مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (2) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (2) 2018

استخلاص وتقدير المركبات الفينولية في أوراق الزيتون الجافة باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية

د. فاتن شومان*
مايا سامي الجندي**

(تاريخ الإيداع 14 / 1 / 2018. قُبِل للنشر في 27 / 3 /2018)

□ ملخّص □

تمت دراسة البولي فينولات الكلية في أوراق الزيتون التي جمعت من محافظة اللاذقية (منطقة القرداحة) حيث تم استخلاص المركبات الفينولية من أوراق الزيتون المجففة باستخدام طريقتي استخلاص وهما طريقة الاستخلاص بالنقع وطريقة الاستخلاص باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية، وقد تم في كل من الطريقتين دراسة تأثير تركيز مذيب الاستخلاص حيث تم الاستخلاص باستخدام مزيج الإيتانول – الماء بنسب مختلفة (60,70,80%) وكذلك تمت دراسة تأثير درجة حرارة الاستخلاص في كلا الطريقتين (20,30,40°C) بالإضافة إلى دراسة تأثير زمن الاستخلاص.

ففي طريقة الاستخلاص بالنقع تمت دراسة كمية البولي فينولات الكلية في أوراق الزيتون المجففة بعد استخلاصها خلال أزمنة مختلفة (24,48,72 h)، أما في طريقة الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية فكانت أزمنة الاستخلاص هي (10,20,30 min).

بينت الدراسة أن أعلى كمية من المركبات البولي فينولية كانت موجودة في أوراق الزيتون الجافة التي تم استخلاصها بالموجات فوق الصوتية بتركيز المذيب ايتانول – ماء 80% وبدرجة الحرارة 40°C وبزمن الاستخلاص 20min.

الكلمات المفتاحية : البولي فينولات، الاستخلاص، الموجات فوق الصوتية، أوراق الزيتون.

* أستاذ – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
** طالبة ماجستير – قسم الكيمياء التحليلية – كلية العلوم – جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (2) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (2) 2018

Extraction and Determination of Polyphenols in Dry Olive Leaves using Ultrasound Apparatus

Dr.Faten Chouman*
Maya S Aljindy**

(Received 14 / 1 / 2018. Accepted 27 / 3 /2018)

□ ABSTRACT □

Total Polyphenol was studied in olive leaves collected from Lattakia area (AlQurdaha zone), where Phenolic compounds were extracted from dry Olive leaves by using two extraction methods: maceration and Ultrasonic Device. By the both two methods a study was carried out on the extraction solvent concentration effect where the extraction was done by using the mixture of Ethanol-Water with different percentages (60,70,80 %). As well, The extraction temperature effect was studied at the both methods at (20,30, 40°C); in addition to the study of the extraction time effect.

At the method of Maceration Extraction, the total polyphenols amount was studied in dry olive leaves after extraction during different times (24,48,72 h). While at the Ultrasonic Extraction the times were (10,20,30 min).

The study showed that the highest amount of phenolic compounds were existed in dry olive leaves which were extracted by Ultrasonic Waves with the concentration of the solvent ethanol-water 80%, temperature of 40°C, and with an extraction time of 20min.

Key words: Polyphenols, Extraction, Ultrasound, Olive Leaves.

*Prof. Faten Chouman: Prof. Department of Chemistry – Faculty of Science – Tishreen University.
**Maya S Aljindy: Student at master degree - Department of Analytical Chemistry - Faculty of Science- Tishreen University.

مقدمة :

شجرة الزيتون هي شجرة دائمة الخضرة ذات أوراق متطاولة، توجد في بلدان البحر الأبيض المتوسط منذ أكثر من 7000 سنة، وتحتوي مناطق البحر الأبيض المتوسط حوالي 98% من أشجار الزيتون المزروعة في العالم [1].

دُرِس الزيتون على نطاق واسع لما له من استخدامات غذائية هامة، فثمرة الزيتون وزيت الزيتون مكونات هامة في النظام الغذائي اليومي للكثير من سكان العالم [2].

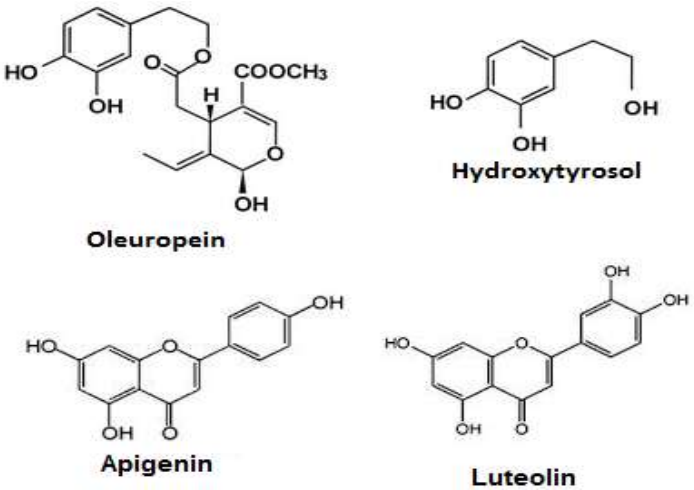
تعد أوراق الزيتون واحدة من المنتجات الثانوية لزراعة الزيتون، وهي تتراكم أثناء تقليم الأشجار (حوالي 25 كيلوغرام من المنتجات الثانوية "أغصان وأوراق" لكل شجرة سنوياً)، ويمكن العثور عليها بكميات كبيرة في صناعات زيت الزيتون بعد فصلها عن الثمار قبل المعالجة (حوالي 10% من وزن الزيتون) [3].

أظهرت العديد من الدراسات أن لأوراق الزيتون نشاط مضاد للأكسدة [4] وخصائص مضادة لفيروس نقص المناعة البشرية [5] وكذلك تأثير وقائي ضد سرطان الدم البشري [6]، بالإضافة إلى النشاط الخافض للشحوم [7] ...إلخ.

اكتسبت أوراق الزيتون في الآونة الأخيرة المزيد من الاهتمام في الأوساط العلمية، كعلاج شعبي، وقد تم استخدامها لمكافحة الملاريا، والحمى، والأمراض الأخرى، كما تم تسويق مستخلصات أوراق الزيتون في بعض البلدان كمكملات غذائية على شكل كبسولات، وشراب [8]، ويعود ازدياد الاهتمام بأوراق الزيتون في السنوات الأخيرة إلى احتوائها على تراكيز عالية من المركبات الفينولية [9].

تتفاوت كمية ونوعية المركبات الفينولية الموجودة في ثمار وأوراق الزيتون تبعاً لعملية النضج والنمو، كما أثبتت الدراسات أن بولي فينولات أوراق الزيتون هي مركبات نشطة بيولوجياً [10].

تحتوي أوراق الزيتون على العديد من البولي فينولات ذات الفعالية الدوائية المهمة، المركب الأكثر وفرة في مستخلصات أوراق الزيتون هو الأوليوروبين Oleuropein، يليه الهيدروكسي تيروزول Hydroxytyrosol، ثم الفلافونات –7 السكرية من الليتيولين والأبيجينين الشكل (1)، والفيرباكوسايد بالإضافة إلى التربينات الثلاثية كحمض الأوليانوليك والفلافونيدات (الروتين والديوسمين) [11].



الشكل (1): الصيغة الكيميائية للأوليوروبين والهيدروكسي تيروزول والأبيجينين والليتيولين

يعتمد فصل وتحديد البولي فينولات من النباتات والأعشاب والتوابل وغيرها في الغالب على مذيب الاستخلاص والتقنية المستخدمة في هذه العملية.

تم استخدام عدة تقنيات لاستخلاص المركبات الفينولية من النباتات مثل الميكروويف، والموجات فوق الصوتية، والاستخلاص باستخدام جهاز السوكسيليت [12].

تستغرق الأساليب التقليدية لاستخراج مضادات الأكسدة من المواد النباتية وهي بشكل أساسي النقع والاستخلاص بجهاز السوكسليت وقتاً طويلاً جداً وتتطلب كميات كبيرة نسبياً من المذيبات العضوية السامة، ولقد وجدت طريقة الاستخلاص بجهاز الموجات فوق الصوتية لتكون وسيلة أكثر فعالية وتقنية صديقة للبيئة لاستخلاص مضادات الأكسدة الطبيعية من المواد النباتية بسبب خصائصه من زمن استخلاص أقل واستخدام أقل من المذيبات العضوية [13].

أظهرت الدراسات الحديثة أن الاستخلاص باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية يمكن أن يعزز كفاءة الاستخلاص من خلال الفجوة الصوتية وبعض التأثيرات الميكانيكية.

يمكن أن تسبب الفجوة الصوتية خللاً في جدران الخلايا تسهل تغلغل مذيب الاستخلاص إلى المادة النباتية وتسمح باستخلاص المنتج من داخل الخلايا، هناك تأثير آخر ميكانيكي ينجم عن الموجات فوق الصوتية أيضاً هو تسخين المذيبات المستخدمة للاستخلاص، وزيادة مساحة سطح التلامس بين المذيبات والمركبات المستهدفة من خلال السماح باختراق أكبر كمية ممكنة من المذيبات في داخل العينة، تتطلب أيضاً تقنية الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية زمن استخلاص أقصر وكمية أقل من المذيبات، كما يمكن إجراء الاستخلاص باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية بدرجات حرارة منخفضة الأمر الذي يجنب المستخلصات الضرر الحراري ويقلل الخسائر في المركبات النشطة بيولوجياً [14].

في الدراسة الحالية، من أجل تحقيق أقصى قدر من استخلاص المركبات البولي فينولية كمركبات مضادة للأكسدة من أوراق الزيتون الجافة باستخدام الموجات فوق الصوتية، تم التحقق من تأثير العديد من المتغيرات مثل نسبة المذيب إيتانول/ماء، زمن الاستخلاص، ودرجة الحرارة على كمية البولي فينولات المستخلصة، بالإضافة إلى ذلك، ومن أجل تأكيد كفاءة الاستخلاص، أجريت أيضاً مقارنة بين طريقة الاستخلاص باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية وطريقة النقع.

أهمية البحث أهدافه:

تنبع أهمية البحث من الاهتمام المتزايد الذي ظهر في الآونة الأخيرة من الباحثين في استخدام التقنيات الحديثة لاستخلاص المركبات الفعالة من النباتات عموماً ومن أورق الزيتون بشكل خاص، حيث أثبتت الدراسات الحديثة أهمية ودور أوراق الزيتون في الوقاية والعلاج من العديد من الأمراض كأمراض الضغط والسكري وغيرها، ومن التقنيات المستخدمة في استخلاص المركبات البولي فينولية من أوراق الزيتون جهاز الموجات فوق الصوتية، وتكمن الفائدة العملية لاستخدام هذا الجهاز في اختصار زمن الاستخلاص والتقليل من استهلاك المذيبات العضوية .

ويمكن تلخيص أهداف البحث بما يلي:

1- استخلاص المركبات البولي فينولية من أوراق الزيتون المجففة بطريقة أكثر اقتصادية من حيث الوقت والكلفة المادية.

2- دراسة تأثير كل من تركيز المذيب ودرجة حرارة الاستخلاص وزمن الاستخلاص على كمية المركبات البولي فينولية المستخلصة.

3- المقارنة بين كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون المجففة بطريقتين (النقع وجهاز الموجات فوق الصوتية).

طرائق البحث ومواده

1. تحضير العينات:

تم جمع أوراق الزيتون من نوع الخضيري المقطوف من مدينة اللاذقية-القرداحة خلال فترة قطاف الزيتون في شهر تشرين الأول 2016 لتحديد الشروط التجريبية لطرائق استخلاص المركبات الفينولية.

تم غسل أوراق الزيتون وتجفيفها في الظل، ثم تم طحنها لتصبح مسحوق ناعم وتم حفظها في الثلاجة بدرجة حرارة 4°C لحين الاستخدام.

2. الكواشف والمواد المستخدمة:

كاشف فولن سيوكالتيو Folin-Ciocalteu (مزيج من الفوسفومولبيدات والفوسفوتنغستات)، إيتانول مطلق، ماء مقطر، حمض الغاليك (وزنه الجزيئي 170.12، (titration) 97.5-102.5%)، هكسان (وزنه الجزيئي 86.18 وتركيزه 95%)

3. الاستخلاص:

تم نقع أوراق الزيتون المجففة المطحونة في الهكسان للتخلص من الكلوروفيل والدهون الموجودة فيها.

1.3. الاستخلاص بالنقع:

نقعت (5g) من أوراق الزيتون المجففة في (100ml) من المذيب إيتانول - ماء (60,70,80%) لمدة (24,48,72 h) بدرجات الحرارة التالية (20,30,40°C) مع التحريك المستمر باستخدام المحرك المغناطيسي، رشحت العينة باستخدام ورق الترشيح واتمان، وبعد ذلك ركزت الخلاصة الناتجة باستخدام المبخر الدوار، ومن ثم حفظت الخلاصة المركزة في الثلاجة بدرجة حرارة (4°C).

2.3. الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية:

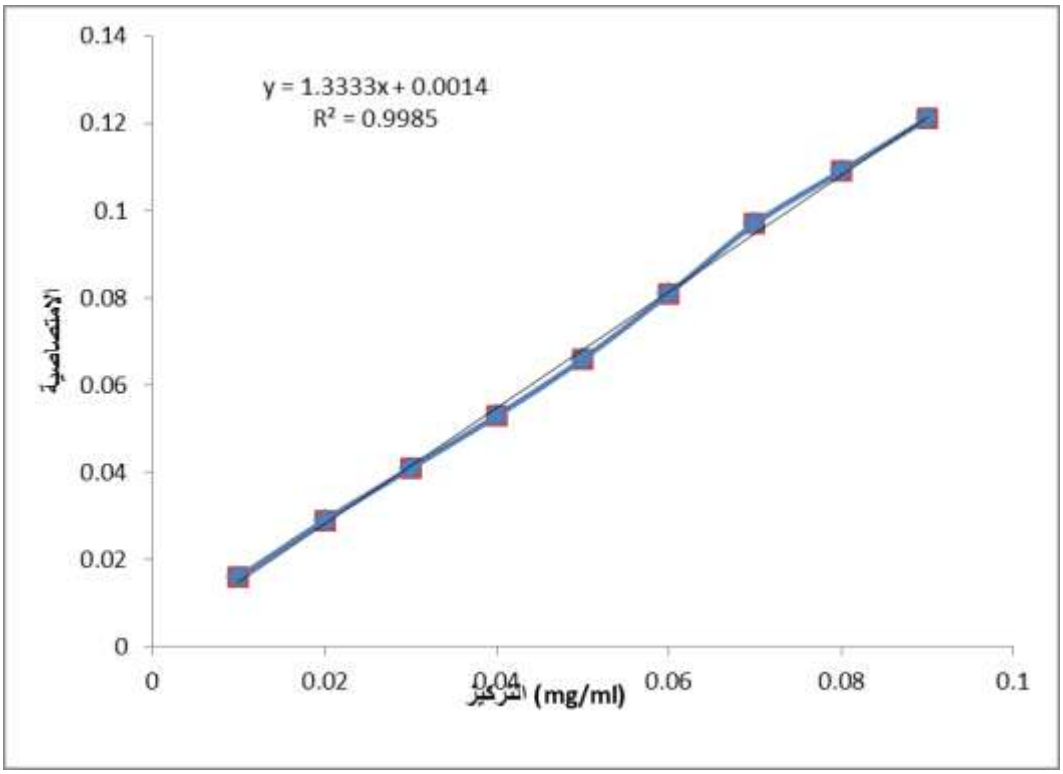
وضعت (5g) من أوراق الزيتون المجففة في (100ml) من المذيب إيتانول - ماء (60,70,80%) في حمام مائي في جهاز الموجات فوق الصوتية لمدة (10,20,30 min) بدرجات الحرارة التالية (20,30,40°C)، رشحت العينة باستخدام ورق الترشيح واتمان، وبعد ذلك ركزت الخلاصة الناتجة باستخدام المبخر الدوار، ومن ثم حفظت الخلاصة المركزة في الثلاجة بدرجة حرارة (4°C).

4. تحديد كمية البولي فينولات الكلية:

مزج (1 ml) من الخلاصة الممدة (1:50) بالماء المقطر مع (0,5 ml) من كاشف Folin-Ciocalteu. أضيفت إليها (1,25 ml) من محلول كربونات الصوديوم المائي (200 mg/g) بعد مرور (5min) لتعديل درجة الحموضة والحصول على وسط قلوي، رجّت العينات ووضعت بدرجة حرارة (30°C) لمدة (90min).

تم تسجيل امتصاصية المزيج الأزرق اللون الناتج عند طول موجة (760 nm) مقابل عينة بلانك تحتوي على (1 ml) من الماء المقطر، (0,5 ml) من كاشف F–C، و (1,25 ml) من محلول كربونات الصوديوم المائي (200 mg/g) .

تم رسم المنحني العياري لحمض الغاليك (الامتصاصية بدلالة التركيز) بتراكيز تتراوح بين (0,01–0,09mg/ml):



شكل (2). المنحني العياري لامتصاصية سلسلة قياسية من حمض الغاليك بدلالة التركيز

حيث تم إنجاز جميع القياسات للمستخلصات المستحصل عليها من طريقتي الاستخلاص بحسب طريقة (Chammen et al,2015) [15]، و قدرت كمية البولي فينولات الكلية على أساس عدد الميلي غرامات من البولي فينولات المكافئة لحمض الغاليك لكل غرام من وزن العينة الجافة (mgGAE/g Dry powder).

تم استخدام حمض الغاليك لأنه أصغر البولي فينولات

النتائج المناقشة:

1. كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة النقع:

تم استخدام (5g) من مسحوق أوراق الزيتون الجافة التي استخلصت باستخدام المذيب إيتانول–ماء بطريقة النقع للمعايرة باستخدام كاشف F–C، وكانت كمية البولي فينولات الكلية في أوراق الزيتون الجاف اعتماداً على حمض الغاليك العياري كما في الجدول (1) حيث تم الحصول على أعلى كمية للبولي فينولات الكلية من أوراق الزيتون المستخلصة بطريقة النقع بدرجة حرارة (40°C) وزمن استخلاص (24h) ونسبة إيتانول–ماء (80%)، وبلغت كمية البولي فينولات المستخلصة تحت هذه الشروط (99,0025 mgGAE/g DM).

جدول (1). كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة النقع مقدرة بـ(mgGAE/g DM ± SD)

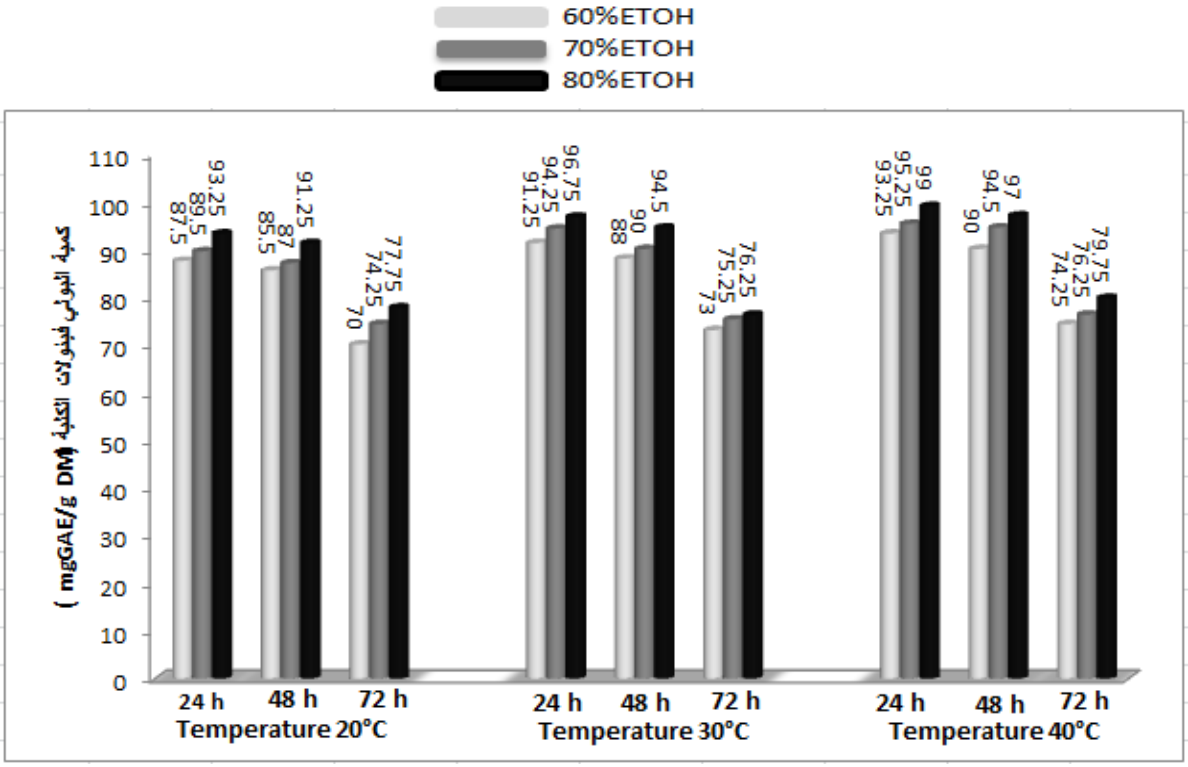
كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة النقع مقدرة بـ(mgGAE/g DM± SD*)									
ETOH%	20°C			30°C			40°C		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
60%	87,50 ±0,43	85,50 ±0,75	70,00 ±0,43	91,25 ±1,56	88,00 ±0,87	73,00 ±0,43	93,25 ±0,43	90,00 ±0,43	74,25 ±0,75
LOD**	0.97455	1.68796	0.97454	3.51377	1.949093	0.97454	0.97454	0.974547	1.68796
LOQ***	3.24849	5.62654	3.24848	11.7125	6.496977	3.24848	3.24848	3.248489	5.62654
70%	89,50 ±0,43	87,00 ±0,75	74,25 ±0	94,25 ±0,43	90,00 ±0,43	75,25 ±0,87	95,25 ±0,75	94,50 ±0,43	76,25 0,87
LOD**	0.97454	1.68796	0	0.97454	0.974547	1.94909	1.68796	0.974547	1.94909
LOQ***	3.24848	5.62654	0	3.24848	3.248489	6.49697	5.62654	3.248489	6.49697
80%	93,25 ±0,43	91,25 ±1,15	77,75 ±1,15	96,75 ±0,75	94,50 ±0,43	76,25 ±0,43	99,00 ±1,3	97,00 ±0,43	79,75 ±0,43
LOD**	0.97454	2.57840	2.57840	1.68796	0.974547	0.97454	2.92364	0.974547	0.97454
LOQ***	3.24848	8.59469	8.59469	5.62654	3.248489	3.24848	9.74546	3.248489	3.24848

*** (SD): الانحراف المعياري.**

**** (LOD): حد الكشف (mgGAE/g DM) ، تم حسابه من العلاقة** $\text{LOD}=\frac{3\times SD}{m}$.

***** (LOQ): حد التحديد الكمي (mgGAE/g DM) ، تم حسابه من العلاقة** $\text{LOQ}=\frac{10\times SD}{m}$.

كما يبين الشكل (3) أن كمية البولي فينولات الكلية تزداد مع ازدياد درجة الحرارة لتبلغ أقصى كمية عند درجة الحرارة (40°C)، ونسبة المذيب لتصل لأعلى كمية من البولي فينولات الكلية عند استخدام إيتانول–ماء بنسبة (80%)، وتنخفض مع ازدياد زمن الاستخلاص.



الشكل (3): كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة النقع مقدرة بـ (mgGAE/g DM)

2.4. كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة الموجات فوق الصوتية:

تم استخدام (5g) من مسحوق أوراق الزيتون الجافة التي استخلصت باستخدام المذيب إيتانول–ماء بطريقة الموجات فوق الصوتية للمعايرة باستخدام كاشف F–C، وكانت كمية البولي فينولات الكلية في أوراق الزيتون الجاف اعتماداً على حمض الغاليك العياري كما في الجدول (2) حيث تم الحصول على أعلى كمية للبولي فينولات الكلية من أوراق الزيتون المستخلصة بطريقة الموجات فوق الصوتية بدرجة حرارة (40°C) وزمن استخلاص (20min) ونسبة إيتانول–ماء (80%)، وبلغت كمية البولي فينولات المستخلصة تحت هذه الشروط (132,25 mgGAE/g DM).

الجدول (2): كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة الموجات فوق الصوتية مقدرة بـ(mgGAE/g DM ± SD)

كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقة الموجات فوق الصوتية النقع مقدرة بـ(mgGAE/g DM± SD*)									
ETOH%	20°C			30°C			40°C		
	10min	20min	30min	10min	20min	30min	10min	20min	30min
60%	95,50 ±0,43	104,75 ±0,43	80,75 ±0,43	98,50 ±0,43	108,75 ±0,75	86,00 ±0,43	113,75 ±0,43	127,75 ±0,87	88,25 ±0,43
LOD**	0.97454	0.97454	0.97454	0.97454	1.68796	0.97454	0.97454	1.94909	0.97454
LOQ***	3.24848	3.24848	3.24848	3.24848	5.62654	3.24848	3.24848	6.49697	3.24848
70%	103,00 ±0,43	109,25 ±0,43	83,50 ±0,43	111,00 ±0,75	114,50 ±1,15	92,75 ±0,43	118,25 ±0,87	129,5 ±0,43	102,5 ±0,87
LOD**	0.97454	0.97454	0.97454	1.68796	2.57840	0.97454	1.94909	0.97454	1.94909

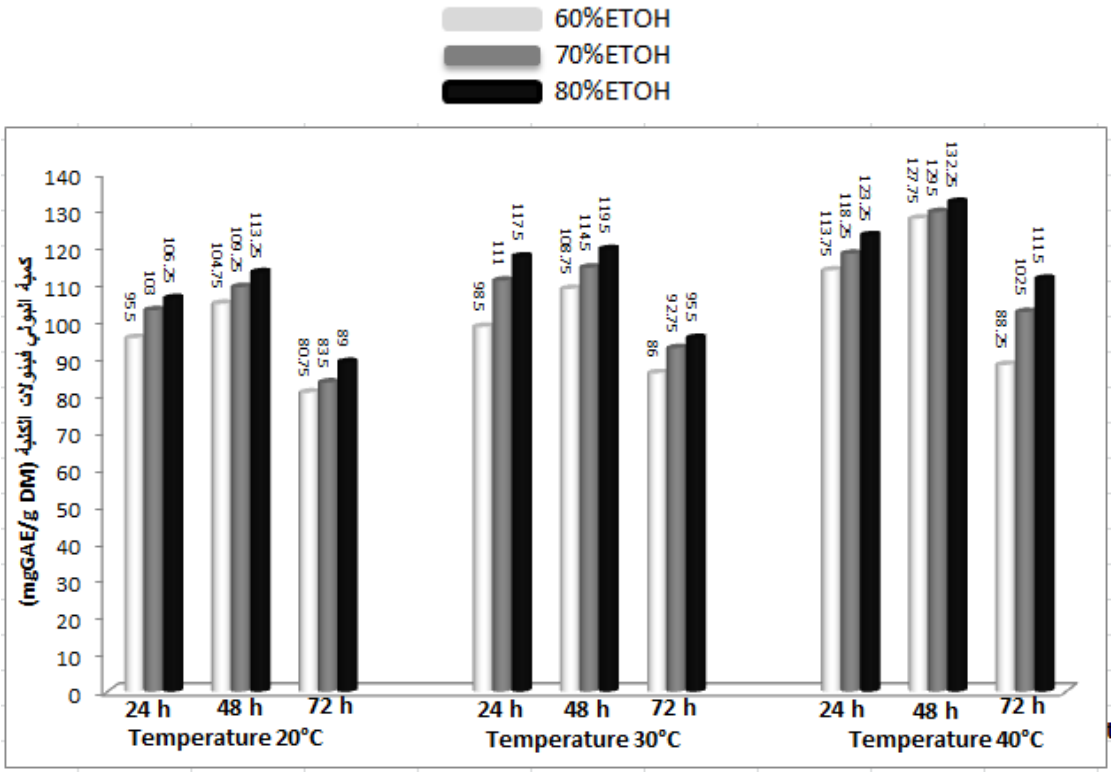
LOQ***	3.24848	3.24848	3.24848	5.62654	8.59469	3.24848	6.49697	3.24848	6.49697
80%	106,25 ±1,15	113,25 ±0,75	89,00 ±0,43	117,50 ±0,43	119,50 ±0,43	95,50 ±0,87	123,25 ±0,43	132,25 ±0,87	111,5 ±0,43
LOD**	2.57840	1.68796	0.97454	0.97454	0.97454	1.94909	0.97454	1.94909	0.97454
LOQ***	8.59469	5.62654	3.24848	3.24848	3.24848	6.49697	3.24848	6.49697	3.24848

*** (SD): الانحراف المعياري.**

**** (LOD): حد الكشف (mgGAE/g DM).**

***** (LOQ): حد التحديد الكمي (mgGAE/g DM).**

كما يبين الشكل (4) أن كمية البولي فينولات الكلية تزداد مع ازدياد درجة الحرارة لتبلغ أقصى كمية عند درجة الحرارة (40°C)، وعند ازدياد نسبة المذيب لتصل لأعلى كمية من البولي فينولات الكلية عند استخدام إيتانول–ماء بنسبة (80%)، وتزداد مع ازدياد زمن الاستخلاص حتى (20min) ثم تعود لتنخفض عند زمن استخلاص (30min).

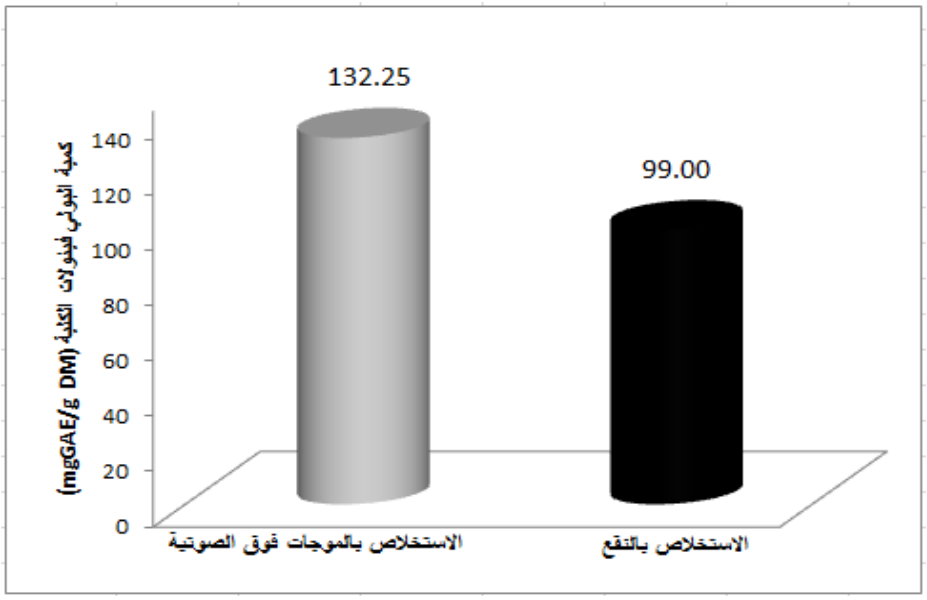


الشكل (4): كمية البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجاف بطريقة الموجات فوق الصوتية مقدرة بـ (mgGAE/g DM)

3.4. مقارنة بين كمية البولي فينولات الكلية المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بطريقتي النقع والموجات فوق الصوتية:

تمت مقارنة العينات التي تحتوي على أعلى كمية من البولي فينولات المستخلصة من أوراق الزيتون الجافة بكلا الطريقتين حيث يبين الشكل (5) أن العينات التي تم استخلاصها باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية قد أعطت

كمية بولي فينولات أعلى من العينات التي تم استخلاصها بطريقة النقع العادي ويمكن تفسير ذلك في أن الموجات فوق الصوتية تسمح للمذيب بالتغلغل بين جزيئات أوراق الزيتون وبالتالي تسمح باستخلاص كميات أعلى من البولي فينولات.



الشكل (5): مقارنة بين كمية البولي فينولات المستخلصة في طريقتي الاستخلاص (النقع والموجات فوق الصوتية)

الاستنتاجات والتوصيات:

تعد أوراق الزيتون مصدراً متوفراً ورخيصاً لمضادات الأكسدة وبشكل خاص المركبات البولي فينولية التي تساعد في معالجة العديد من الأمراض كأمراض القلب الوعائية والأمراض الجرثومية والفطرية، كما أنها يمكن أن تكون عامل وقاية ضد أمراض أخرى كالسرطان ونقص المناعة البشري، وحديثاً لمعالجة مرض السكري.

ويمكن الحصول على البولي فينولات من أوراق الزيتون بشكل مستخلصات ومكملات غذائية بطرائق توفر الكثير من الوقت وفي الوقت نفسه هي طرائق اقتصادية قليلة التكلفة ومن هذه الطرائق الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية التي تقلل زمن المعالجة والكثير من النفقات مقارنة مع الطرائق التقليدية في الاستخلاص.

تم استخلاص المركبات البولي فينولية من أوراق الزيتون الجافة بشروط مختلفة من تركيز المذيب إيتانول ماء (60,70,80%) ودرجة حرارة الاستخلاص (20,30,40°C) وزمن الاستخلاص (24,48,72 h) بالنسبة لطريقة الاستخلاص بالنقع و(10,20,30 min) بالنسبة لطريقة الاستخلاص بجهاز الموجات فوق الصوتية.

وتبين من خلال الدراسة الحالية أن أعلى كمية بولي فينولات كانت موجودة في أوراق الزيتون الجافة التي تم استخلاصها باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية بتركيز المذيب ايتانول – ماء 80% وبدرجة الحرارة 40°C وبزمن الاستخلاص 20min.

المراجع :

1. Ibrahim, E, H., Abdelgaleel, M,A., Salama, A. A., Metwalli, S, M. Chemical and Nutritional Evaluation of Olive Leaves and Selection the Optimum Conditions for Extraction their Phenolic Compounds, Agric. Res. Kafr El-Sheikh Univ, Egypt, 42 (1), 445-459, 2016.
2. Pereira,A,P., Ferreira,I,C,F,R., Marcelino,F., Valentao,P., Andrade,P,B., Seabra,R., Estevinho,L., Bento,A., Pereira,J,A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (Olea Europaea L. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules, Portugal, (12): 1153-1162, 2007.
3. Herrero,M., Temirzoda,T,N., Segura-Carretero,A., Quirantes,R., Plaza,M., Ibañez,E. New Possibilities for the Valorization of Olive Oil By-Products. Journal of Chromatography A. 2011
4. Bulotta,S., Corradino,R., Celano,M., D'Agostino,M., Maiuolo,J., Oliverio,M., Procopio,A., Lannone,M., Rotiroti,D. Antiproliferative and Antioxidant Effects on Breast Cancer Cells of Oleuropein and its Semisynthetic Peracetylated Perivatives. Food Chemistry, Italy, (127) 1609-1614, 2011.
5. Lee-Huang,S., Zhang,L., Huang,Ph,L., Chang,Y,T., Huang,P,L. 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, USA, (307)1029-1037, 2003.
6. Abaza,L., Talorete,T,P,N., Yamada, P., Kurita,Y., Zarrouk,M., Isoda,H. Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Tunisia, 71(5): 1306-1312, 2007.
7. Jemai,H., Fki,I., Bouaziz,M., Bouallagui,Z., El-Feki,A., Isoda,H., Sayadi,S. Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Tunisia, (8):2630-2637, 2008.
8. Fadel,M,A., Abdel-Hameed,S,S., Farrag,H,F., Bazaid,S,A. Total Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from the Leaf Samples of Wild African and Cultivated Mediterranean Olive Growing in Taif, KSA and Their Taxonomical Significance. Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre, Egypt, (5)93-103, 2015.
9. Goldsmith,C,D., Vuong,Q,V., Sadeqzadeh,E., Stathopoulos,C,E., Roach,P,D., Scarlett,C,J. Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of Olea Europaea L. Leaf Extracts Against Pancreatic Cancer Cells. Molecules, 20: 12992-13004, 2015
10. Tayoub,G., Sulaiman,H., Hassan,A., Alorfi,M. Determination of Oleuropein in Leaves and Fruits of Some Syrian Olive Varieties. Int.J.Med. Arom. Plants,Vol.2(3): 428-433, 2012.
11. Halawi,M,H., Abdel-Rahman,S,M., Yusef,H. Comparative Study of the Antifungal Activity of Olea Europaea L. Against Some Pathogenic Candida Albicans Isolates in Lebanon. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, Lebanon, 4(6): 970-984, 2015.
12. Ghasemzadeh,A., Jaafar,H,Z,E., Juraimi,A,S., Tayebi-Meigooni,A. Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for the Assay of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Hashemi Rice Bran. Molecules, 20:10822-10838, 2015.

13. Xu,D,P., Zhou,Y., Zheng,J., Li,S., Li,A,N., Li,H,B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of Jatropha integerrima by Response Surface Methodology. Molecules, MDPI, China, (21) 18: 1-12, 2016.

14. Gutte,K,B., Sahoo,A,K., Ranveer,R,C. Effect of Ultrasonic Treatment on Extraction and Fatty Acid Profile of Flaxseed Oil. OCL, 22(6), 2015.

15. Ghammem,N., Sifaoui,I., Mejri,A., Ben-Slama,M., Hamdi,M., Abderabba,M. Optimization OF Extraction OF Phenolic and Antioxidant Contents from Olive Leaves Using Composite Central Design. Global Journal of Bio-Science and Biotechnology, Tunisia, Vol4(2):145-152, 2015.