i sur., 1996; Khayyal i sur., 2002). Postoje razni modeli mehanizama hipotenzivne aktivnosti maslinovih listova. Prema Zarzuelo i sur. (1991), oleuropeozid je komponenta odgovorna za vazodilatacijsku aktivnost, Petkov i Manolov (1972) utvrdili su da se hipotenzivni učinak maslinovih listova pripisuje oleuropeinu te je također dokazano da triterpenske kiseline (oleanolna i ursolna kiselina) iz maslinovih listova sprječavaju porast krvnog tlaka (Somova i sur., 2003). Scheffler i sur. (2008) dokazali su da maslinovi listovi djeluju kao ACE inhibitori, što znači da inhibiraju aktivnost angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE), čime se sprječava pretvorba angiotenzina I u angiotenzin II. Na taj način se postiže vazodilatacijski učinak te dolazi do smanjenja krvnog tlaka.

Mnogi čimbenici poput klime, genetskih faktora, temperature i postupaka ekstrakcije, pridonose raznolikosti u kemijskom sastavu ekstrakata maslinovih listova (Ryan i sur., 1998). Okolišni čimbenici imaju velik utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva. Utvrđeno je da temperatura zraka, temperatura tla, ukupna radijacija i intenzitet svjetlosti, utječu na koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidativnu enzimsku aktivnost (Roussos i sur., 2007). Roussos i sur. (2007) su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju sadržaja ukupnih fenola s

navedenim okolišnim čimbenicima. Okolišni stres, kao što je UV zračenje i relativno visoke temperature koje su tipične za područje Mediterana, potiču sekundarni metabolizam u voću i povrću, uključujući i masline (Žanetić i sur., 2011).

U ovom istraživanju, ukupna koncentracija fenola varirala je od 52,62-72,20 mg galne kiseline/g suhe tvari. Najveću ukupnu koncentraciju fenola u listovima (72,20 mg galne kiseline/g suhe tvari) imao je kultivar Oblica, a najmanju koncentraciju fenola imao je kultivar Lastovka (52,62 mg galne kiseline/g suhe tvari). Koncentracija ukupnih fenola u listovima razlikuje se s obzirom na kultivare maslina i korišteno ekstrakcijsko otapalo (Gotovac, 2012). Također, Molina Alcaide i Nefzaoui (1996) dokazali su da koncentracija ukupnih fenola u svježim listovima varira ovisno o kultivaru.

Osim o genetskim faktorima, sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu mijenja se ovisno o korištenim metodama ekstrakcije i pripremi biljnog materijala. Ukupna koncentracija fenola razlikuje se u suhim i svježim listovima maslina, što pokazuje da sušenje ima značajan utjecaj. Ukupna koncentracija fenola suhih listova maslina bila je veća u odnosu na svježe (Boudhrioua i sur., 2009). U listovima kultivara Chemlali, koncentracija fenola povećana je s 1,38±0,02 (svježi listovi) na 2,13±0,29 (listovi sušeni na 40°C) i 5,14±0,60 g kavine kiseline/100g suhe tvari (listovi sušeni na 70°C). Ukupni sadržaj flavonoida i fenola značajno je viši u ekstraktima ekstrahiranim 80%-tnom etanolnom, butanolom i etilacetatom nego heksanom, kloroformom i vodom. Koncentracija ukupnih flavonoida i fenola u 80%-tnom etanolnom ekstraktu maslinovog lista je 148 mg TAE/g (Lee i sur., 2009). Prema Gotovac (2012), metanolni i etanolni ekstrakti bili su najbogatiji fenolnim spojevima, te su stoga pokazali i bolju antioksidativnu aktivnost od vodenih ekstrakata.

Koncentracija oleuropeina u alkoholnim ekstraktima također je bila znatno veća, nego u vodenim ekstraktima. Najveća količina oleuropeina pronađena je u metanolnom, odnosno etanolnom ekstraktu Lastovke (Gotovac, 2012). Statistički je dokazana povezanost između sadržaja oleuropeina u ekstraktima i njihove antioksidativne aktivnosti, što je dokaz velikog doprinosa ovog fenolnog spoja antioksidativnim svojstvima listova masline (Gotovac, 2012). Mujić i sur. (2011) su utvrdili značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije fenola u ekstraktu lista masline i ukupne antioksidativne aktivnosti (kultivari Rošinjola, Buža i Istarska bjelica). U ovom istraživanju dobivena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ($r^2$=0,75).

Askorbinska kiselina je jedan od važnih ne-fenolnih antioksidanasa prisutnih u listovima maslina. Sadržaj askorbinske kiseline u voću i povrću ovisi o različitim faktorima kao što su razlike u genotipu, klimatski uvjeti tijekom uzgoja, različiti načini berbe i uvjeti

skladištenja (Lee i Kader, 2000). Kultivari maslina su se međusobno statistički značajno razlikovali u odnosu na koncentraciju askorbinske kiseline. Koncentracije askorbinske kiseline u listovima kretale su se od 6,51 do 7,95 mg askorbinske kiseline/g svj.tv., pri čemu je najveću koncentraciju imao kultivar Rošinjola, a najmanju Oblica. U ovom istraživanju dobivena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije askorbinske kiseline i ukupne antioksidativne aktivnosti ($r^2$=0,61). U istraživanju koje su proveli Bahorun i sur. (2004) na povrću (brokula, cvjetača, kupus, zelena salata, mrkva, rajčica, crveni luk), dokazano je da nema značajne korelacije između koncentracije askorbinske kiseline i antioksidativne aktivnosti, dok su Kalt i sur. (1999) dokazali su da askorbinska kiselina čini mali doprinos (0,4-9,4%) ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti u voću.

Provedeno istraživanje pokazuje da su listovi četiri autohtona kultivara maslina bogat izvor polifenolnih spojeva sa snažnim antioksidativnim djelovanjem, pri čemu su listovi kultivara Oblica imali najveću antioksidativnu aktivnost i ujedno i najveću koncentraciju ukupnih fenola, što pokazuje da je ekstrakt lista kultivara Oblica ima najveći potencijal kao prirodni dodatak prehrani.

# 5. ZAKLJUČCI

- Ukupna antioksidativna aktivnost bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom ukupnih fenola u listova istraživanih kultivara maslina te s koncentracijom askorbinske kiseline.

- Koncentracije ukupnih fenola, askorbinske kiseline te vrijednosti ukupne antioksidativne aktivnosti su kultivar specifične.

- Ekstrakt lista kultivara Oblica pokazuje najveći potencijal kao prirodni dodatak prehrani budući da ima najveću antioksidativnu aktivnost i najveću koncentraciju ukupnih fenola koji iznimno povoljno djeluju na zdravlje ljudi i životinja.

# 6. LITERATURA

Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. 2007. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1306–1312.

Al-Azzawie HF, Alhamdani MSS. 2006. Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Oleuropein in Alloxan-diabetic Rabbits. *Life Sci* 78: 1371-1377.

Alba V, Montemurro C, Sabetta W, Pasqualone A, Blanco A. 2009. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. *Sci Hort* 123:11-16.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA 90*: 7915-7922.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for Testing Antioxidant Activity. *The Analyst* 127: 183-198.

Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317-325.

Asada K. 1994. Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker NR, Bowyer JR, eds. *Photoinhibition of photosynthesis*. *From molecular mechanisms to the field*. Oxford: *Bios Scientific Publishers* 129-142.

Atiok E, Bayçin D, Bayraktar O, Ülkü S. 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibrion. *Separation and Purification Technol* 62: 342–348.

Aytul KK. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications, doktorska disertacija; http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/

Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crosier A, Aruoma OI. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agric* 84: 1553-1561.

Bakarić P., 2002. Sorte maslina Dubrovačkog primorja. *Alfa 2,* Dubrovnik

Bakarić P. 2005. Autohtone sorte masline poluotoka Pelješca. *Alfa 2,* Dubrovnik

Baldoni L, Cultrera NG, Mariotti R, Ricciolini C 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol Breed* 24: 213-231.

Belaj A, ŠatoviĆ Z, Trujillo I, and Rallo L. 2004. Genetic Relationships of Spanish Olive Cultivars Using RAPD Markers. *Hort Sci* 39(5): 948-951.

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

Benčić Đ, Cukon J, Gunjača J. 2009. Morfološka različitost fenotipova masline (*Olea europaea* L.) lokalnog naziva „Bjelice“ u Istri. *Sjemenarstvo* 26: 1-2.

Benčić Đ, Lolić T, Šindrak Z. 2009. Morfološka različitost fenotipova masline (*Olea europaea* L.) sorte Lastovka sjeverozapadnog dijela otoka Korčule. *Sjemenarstvo* 26: 3-4.

Benčić Đ, Cantore A, Bolarić S. 2011. Pomometrijska i genetička analiza genotipova Maslina od Luna. 46. hrvatski i 6. međunarodni simopozij agronoma, Opatija.

Benderitter M, Maupoil V, Vergely C, Dalloz F, Rochette L. 1998. Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. *Fund Clin Pharmacol* 12: 510-516.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. 2007. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules* 12: 1679-1719.

Bianco A, Uccella N. 2000. Biophenolic components of olives. *Food Res Int* 33: 475–485.

Bisignano G, Tomaino A, La Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A, 1999. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 51: 971-974.

Biško A, Gašparec Skočić LJ, Ivanović A, Ruano Bonilla S. 2011. Sorte masline i norme sadnice pogodne za uzgoj u gustom sklopu. *Sjemenarstvo* 28: 3-4.

Boudhrioua N, Bahloul N, Slimen IB, Kechaou N. 2009. Comparison of the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products* 29: 412–419.

Carriero F, Fontanazza G, Cellini F Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 104: 301-307.

Casado FJ, Sánchez AG, Rejano L, De Castro A, Montańo A.2010. Stability of scorbic and ascorbic acids in packed green table olives during long-term storage as affected by different packing conditions, and its influence on quality parameters. *Food Chem* 122: 812–818.

Cherif S, Rahal N, Haouala M, Hizaoui B, Dargouth F, Gueddiche M. 1996. A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J Pharm Belg* 51:69-71.

Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor Appl Genet* 104: 223-228.

Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. 1999. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.

Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15: 7313-7352.

De la Rosa, C, James M, Tobutt KR. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol Ecol Notes* 2: 265–267.

Dourtoglou VG, Mamalos A, Makris DP. 2006. Storage of olives (*Olea europaea*) under $CO_2$ atmosphere: Effect on anthocyanins, phenolics, sensory attributes and in vitro antioxidant properties. *Food Chem* 99: 342–349.

Fabbri A, Hormaza JL, Polito VS. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 120: 538–542.

Faiza I, Wahiba K, Nassira G, Chahrazed B, Atik FB. 2011. Antibacterial and antifungal Activities of olive *(Olea europaea* L.) from Algeria. *J Microbiol Biotech Res* 1 (2): 69-73.

Fares R, Bazzi S, Baydoun SE, Abdel-Massih RM. 2011. The Antioxidant and Anti-proliferative Activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract. *Plant Foods Hum Nutr* 66: 58–63.

Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, Bastos ME, Pereira JA. 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem* 103: 188–195.

Foyer CH. 1993. Ascorbic acid. In: Alscher RG, Hess JL, eds. Antioxidants in higher plants. *Boca Raton: CRC Press* 31-58.

Fredrickson WR. 2000. Method and composition for antiviral therapy with olive leaves. U.S. patent. 6: 117,844.

Galli C, Visioli F. 1999. Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olives/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. *Lipids* 34: 23-26.

Gilani A, Khan A, Shah A, Connor J, Jabeen Q. 2005. Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. *Int J Food Sci Nutr* 56(8): 613–620

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

Gotovac M, 2012. Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj oleuropeina i antioksidacijska svojstva ekstrakta lišća masline, završni rad-diplomski/integralni studij, Prehrambeno tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu: 63 str.

Grković I. 2005. Olive growing and tourism. *Pomol cro* 11: 1-2.

Gucci R, Lombardini L, Tattini M. 1997. Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol* 17: 13–21.

Gugić J, Strikić F, Perica S, Čmelik Z, Jukić LJ. 2007. Production of olive planting material in the Republic of Croatia. *Pomol cro* 13: 4.

Hayes JE, Allen P, Brunton N, O'Grady MN, Kerry JP. 2011. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem* 126: 948–955.

Hollman PC, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37: 937-942.

Japón-Luján R, Luque-Rodríguez J, Luque de Castro M. 2006. Dynamic ultrasoundassisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J Chromatogr A* 1108: 76–82.

Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior R, 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 47: 4638–4644.

Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramovič H, Miloš M, Ljubenkov I, Piskernik S, Pezo I, Terpinc P, Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem* 119: 715–723.

Kaur C, Kapoor HC. 2001. Antioxidant in fruits and vegetables – the millennium's health. *J Food Sci Tech* 36: 703-735.

Kähkőnen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954-3962.

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH. 2002. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*. 52 (11):797-802.

King A, Young G. 1999. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 99:213-218.

Knox YM, Suzutani T, Yosida I, Azuma M. 2003. Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res* 17: 120-122.

Kovačević I, Perica S. 1994. Suvremeno maslinarstvo. Avium. Split, 114 str.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ionreducing ability. *Biochem Pharmacol* 42: 1673-1681.

Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT, Huang PL. 2003. Anti-HIV Activity of Olive Leaf Extract (OLE) and Modulation of Host Cell Gene Expression by HIV-1 Infection and OLE Treatment *Biochem Biophys Commun* 307: 1029-1037.

Lee SK, Kader AA. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 20: 207–220.

Lee OH, Lee BY, Lee J, Lee HB, Son JY, Park CS, Shetty K, Kim YCh. 2009. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bio Techn* 100: 6107–6113.

Lee OH, Lee BY. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bio Technol* 101: 3751–3754.

López-López A, Montaño A, Cortés-Delgado A, Garrido-Fernández A. 2008. Survey of Vitamin B6 Content in Commercial Presentations of Table Olives. *Plant Foods Hum Nutr* 63: 87–91.

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 378.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiméenez L. 2008. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747.

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

Mazziotti A, Mazziotti F, Pantusa M, Sportelli L, Sindona G. 2007. Pro-oxidant activity of oleuropein in vitro by electron spin resonance spin-trapping methodology. *J Agric Food Chem* 54 (20): 7444-7449.

Mencuccini AM, Baldoni L 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 98(3-4): 411-421.

Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A. 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res* 66: 129–136.

Milotić A, Šetić E, Peršurić Đ, Poljuha D, Sladonja B, Brščić K. 2005. Identification and characterization of autochthonous olive varieties in Istria (Croatia). *Annales Ser Hist Nat* 15: 251–256.

Miljković I. 1991. Suvremeno voćarstvo. Znanje, Zagreb: 547 str.

Miyake C, Asada K. 1992. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. *Plant Cell Physiol* 33:541-553.

Molina Alcaide E, Nefzaoui A. 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *Int Biodeterior Biodegrad* 96: 227–235.

Mujić I, Živković J, Nikolić G, Vidović S, Trutić N, Kosić U, Jokić S, Ruznić A. 2011. Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract as a Source of Useful Antioxidants. *Cro J Food Technol Biotechnol Nutr* 6 (3-4): 129-133.

Mylonaki S, Kiassos E, Makris DP, Kefalas P. 2008. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem* 392:977–985.

Naidu KA. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery. *Nutr J* 2:7.

Nicholson RL, Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30: 369-389.

Oviasogie PO, Okoro D, Ndiokwere CL. 2009. Determination of total phenolic amount of some edible fruits and vegetables. *Afr J Biotechnol* 8 (12): 2819-2820.

Owen RW, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B; Bartsch H. 2003. The isolation, structural elucidation and antioxidant potential of the major phenolic compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol* 41: 703-717.

Ozimec R, Karoglan Kontić J, Matotan Z, Strikić F. 2009. Poljoprivredna bioraznolikost Dalmacije (projekt Coast), 244 str.

Pelicarić V, Bjeliš M, Radunić D. 2005. Integrated olive protection. *Pomol cro* 11: 1-2.

Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. *Cv.* Cobrançosa) Leaves. *Molecules* 12: 1153-1162.

Petkov V, Manolov P. 1972. Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein. *Arzneimittelforschung* 22: 1476-86.

Pevalek-Kozlina B. 2002. *Fiziologija bilja*. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Profil International, Zagreb, 179 str.

Poljuha D, Sladonja B, Šetić E, Milotić A, Bandelj D, Jakše J, Javornik B. 2008. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Sci Hort* 115: 223–230.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol* 90: 494-507.

Rallo P, Dorado G, Martın A. 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 101: 984–989.

Rautenkranz AAF, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ. 1994. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves. *Plant Physiol* 106: 187-193.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res* 22: 375–383.

Roubos K, Moustakas M, Aravanopoulos FA. 2010. Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. *Genet Mol Res* 9 (3): 1865-1876.

Roussos PA Matsoukis A, Pontikis CA, Chronopoulou-Sereli A. 2007. Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants. *Sci Hort* 113: 100-102

Ryan D, Robards K. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123: 31–44.

Saito K. 1996. Formation of L-ascorbic acid and oxalic acid from D-glucosone in *Lemna minor*. *Phytochem* 41: 145-149.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306.

Scheffler A, Rauwald HW, Kampa B, Mann U, Mohr FW, Dhein S. 2008. *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca($^{2+}$) channel antagonistic effects. *J Ethnopharmacol* 120: 233-240.

Shi H, Noguchi N, Niki E. 2001. Introducing natural antioxidants. In J. Pokorny et al. Antioxidants in food: practical applications. *Woodhead Publishing Ltd.* pp 147-158.

Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hradolin AR, Simoni M, Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89: 191–198.

Smirnoff N. 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Ann Bot* 78: 661-669.

Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. *J Ethnopharmacol* 84: 299–305.

Strikić F. 2005. Morfološka i genetska varijabilnost masline (*Olea europaea* L.) sorte Oblica. Doktorska disertacija, Zagreb: 142 str.

Strikić F, Bandelj Mavsar D, Perica S, Čmelik Z, Šatović Z, Javornik B. 2010. Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Oblica detected using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Afr J Biotechnol* 9(20) : 2880-2883.

Strikić F, Čmelik Z, Šatović Z, Perica S. 2007. Morphological variety of the olive cultivar Oblica (*Olea europaea* L.). *Pomol cro* 13: 2.

Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV, Hammer KA. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents* 33: 461–463

Šatović Z, Liber Z, Belaj A, Radosavljević I, Šindrak Z, Benčić Đ. 2011. Genetska raznolikost hrvatskih kultivara maslina. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu: 99 str.

Šimunović V. 2005. State of olive growing and oil production in the Republic of Croatia. *Pomol cro* 11: 1-2.

Urquiaga I, Leighton F. 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Bio Res* 33: 89-96.

Vischiot S. 2004. *Maslinarstvo u vrtu i voćnjaku.* Publikum, Zagreb: 60 str.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 60–64.

Wang H, Cao G, Prior RL. 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705.

Zadro B, Perica S. 2007. *Maslina i maslinovo ulje A-Ž.* Naklada Zadro, Zagreb: 279 str.

Zarzuelo A, Duarte J, Jiménez, González M, Utrilla MP. 1991. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med* 57(5): 417-419.

Zhang FQ, Shi ZX, Shen ZG. 2003. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplast to cadmium toxicity. *J Plant Nutr* 26: 1779-1788.

Žanetić M, Gugić M. 2006. Health values of olive oil. *Pomol cro* 12: 2.

Žanetić M, Škevin D, Vitanović E, Jukić Špika M, Perica S. 2011. Survey of phenolic compounds and sensorial profile of Dalmatian virgin olive oils. *Pomol cro* 17: 1-2.

WEB 1 www.kew.org/plants-fungi/Olea-europaea.htm (14.10.2012.)

WEB 2 http://waynesword.palomar.edu/ecoph17.htm (14.10.2012.)

WEB 3 www.ezadar.hr (15.10.2012.)

WEB 4 http://www.ssblato.hr/Vis%202003/maslina.htm (15.10.2012.)

WEB 5 http://www.iptpo.hr (15.10.2012.)

WEB 6 http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.php (15.10.2012.)