

Nar (*Punica granatum L.*) Kabuğunun *In Vitro* Antidiyabetik, Antienflamatuar, Sitotoksik, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Tuğba Demir¹, Özlem Akpınar², Haki Kara³, Hüseyin Güngör³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Sivas

²Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, Sivas

Geliş Tarihi (Received): 05.03.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 25.03.2019

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): tugbilim@hotmail.com (T. Demir)

📞 0 346 219 10 10/25 95 📠 0 346 219 18 12

ÖZ

Bu çalışmada nar (*Punica granatum L.*) kabuğunun sağlık açısından önemli antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antienflamatuar ve sitotoksik özellikleri araştırılmıştır. Nar kabukları (%33 etanol konsantrasyonu, 78°C, 113 dakika) ekstrakte edilerek fenolik bileşiklerinin kompozisyonu belirlenmiş, yüksek oranda punigalajin, kafeik asit ve epikateşin içerdiği ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen ekstrakt aynı zamanda, seçilen mikroorganizmalara (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*) karşı antimikrobiyal etki göstermiş ve en fazla mikrobiyal direnci *S. aureus*'a (21 mm; 1.87 mg ekstrakt/mL) karşı olduğu bulunmuştur. Ekstrakt α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerini inhibe etmiş ve antidiyabetik özellik göstermiştir. Aynı zamanda ekstraktın enflamasyondan sorumlu ksantin oksidaz ve lipoksigenaz enzimlerini de inhibe edebildiği ve meme ve kemik kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu da gözlenmiştir. Nar kabuğu ekstraktının belirlenen biyolojik aktiviteleri ile gıda ve gıda dışı uygulamalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nar kabuğu, Antimikrobiyal, Antidiyabetik, Antienflamatuar, Sitotoksik

In Vitro Antidiabetic, Antiinflammatory, Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel

ABSTRACT

In this study, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, antiinflammatory and cytotoxic properties of the pomegranate (*Punica granatum L.*) peel were investigated. The composition of the phenolic compounds of the pomegranate peel extract (33%, 78°C, 113 min) was determined and it was found to contain high amounts of punigalagin, caffeic acid and epicatechin. At the same time, the extract was found to have high antioxidant capacity. It showed antimicrobial activity against selected microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*) and its highest microbial resistance was found to be against *S. aureus* (21 mm; 1.87 mg extract/mL). It inhibited α -amylase and α -glucosidase enzymes and showed the antidiabetic property. At the same time, the extract was able to inhibit xanthine oxidase and lipoxygenase enzymes that were responsible for the inflammation and its cytotoxic activity on breast and bone cancer cells were also observed. It was concluded that pomegranate peel extracts could be used in food and non-food applications due to its biological activities.

Keywords: Pomegranate peel, Antimicrobial, Antidiabetic, Antiinflammatory, Cytotoxic

GİRİŞ

Punicaceae ailesinin içinde yer alan nar meyvesi; antik dönemlerden bu yana mistik özellikleriyle ön plana çıkan, oldukça farklı özelliklere sahip bir meyvedir. Binlerce yıldır farklı medeniyetler tarafından, halk arasında tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Nar meyvesinin, hastalık riskini azalttığı bildirilen tanen ve fenolik bileşikler açısından zengin olması [2], son yıllarda, popülerlik kazanmasını sağlamış ve Türkiye’de nar üretimini 5 kat artırmıştır [3].

İnsan vücudundaki antioksidan dengesi farklı nedenlerden (çevre kirliliği, yorgunluk, yaş ilerlemesi, aşırı kalori alımı ve yüksek yağlı diyetler) dolayı oksidanlar lehine geliştiğinde, vücut antioksidanlara ihtiyaç duymaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi oksidatif süreci azalttığından, hem insan vücudunda hem de gıda sistemlerinde oksidatif değişiklikleri kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır [4]. Son yıllarda antibiyotiklerin gelişi-güzel kullanımı ve insan patojeni bakterilerin ilaçlara karşı direnç kazanmaları nedeniyle, antioksidan ve antimikrobiyal etkili fenolik bileşiklere olan ilgi artmıştır. Bu bileşiklerin ortamda bulunan çeşitli bakteri ve küf türlerinin gelişmesini engellediği ve bu mikroorganizmalardan kaynaklanabilecek çeşitli enfeksiyon hastalıklarının önüne geçilebileceği ve patojenlerin kontrolünde de etkili olabileceği farklı çalışmalarda saptanmıştır [5].

Farklı seviyelerde bitkilerin bütün kısımlarında bulunan fenolik bileşiklerin farklı enzimleri inhibe ettikleri, antialerjen, antimutajen, antikarsinojen, antiglisemik, antikolesterol, antienflamatuar, antitrombotik, vasodilatör ve sakinleştirici özelliklere sahip oldukları bildirilmektedir [6-9]. Yapılan çalışmalarda yüksek fenolik içerikli gıdalara beslenmelerinde yer veren bireylerde, koroner kalp hastalık risklerinin azaldığı bildirilmiştir [10]. *In vitro* araştırmalarda; bitki fenoliklerinin karbonhidrat yıkımında görevli enzimleri inhibe etme yeteneği ile antidiyabetik etkileri [11], LOX inhibe etme kapasiteleriyle antienflamatuar aktiviteleri [12] ve sitotoksik etkilerinin yüksek olması nedeniyle antikanser etkide önemli rol oynadığı vurgulanmıştır [13].

Narın fenolik bileşikler açısından da zengin olduğu yapılan birçok çalışma ile belirtilmiştir [14-17]. Li ve ark. [18]’nın nar kabukları üzerine yaptıkları çalışmada kabuk ve posa kısımlarında, fenolik maddelerin kabukta daha yüksek olduğu, antioksidan aktivite bakımından, posadan daha etkin olduğu saptanmıştır. Nar meyvesinin ve kabuğunun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşikleri kantitatif olarak incelenmiş ve antosyaninler, gallotanenler, hidroksisünamik asit, hidroksibenzoik asitler ile elajitanenler ve gallagil esterleri içerdiği tespit edilmiştir [19]. Yapılan çalışmalarda; nar kabuklarının antioksidan [20-23], antimikrobiyal [23, 24], antidiyabetik etkisi olduğu [25], ayrıca antikanser [26-29] ve antienflamatuar aktivitelere [30-32] sahip olduğu rapor edilmiştir.

Her ne kadar nar kabukları ile ilgili çalışmalar olsa da, özellikle gıda ve gıda dışı endüstriyel boyutta

uygulamalarda verimli bir şekilde kullanılabilmesi için, hala fenolik maddelerin etkin bir şekilde ekstrakte edildiği, ekstrakte edilen bu bileşiklerin biyolojik aktivitesinin çok yönlü derinlemesine araştırıldığı ve sonuçların karşılaştırıldığı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı nar kabuğu ekstraktının sağlık açısından önemli biyoaktif özelliklerini incelemektir. Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada nar kabuğu ekstraktlarından ekstrakte edilen fenolik bileşik kompozisyonu belirlenmiş, ekstraktın antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antienflamatuar ve sitotoksik özelliklerini araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Nar (*Punica granatum L.*) kabukları farklı zamanlarda yerel marketlerden temin edilen nar meyvesinden elde edilmiş, etüvde (40°C) kurutulduktan sonra toz haline gelinceye kadar kahve öğütücüsünde (Sinbo, Türkiye) öğütülmüş ve +4°C’de analiz edilinceye kadar depolanmıştır. α -Amilaz (*Aspergillus oryzae*), α -amilaz (pankreatik), α -glukozidaz (*Saccharomyces cerevisiae*), ksantin oksidaz ve lipoksigenaz enzimleri Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)’den satın alınmıştır. Meme kanseri MCF-7 (86012803) ve kemik kanseri MG-63 (86051601) hücre hatları da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)’den temin edilmiştir. Eosin Metilen Blue (EMB), Chapman Agar, Sabouraud Glikoz Agar, Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) Merck (Merck KGaA, Almanya) firmasından alınmıştır. *E. coli* (ATCC 25922), *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 29213), *A. flavus* (ATCC 9170) ve *A. niger* (ATCC 6275) mikroorganizmaları Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Akarboz (Glukobay) Bayer’den (Türkiye), allopurinol (Ürikoliz) Sandoz’dan (Türkiye), metotreksat Koçak-Farma’dan (Türkiye), ampisilin antimikrobiyal duyarlılık diski Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific, ABD)’den alınmıştır. Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) HPLC kolonu Perkin Elmer’den (ABD) temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik standartta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) veya Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmalarından alınmıştır.

Yöntem

Ekstraksiyon ve Konsantrasyon

Nar kabukları; daha önceki çalışmada belirlenen (%33 etanol, 78°C ve 113 dakika) koşulda [33], 200:20 (mL solvent/g bitki) oranında solvent ile karıştırılarak ekstraksiyona tabi tutulmuş, ekstrakt önce 5000 rpm’de 10 dakika santrüfuj edilmiş, daha sonrada oda sıcaklığında filtre edilmiştir [34]. Elde edilen filtrat evaporatörde (Buchi, R-300, İsviçre) konsantre edilerek kalın ve viskoz bir materyal elde edilmiş ve kullanılıncaya kadar -18°C’de saklanmıştır [35].

Toplam Fenolik Madde Tayini

Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi [36] tarafından 2 N Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı kullanılarak tanımlanan yöntemle göre belirlenmiştir. 2 N 100 µL Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı, 100 µL ekstrakt, 100 µL standart galik asit çözeltileri, 2.3 mL saf su ve 1 mL %7 sulu sodyum karbonat çözeltisi karıştırılarak ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra spektrofotometrede 750 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Tüm analizler iki tekrarlı ve üç paralel olarak yapılmış, sonuçlar galik asit eşdeğeri (GAE) olarak açıklanmıştır.

Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

Nar kabuğu ekstraktının toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesi Zhishen [37]' e göre yapılmıştır. Kuarsetin standart olarak kullanılmış ve örnekler sırasıyla %5 NaNO₂, %10 AlCl₃ ve 1 M NaOH ile reaksiyona sokulmuştur. Karışımların 510 nm' de absorbansları ölçülmüştür ve toplam flavonoid miktarları kuarsetin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir.

Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması

Nar kabuğu ekstraktının fenolik bileşik içeriği kantitatif olarak HPLC'de tanımlanmıştır. Örnekler 0.20 µm boyutlu filtrelerden geçirilip DAD detektöre (Diode-Array Detektör; Perkin Elmer Model Flexar, ABD) sahip Perkin Elmer yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminde Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) kolonu (Perkin Elmer) ile analiz edilmiştir. Ortofosforik asit ile pH'sı 2.5'e ayarlanan su Solvent A, asetonitril ise Solvent B olarak kullanılmıştır [38]. Örnekler 25 °C'de ve 0.8 mL/dk akış hızı ile %100-%57 su içinde asetonitril gradienti ile kolondan elüt edilmiştir (0- 12 dk %100 A, 8 dk %100-91 A, 12 dk %91-87 A, 10 dk %87-67 A, 18 dk %67-57 A). Ekstraktın fenolik bileşikleri standart fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak tanımlanmış, konsantrasyonları da farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartların pik alanları kullanılarak çizilen grafiklere göre hesaplanmıştır.

Antioksidan Aktivite

Radikal Süpürme Aktivitesi – DPPH: Nar kabuğu ekstraktının DPPH (2,2 difenil-1-pikrihidrazil) yöntemiyle antioksidan kapasite tayini Brand-Williams ve ark. [39] tarafından açıklanan yöntemle göre yapılmıştır. Sonuçlar Troloks eşdeğeri (TE) olarak açıklanmıştır.

Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü – FRAP: Nar kabuğu ekstraktının FRAP yöntemiyle antioksidan kapasite tayini Benzie ve Strain [40] tarafından tanımlanan yöntemle göre yapılmıştır. Sonuçlar Troloks eşdeğeri (TE) olarak açıklanmıştır.

Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi – TEAC: Nar kabuğu ekstraktının TEAC yöntemiyle antioksidan kapasite tayini Re ve ark. [41] tarafından açıklanan yöntemle göre yapılmıştır. Sonuçlar Troloks eşdeğeri (TE) olarak açıklanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmaların üretiminde *E. coli* ve *E. faecalis* için Eosin Metilen Blue (EMB) agar, *S. aureus* için Chapman agar (Staphylococcus Selective Agar), *A. flavus* ve *A. niger* için ise Sabouraud glikoz agar kullanılmıştır. Nar kabuğu ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde Ebrahimabadi ve ark. [42] tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikroorganizmaların katı besiyerlerinde üretilmiş olup, 18-24 saatlik taze kültürlerinden alınan koloniler serum fizyolojik içinde süspansiyon edilip, 0.5 McFarland bulanıklık tüpüyle kıyaslanarak 10⁸ kob/mL'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. MHA içeren petrilere bakteri dilüsyonundan 100 µL ekim yapılmıştır. Ekstrakt 6 mm çapındaki steril boş disklerle emdirilmiş, diskler petrilere yerleştirildikten sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstraksiyon solventi, su ve standart antibiyotik disk olan ampisilin kullanılmıştır.

Nar kabuğu ekstraktının minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) değerlerini belirlemede Oskay ve ark. [43] tarafından açıklanan makrobroth yöntemi esas alınmış ve modifiye edilerek kullanılmıştır. Hazırlanan her bir mikroorganizma kültürlerinden (18 saatlik) 25 µL (1×10⁸ kob/mL), 3 mL MHB ve 10 mL farklı dilüsyonlarda hazırlanan ekstrakta (80 µg nar kabuğu ekstrakt/mL-0.156 µg nar kabuğu ekstrakt/mL) aktarılmıştır. Daha sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üremenin görülmediği tüplerdeki en düşük konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca bulanıklık oluşmayan tüplerden 50 µL alınarak MHA'ya ekim yapılmış, büyüme olup olmadığı kontrol edilmiş ve bu şekilde Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) da belirlenmiştir. Kontrol olarak ampisilin kullanılmıştır.

Antidiyabetik Aktivite

Ekstraktın alfa amilaz inhibisyon aktivitesi Worthington [44] yönteminin modifiye edilmesiyle ölçülmüş, akarboz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstraktın ve akarbozun 0-10 mg ekstrakt (akarboz)/mL arasında değişen konsantrasyonları hazırlanmış ve küf ve pankreatik kökenli iki α-amilazı inhibe etme kapasiteleri belirlenerek antidiyabetik aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimlerin uygun konsantrasyonu ön denemelerle seçilmiş, her iki α-amilazdan (küf α-amilaz: 29 U/mL ve pankreatik α-amilaz: 36 U/mL) 0.5 mL alınarak, 0.5 mL ekstrakt ya da akarboz (0-10 mg ekstrakt/mL veya 0-10 mg akarboz/mL) ile 10 dakika 25°C'de ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra enzim/ekstrakt (akarboz) karışımı üzerine 20 mM pH 6.9 fosfat tamponu içinde hazırlanmış 0.5 mL %1'lik patates nişastası çözeltisi eklenmiş ve 25°C'de 30 dakika reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan indirgen şeker miktarı Dinitrosalisilik Asit (DNS) yöntemi ile glikoz standardı kullanılarak belirlenmiştir [45] (1 mL örnek, 1.5 mL DNS çözeltisi ile karıştırılmış, 100°C'de 5 dakika kaynatılmıştır, oluşan renk spektrofotometrede 560

nm'de okunmuştur). Ekstraktın her iki α -amilaz enzimi inhibe etme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

A₁: ekstrakt/akarbozun kullanılmadan enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın indirgen şeker miktarı, A₂: ekstrakt/akarboz kullanıldığında enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın indirgen şeker miktarıdır. Ekstraktların inhibisyon kapasitesi enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (IC₅₀) olarak belirlenmiştir.

Ekstraktın, α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi Worthington [44] yönteminin modifiye edilmesiyle ölçülmüş, akarboz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. α -Glukozidaz enziminin uygun konsantrasyonu (0.40 U/mL) ön denemelerle seçilmiş olup, enzim çözeltisinden 0.5 mL alınarak, üzerine 0.5 mL fosfat tamponu (20 mM, pH 6.9) eklenmiş, bunu takiben 0.5 mL ekstrakt ya da akarboz çözeltisinin farklı konsantrasyonları (0-10 mg ekstrakt veya 0-10 mg akarboz/mL) eklenerek 5 dakika 25°C'de ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyondan sonra 0.5 mL 5 mM *p*-nitrofenil-*a*-D-glukapiranozid çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 2 mL 0.1 M Na₂CO₃ ile sonlandırılarak oluşan renk spektrofotometrede 405 nm'de ölçülmüştür. Nar kabuğu ekstraktının α -glukozidaz enzimini inhibe etme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

A₁: ekstrakt/akarbozun kullanılmadan enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansı, A₂: ekstrakt/akarboz kullanıldığında enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansıdır. Ekstraktların inhibisyon kapasitesi enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (IC₅₀) olarak belirlenmiştir.

Antienflamatuar Aktivite

Ekstraktın lipoksigenaz inhibisyonu aktivitesi Alaba ve ark. [46]'na göre yapılmıştır ve kuarsetin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Lipoksigenaz enzimi 0.1 M pH 8.0 fosfat tamponu içinde 8460 U/mL aktiviteye sahip olacak şekilde, linoleik asit ise 1980 μ mol/L konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Lipoksigenaz enziminden 50 μ L, fosfat tamponundan (0.1 M, pH 8.0) 2740 μ L ve 0-8 mg/mL arasında değişen nar kabuğu ekstraktından (veya 0-1.13 mg/mL kuarsetin) 10 μ L alınarak hazırlanan karışım 25°C'de 5 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır ve süre sonunda 200 μ L linoleik asit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyonun absorbansı spektrofotometrede 234 nm'de 5 dakika boyunca 30 saniyelik aralıklarla ölçülmüştür. Enzimin uygun konsantrasyonu yukarıda açıklanan yöntemde ekstrakt/kuarsetin çözeltisinin fosfat tamponu ile ikame edilmesi ile belirlenmiştir. Ekstraktın lipoksigenaz enzimini inhibe etme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

A₁: ekstrakt/kuarsetin kullanılmadan enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansı, A₂: ekstrakt/kuarsetin kullanıldığında enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansıdır. Ekstraktın inhibisyon kapasitesi enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (IC₅₀) olarak belirlenmiştir.

Ekstraktın ksantin oksidazı inhibe etme aktivitesi, Nessa ve ark. [47]'in belirttiği yöntemle göre ve allopurinol pozitif kontrol olarak kullanılmasıyla belirlenmiştir. Konsantrasyon haldeki bitki ekstraktının veya allopurinolun 0-10 mg ekstrakt (allopurinol)/mL arasında değişen konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ksantin oksidaz enziminden (0.1 U/mL) 0.1 mL alınmış, 1.9 mL fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.5) ile karıştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktı/allopurinolden (0-10 mg/mL) 1 mL bu karışıma ilave edilmiştir ve 25°C'de 5 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 1 mL ksantin (1.52 mg/mL) eklenerek 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 1 mL 1 M HCl ile sonlandırılarak ürik asit oluşumu 295 nm'de ölçülmüştür. Ekstraktın ksantin oksidaz enzimini inhibe etme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

A₁: ekstrakt/allopurinol kullanılmadan enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansı, A₂: ekstrakt/allopurinol kullanıldığında enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen karışımın absorbansıdır. Ekstraktın inhibisyon kapasitesi enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (IC₅₀) olarak belirlenmiştir.

Sitotoksik Aktivite

Ekstraktın sitotoksik aktiviteleri, Betancur-Galvis ve ark. [48] ile Horakova ve ark. [49] tarafından belirtilen yöntemlerin modifiye edilmesi ile meme kanseri (MCF-7) ve kemik kanser (MG-63) hücrelerine karşı belirlenmiştir. Nar kabuğu ekstraktından 0.2 g alınıp 1 mL DMSO'da çözülmüş ve 0.22 μ m'lik filtrelerden geçirilmiştir. Öncelikle MCF-7 ve MG-63 kanser hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ve RPMI 1640 (İçeriği L-glutamin, 2g/L NaHCO₃) besiyerinde, %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de geliştirilmiş ve buradan pleytteki hücre miktarı 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 μ L ekim yapılmıştır. Pleytler %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 24 saat gelişmeleri için inkübe edilmiş, 24 saat sonunda hücrelerin üzerine 100'er μ L taze besiyeri eklenmiş, bu işlemi takiben 20 μ L konsantrasyonu 8.33-266.62 μ g/mL arasında değişen bitki ekstraktı ilave edilip tekrar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda pleytteki örneklerin üzerine 10 μ L MTT (3-(4,5-dimetil-tiazolil-2,5-difeniltetrazolium bromid) eklenmiş 2 saat daha 37°C'de inkübasyona bırakılmış, daha sonra üzerlerine 100 μ L %1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ilave edilerek 10 dakika çalkalanmış (100 rpm) ve oluşan renk mikroyoklukta (BioTek, Epoch, ABD) 540 nm'de okunmuştur. Doksorubisin ve metotretsat (0.2 g/mL DMSO) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstraktın sitotoksik aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

A₁: Ekstrakt eklenmeyen pleyttteki kuyucuğun absorbanı (sadece hücre), A₂: Ekstrakt eklenen pleyttteki kuyucuğun absorbanı. Ekstraktların sitotoksik aktiviteleri; hücrelerin %50 sini inhibe eden konsantrasyonları (IC₅₀) olarak belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Tanımlanması

Literatürde nar kabuğu ekstraksiyon veriminin uygulanan yöntem, süre ve sıcaklık gibi parametrelere ilaveten kullanılan çözücülerinde toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde içerikleri ve verim üzerinde etkisinin önemli olduğu belirtilmiştir [50]. Nar kabuklarından 78°C de, 113 dakika boyunca %33 etanol konsantrasyonu ile fenolik bileşikler içeren ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt evaporatörde konsantre edilerek, suda çözünür madde konsantrasyonu %42.37 olan viskoz bir ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Nar kabuğu ekstraktının fenolik bileşiklerinin tanımlanması HPLC ile yapılmış ve sonuçlar Tablo 2'de

sunulmuştur. Ekstrakta 14 adet fenolik bileşik tanımlanmış ve en fazla punigalajin içerdiği, bunu kafeik asit, epikateşin ve ferulik asitin izlediği görülmektedir (Tablo 2). Nar kabuğu ile ilgili yapılan bir çalışmada gallik asit (2.69 mg/g), punikalajin (64.98 mg/g), kateşin (12.65 mg/g), klorojenik asit (0.35 mg/g), kafeik asit (0.02 mg/g), epikateşin (0.94 mg/g), rutin (0.36 mg/g) ve elajik asit (2.83 mg/g) tanımlanmıştır [51]. Diğer bir çalışmada gallik asit (71 mg/g), punikalajin (296 mg/g), kuarsetin (40 mg/g), kaempferol (62 mg/g), kafeik asit (11 mg/g), sinapik asit (17 mg/g), kumarik asit (32 mg/g), elajik asit (18 mg/g) ve ferulik asit (28 mg/g) içerdiği bulunmuştur [52].

Bu çalışmada nar kabuğu ekstraktında gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, elajik asit, ferulik asit, kuarsetin, kaempferolün yanında pirogallol, şiringik asit, 2,4 hidroksibenzoik asit, vanilik asit, rosmarinik asit ve naringenin tanımlanmış ve literature benzer sonuçlar elde edilmiştir. Gil ve ark. [53] tarafından yapılan araştırmada, nar kabuğunun yüksek oranda elajik asit, gallik asit ve bu bileşiklerin izomerleri içerdiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada elajik asit 23.53 mg/mg nar kabuğu ekstraktı, gallik asit ise 10.19 mg/mg nar kabuğu ekstraktı olarak bulunmuş ve nar kabuğu ekstraktının sağlık açısından oldukça önemli fenolik bileşikler içerdiği tespit edilmiştir.

Tablo 1. Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivitesi

		Nar Kabuğu Ekstraktı
Toplam Fenolik (mg GAE/g ekstrakt)		540.26±0.02
Toplam Flavonoid (mg KE/g ekstrakt)		22.01±0.01
Antioksidan Aktivite (µmol TE/g ekstrakt)	DPPH	4.48±0.02
	TEAC	5.31±0.02
	FRAP	13.36±0.03

*E:Ekstrakt

Tablo 2. Nar kabuğu ekstraktının HPLC'de tanımlanan fenolik bileşik içerikleri

No	Fenolik Bileşik	Nar Kabuğu (mg/g ekstrakt)
1	Gallik asit	10.19±0.21
2	Kafeik asit	53.28±0.98
3	Ferulik asit	40.63±0.76
4	Kateşin	26.81±0.52
5	2,4 hidroksibenzoik asit	16.84±0.35
6	Klorojenik asit	14.04±0.30
7	Elajik asit	23.53±0.45
8	Vanilik asit	26.25±0.49
9	Kuarsetin	27.60±0.58
10	Epikateşin	51.93±0.98
11	Kaempferol	10.69±0.18
12	Rosmarinik asit	6.83±0.13
13	Naringenin	5.66±0.09
14	Punigalajin	168.01±3.32

Nar Kabuğu Ekstraktının Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin yapıları ve özellikleri birbirinden çok farklı olduğundan, tek bir yöntem ile ölçüm yetmemekte, birden fazla ölçüm yöntemi ile antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi gerekmektedir [54]. İncelenen nar kabuğu ekstraktının DPPH, FRAP ve TEAC ile ölçülen antioksidan aktiviteleri sırasıyla 4.48 $\mu\text{mol TE/g}$ ekstrakt, 13.36 $\mu\text{mol TE/g}$ ekstrakt ve 5.31 $\mu\text{mol TE/g}$ ekstrakt olarak bulunmuştur (Tablo 1). Nar kabuğu ile daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı şekillerde kurutulan ekstraktların antioksidan kapasitesinin 351.36-595.71 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH) ve 871.73-1056.34 $\mu\text{mol TE/g}$ ekstrakt (TEAC) olarak bildirilmiştir [22]. Nar kabuklarının altı farklı solvent ile hazırlanan ekstraktlarında, en yüksek ekstraksiyon verimin etanol ile hazırlanan ekstraktlarda (>%50); radikal süpürme aktivitesinin ise metanol ile hazırlanan ekstraktlarda yüksek (DPPH>%70) olduğu belirtilmiştir [21]. Diğer bir çalışmada ise etanol ile hazırlanan ekstraktlarda antioksidan aktivite 179.85 mM TE/g ekstrakt (TEAC) ve 208.91 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) olarak belirlenirken [55], %80 metanol ekstraksiyonu sonucu 1000 $\mu\text{g/mL}$ olarak hazırlanan nar kabuğu ekstraktlarının DPPH çözeltisinin rengini %71.65-83.56 oranında açtığı tespit edilmiştir. [56]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ekstraktların antioksidan aktivitelerinin literatürden farklı olmasının nedenleri olarak, ekstraksiyon koşullarının, kullanılan solventin ve en önemlisi ekstraksiyon sonucunda ekstrakta uygulanan kurutma ve konsantrasyon işlemlerinin derecesi ve farklılığı ile antioksidan aktiviteyi ifade etmede kullanılan yöntem farklılığı gibi etmenlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Mikroorganizma gelişmesini durdurmak ve daha sonrasında oluşabilmesi muhtemel ikincil bir enfeksiyonun önüne geçebilmek, bitkisel kökenli antimikrobiyal ajanlarda beklenen özelliklerdir [57]. Bu çalışmada, gıda kaynaklı çeşitli enfeksiyonlara (bakteriler) ve intoksikasyonlara (küfler) neden olan birçok bakteri ve küf arasından en önemli ve en sık karşılaşılan mikroorganizmalar seçilmiş, nar kabuğu ekstraktının disk difüzyon ve MİK yöntemleri ile antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve sonuçlar Tablo 3'te sunulmuştur. Mikroorganizmalar arasında, ekstrakt en fazla inhibisyonu *S. aureus*'a karşı göstermiş (21.00 mm), *E. coli*'yi ise en düşük oranda inhibe etmiştir (16.50 mm). *A. flavus* ise, *A. niger*'e göre ekstrakta daha fazla direnç göstermiştir (21.00 mm>17.50 mm). *E. faecalis* için belirlenen inhibisyon zonu ise 18.50 mm'dir (Tablo 3). Ekstraktın MİK değerleri bakterilerden *S. aureus*, küflerden ise *A. niger*'e karşı en düşük değerleri göstermiş ve 1.87 mg ekstrakt/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 3). Daha önceki çalışmalarda, nar kabuğu ekstraktının MİK değeri *Listeria monocytogenes* için 1.5 mg/mL, *S. aureus* için 1.5 mg/mL ve *E. coli* için 3 mg/mL bulunmuş ve nar kabuğunun gram(+) bakteriler üzerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir [24]. Farklı bir çalışmada *S. aureus* (0.39 mg/mL) üzerinde *E. coli*'ye (0.78 mg/mL) göre daha etkin bulunmuştur [20]. Diğer bir çalışmada ise metanol ile ekstrakte edilmiş nar kabuğu ekstraktının farklı patojen mikroorganizmalar (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) üzerindeki MİK değerleri 20-50 mg/mL arasında değiştiği belirtilmiştir [58]. Sonuçlar bu çalışma bulguları ile paralellik göstermiş olup, nar kabuğu ekstraktlarının, gerek gıdalarda, gerekse gıda dışı uygulamalarda oksidatif değişimleri ve istenmeyen mikrobiyal aktiviteleri kontrol etmek amacıyla kullanımı potansiyeli olabileceğini göstermiştir.

Tablo 3. Nar kabuğu ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi*

Mikroorganizma	Nar kabuğu ekstraktının inhibisyon zon çapı (mm)	Ampisilin inhibisyon zon çapı (mm)		Nar Kabuğu (mg ekstrakt/mL)	Ampisilin (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	21.00±1.00	26.00	MİK	1.87±0.00	0.48±0.00
			MBK	1.87- Üreme yok	0.48- Üreme yok
<i>E. faecalis</i>	18.50±0.71	24.00	MİK	3.75±0.00	0.48±0.00
			MBK	3.75- Üreme yok	0.48- Üreme yok
<i>E. coli</i>	16.50±0.71	23.50	MİK	3.75±0.00	0.96±0.00
			MBK	3.75- Üreme yok	0.96- Üreme yok
<i>A. niger</i>	21.00±0.00	25.50	MİK	1.87±0.00	0.96±0.00
			MBK	1.87- Üreme yok	0.96- Üreme yok
<i>A. flavus</i>	17.50±0.71	25.00	MİK	3.75±0.00	0.96±0.00
			MBK	3.75- Üreme yok	0.96- Üreme yok

*: Disk Çapı = 6mm

Nar Kabuğu Ekstraktının Antidiyabetik Aktivitesi

Diyabet tedavisinde tercih edilen ilaçların bir grubu, metabolizmada karbonhidrat yıkımından sorumlu α -amilaz ve α -glukozidaz gibi enzimleri inhibe ederek, karbonhidratların glukoza parçalanmasını kontrol altına almaktadır [59]. Daha önceki yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin bu enzimleri inhibe edebileceği ve

karbonhidrat emilimini geciktirerek bir antidiyabetik ajandan beklenen yukarıda belirtilen rolü üstlenebileceği belirtilmiştir [60, 61]. Bu çalışmada nar kabuğu ekstraktının antidiyabetik özellikleri; küf (*Aspergillus oryzae*) ve pankreatik kökenli α -amilaz ile α -glukozidaz (*Saccharomyces cerevisiae*) enzimlerini inhibe etme kapasitesi ile araştırılmıştır ve ekstraktının IC₅₀ değeri ile akarboz eşdeğeri (AE) Tablo 4'te sunulmuştur. Nar

kabuğu ekstraktının; küf ve pankreatik α -amilaz enzimlerinin %50 aktivitesini inhibe eden miktarları sırasıyla 8.72 mg ekstrakt/mL ve 10.11 mg ekstrakt/mL, α -glukozidaz enziminin %50 aktivitesini inhibe eden değer ise 10.77 mg/mL olarak belirlenmiştir. Küf ve pankreatik α -amilaz ile α -glukozidaz enzimlerinin %50'sini inhibe eden, akarboz

konsantrasyonu ise sırasıyla 6.04 mg/mL, 7.11 mg/mL ve 7.66 mg/mL olarak bulunmuştur. Tablo 4'ten de görüleceği üzere nar kabuk ekstraktının akarboza en yakın eşdeğeri küf kökenli α -amilaz enziminde ölçülürken bunu pankreatik α -amilaz ve α -glukozidaz takip etmiştir.

Tablo 4. Nar kabuğu ekstraktının antidiyabetik aktivitesi

	IC ₅₀ değerleri (mg/mL)		
	α -Amilaz (<i>A. oryzae</i>)	α -Amilaz (Pankreatik)	α -Glukozidaz (<i>S. cerevisiae</i>)
Akarboz (mg akarboz/mL)	6.04	7.11	7.66
Nar Kabuğu (mg ekstrakt/mL)	8.72	10.11	10.77
	Akarboz Eşdeğeri (mg AE/mg ekstrakt)		
	α -Amilaz (<i>A. oryzae</i>)	α -Amilaz (Pankreatik)	α -Glukozidaz (<i>S. cerevisiae</i>)
Nar Kabuğu (mg akarboz /mg ekstrakt)	0.80±0.16	0.76±0.08	0.81±0.15

AE: Akarboz Eşdeğeri

Daha önce yapılan araştırmalarda, nar kabuklarının α -glukozidaz enziminin %50'sini inhibe eden değer 5.56 mg/mL olarak belirlenmiş, α -amilaz enziminin inhibe etme kapasitesinin ise önemsiz olduğu rapor edilmiştir [62]. Farklı bir çalışmada α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri için ölçülen IC₅₀ aralıkları sırasıyla 0.26-4.57 μ g/mL ve 23.6-284.3 μ g/mL şeklinde belirtilmiştir [63]. Nar kabuklarının antihiperlipidemik aktivitesinin ölçüldüğü farklı çalışmalarda, α -glukozidaz enzim inhibisyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir [64, 65]. Bu çalışmada elde edilen ekstraktların α -glukozidaz enzimini literature göre daha düşük oranda inhibe ettiği belirlenirken, her iki α -amilazı ise önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Sonuçlar, nar kabuğu ekstraktının akarbozun %76-81 arasında aktiviteye sahip olduğunu ve kan şekeri kontrol etmede kullanılabileceğini desteklemektedir.

Nar Kabuğu Ekstraktının Antienflamatuar Aktivitesi

Nar kabuklarının antienflamatuar özelliğinin belirlenmesi için; ekstraktların ksantin oksidaz ve lipoksigenaz enzimlerini inhibe etme kapasiteleri incelenmiştir. Lipoksigenazlar birçok enflamasyon kaynaklı hastalıkta önemli rol oynamaktadır [66]. Ksantin oksidazlar ise gut hastalığı sonucu oluşan ürik asitin oluşturduğu doku şişliği ve ağrı ile ilişkilendirilmektedir [67, 68]. Tablo 5'te antienflamatuar aktivitede kullanılan nar kabuğunun IC₅₀ değerleri ile kuarsetin ve allopurinol eşdeğerleri verilmiştir. Lipoksigenaz enziminin %50'sini inhibe eden kuarsetin konsantrasyonu 1.22 mg ekstrakt/mL olarak hesaplanmıştır. Ksantin oksidazın %50 aktivitesini inhibe eden allopurinol konsantrasyonu ise 4.58 mg ekstrakt/mL olarak bulunmuştur. Nar kabuğu ekstraktının lipoksigenazın %50 aktivitesini inhibe eden miktarı 8.96 mg ekstrakt/mL, ksantin oksidaz için 5.46 mg ekstrakt/mL olarak hesaplanmış, lipoksigenaz için kuarsetin eşdeğeri 0.18 mg kuarsetin/mg ekstrakt, ksantin oksidaz için ise 0.80 mg allopurinol/mg ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Bitkilerin enzimlerini inhibe etme yetenekleri bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye, uygulanan ekstraksiyon yöntemine, elde edilen ekstraktların fenolik kompozisyonuna ve miktarına göre değiştiğinden, sonuçların daha önceki çalışmalarla karşılaştırılması kolay değildir. Bununla beraber, bu çalışmada ekstrakta bulunan fenolik bileşiklerin antienflamatuar etkileri, literatürde yapılan çalışmalara benzer bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda nar kabuğunun yapısında bulunan elajik asit [26], oleanolik asit, ursolik asit, klorojenik asit, epikateşin ve rutin [69] bileşiklerinin antienflamatuar aktivite de önemli görev üstlendikleri belirtilmiştir. Bu çalışmada nar kabuğu ekstraktının elajik asit (23.5 mg/g), klorojenik asit (14.04 mg/g) ve epikateşin (51.93 mg/g) içerdiği belirlenmiş, antienflamatuar aktivitesinde önemli etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Farklı bir çalışmada nar kabuğunun ksantin oksidaz enzimini inhibe etme yeteneği ölçülmüş ve %30-44 arasında değişen inhibisyon oranlarının ürik asit oluşumu üzerinde azaltıcı etkisi olduğu belirtilmiştir [70]. Bu çalışmada ise nar kabuğu ekstraktının, ürik asit oluşumundan sorumlu ksantin oksidaz enzimini daha iyi inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Nar Kabuğu Ekstraktının Sitotoksik Aktivitesi

Kemoterapide sık kullanılan ilaçlar, sitotoksik etki göstererek ilgili kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını önleyen ve hatta bu hücrelerin ölümüne yol açmakta [71]; ancak hastalarda, istenmeyen yan etkilere de neden olmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisi için araştırmalar sürekli devam etmekte, özellikle bitkiler bu konuda çok fazla araştırılmaktadır. Çalışma kapsamında incelenen nar kabuğu ekstraktının; MCF-7 ve MG-63 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi incelenmiştir. Nar kabuğu ekstraktının MCF-7 ve MG-63 hücrelerinin %50 aktivitesini inhibe eden miktarları sırasıyla 56.88 μ g ekstrakt/mL ve 57.33 μ g ekstrakt/mL olarak hesaplanmıştır (Tablo 6). Ekstraktın MCF-7 ve MG-63 için doksorubisin eşdeğerleri sırasıyla 0.86; 0.87 μ g DE/ μ g ekstrakt, metotreksat eşdeğerleri ise sırasıyla 0.90; 0.87 μ g MT/ μ g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Tablo 5. Nar kabuğu ekstraktının antienflamatuar aktivitesi

IC ₅₀ değerleri (mg/mL)			
		Lipoksigenaz	Ksantin Oksidaz
Allopurinol (mg allopurinol/mL)		-	4.58
Kuarsetin (mg kuarsetin/mL)		1.22	-
Nar Kabuğu (mg bitki ekstraktı /mL)		8.96	5.46
Lipoksigenaz		Ksantin Oksidaz	
Kuarsetin Eşdeğerleri (mg KE /mg ekstrakt)		Allopurinol Eşdeğerleri (mg AE /mg ekstrakt)	
Nar Kabuğu (mg kuarsetin /mg bitki ekstraktı)	0.18±0.04	Nar Kabuğu (mg allopurinol /mg bitki ekstraktı)	0.80±0.05

KE: Kuarsetin Eşdeğerleri; AE: Allopurinol Eşdeğeri

Tablo 6. Nar kabuğu ekstraktının sitotoksik aktivitesi

IC ₅₀ değerleri (µg/mL)			
		MCF-7	MG-63
Doksorubisin		45.81	44.49
Metotreksat		47.23	44.30
Nar Kabuğu Ekstraktı		56.88	57.33
Doksorubisin Eşdeğerleri µg DE/µg ekstrakt		Metotreksat Eşdeğerleri µg MT/µg ekstrakt	
		MCF-7	MG-63
Nar Kabuğu Ekstraktı	0.86±0.14	0.87±0.17	0.90±0.15

DE: Doksorubisin Eşdeğeri; MT: Metotreksat Eşdeğeri

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, nar kabuğundaki, elajik asit ve gallik asidin meme kanseri hücrelerinin apoptozunda etkili olduğu bulunmuştur [72]. Farklı çalışmalarda, nar kabuğunda bulunan kafeik asidin kanser hücrelerinde metastazı baskıladığı [73], kuarsetinin apoptosis ve anti tümör etkisinin olduğu [74], elajitanenlerin (punikalın ve punikalajin) kolon kanseri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu [26, 27], kaempferolün, kuarsetin ile birlikte sinerjist etki göstererek göğüs kanserinde hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu [28] bildirilmiştir. Ayrıca epikateşin içeriği yüksek bazı bitkilerin lösemi ve karaciğer kanseri sebebi olan tümör hücrelerini önemli derecede inhibe ettiği rapor edilmiştir [75-77]. Bu çalışmada da nar kabuğu ekstraktında bahsedilen bileşiklerden gallik asit (10.19 mg/g), kafeik asit (53.28 mg/g), kuarsetin (27.60 mg/g), elajik asit (23.53 mg/g), epikateşin (51.93 mg/g) ve kaempferol (10,69 mg/g) tespit edilmiş olup, her iki kanser hücrelerine gösterdiği yüksek sitotoksikite daha önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur.

SONUÇ

Bu çalışmada nar kabuğunun antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde gıdalarda oksidatif değişimleri ve istenmeyen mikrobiyal aktiviteleri kontrol etmede etkili olabileceği, karbonhidratların glukozu parçalamasını farklı derecelerde olsa da engelleyebileceğini, bu şekilde glukozun sindirimini, emilimini geciktirebileceğini ve yemek sonrası hiperglisemiyi azaltma potansiyelinin olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda nar kabuklarının farklı oranlarda antienflamatuar etkisi saptanmış olup, sitotoksik özellikleri ile kanser tedavisi ve riskini

azaltmada etkin rol oynayabileceği belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, yapılacak olan *in-vivo* çalışmalara temel oluşturacaktır ve endüstriyel boyuta taşındığında, nar kabuğunun antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antienflamatuar ve antikanser aktiviteleri ile hem gıda hem de gıda dışı (ilaç endüstrisi gibi) alanlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından V-056 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara.
- [2] Jaiswal, V., DerMarderosian, A., Porter, J.R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum L.*). *Food Chemistry*, 118(1), 11-16.
- [3] T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- [4] Samaranayaka, A.G.P., Li-Chan, E.C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food*, 3(4), 229-254.

- [5] Yusof, H., Radzi, N.A.S.M., Richard, R.L. (2018). Qualitative phytochemical analysis and antimicrobial activity of piper sarmentosum leaves extract against selected pathogens. *Malaysian Journal of Health Sciences*, 17.1.
- [6] Wanasundara, U.N., Shahidi, F. (1998). Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335-342.
- [7] Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- [8] Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1): 116-134.
- [9] Sharmila, G., Bhat, F.A., Arunkumar, R., Elumalai, P., Singh, P.R., Senthilkumar, K., Arunakaran, J. (2014). Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *Clinical Nutrition* 33(4), 718-726.
- [10] Skowrya, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiro, S., Almajano, M.P. (2014). Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods *in vitro* and in model food emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 911-918.
- [11] Mai, T.T., Thu N. N., Tien P.G., Van Chuyen, N. (2007). Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(3), 267-276.
- [12] Tomy M. J., Sharanya C. S., Dileep K. V., Prasanth S., Sabu A., Sadasivan C., Haridas M. (2014). Derivatives form better lipooxygenase inhibitors than piperine: *in vitro* and in silico study. *Chemical Biology and Drug Design*, 85(6), 715-721.
- [13] Kulkarni, S.G., Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.). *Food Science and Technology*, 43(7), 1026-1031.
- [14] Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010). Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4(2), 77-87.
- [15] Prakash, C.V.S., Prakash, I. (2011). Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel-a review. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 1(1), 1-18.
- [16] Amyrgialaki, E., Makris, D.P., Mauromoustakos, A., Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216-222.
- [17] Nahar, P.P., Driscoll, M.V., Li, L., Slitt, A.L., Seeram, N.P. (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Functional Foods*, 6, 126-136.
- [18] Li, Y., Guo, C., Jijun, Y., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.
- [19] Yılmaz, B., Usta, C., (2011). Narın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. *Türk Aile Hekimliği Dergisi*, 14(3), 146-153.
- [20] Mphahlele, R.R., Fawole, O.A., Makunga, N.P., Opara, U.L. (2016). Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 143.
- [21] Malviya, S., Jha, A., Hettiarachchy, N. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4132-4137.
- [22] Marchi, L.B., Monteiro, A.R., Mikcha, J.M., Santos, A.R., Chinellato, M.M., Marques, D.R., Costa, S.C. (2015). Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of pomegranate peel extract (*Punica granatum* L.) under different drying temperatures. *Chemical Engineering Transactions*, 44, 121-126.
- [23] Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Özkan, M. (2017). Effects of extraction solvents on polyphenol contents, antioxidant and antibacterial activities of pomegranate parts. *Academic Food Journal/Akademik Gıda*, 15(2), 109-118.
- [24] Al-Zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244-248.
- [25] Jain, V., Viswanatha, G.L., Manohar, D., Shivaprasad, H.N. (2012). Isolation of antidiabetic principle from fruit rinds of *Punica granatum*. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 147202, 1-11.
- [26] Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 980-985.
- [27] Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D. (2006). Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- [28] Ackland, M.L., VandeWaarsenburg, S., Jones, R. (2005). Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*, 19, 69-76.
- [29] Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraiishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H., Sakai, T. (2005). Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in

- human malignant tumor cells. *Oncogene*, 24(48), 7180-7189.
- [30] Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5636–5645.
- [31] Hou, D.X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M., Fujii, M. (2003). Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: Structure-activity relationship and mechanisms involved. *International Journal of Oncology*, 23(3), 705-712.
- [32] Lansky, E.P., Harrison, G., From, P., Jiang, W. G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across matrigel. *Investigational New Drugs*, 23, 121-2.
- [33] Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu. *Gıda* (kabul edildi, basımda)
- [34] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2184.
- [35] Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4):1409-1418.
- [36] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- [37] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- [38] Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Chaidez-Ayala, A. I., Ramírez-Noya, D., Delgado-Alvarado, E. A., Torres-Ricario, R., Alanís-Bañuelos, R.E. (2018). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenaceae as antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian Journal of Biology*, 78(1), 98-107.
- [39] Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- [40] Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- [41] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- [42] Ebrahimabadi, A.H., Bidgoli, Z., Mazoochi, A., Kashi, F.J., Batooli, H. (2010). Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. *Food Control*, 21, 1173-1178.
- [43] Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D., Azeri, C. (2007). *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un antimikrobiyal etkisinin çukur ve disk diffüzyon yöntemiyle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi. *Ekoloji Dergisi*, 16, 62-65.
- [44] Worthington, V. (1993) Alpha amylase. In: Worthington V, ed. *Worthington Enzyme Manual; enzymes and related biochemicals*. Lakewood, NJ: Worthington Biochemical Company, 36-41.
- [45] Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- [46] Alaba, C.S.M., Chichioco-Hernandez, C.L. (2014). 15-Lipoxygenase inhibition of *Commelina benghalensis*, *Tradescantia fluminensis*, *Tradescantia zebrina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (3), 184-188.
- [47] Nessa, F., Ismail, Z., Mohamed, N. (2010). Xanthine oxidase inhibitory activities of extracts and flavonoids of the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharmaceutical Biology*, 48(12), 1405-1412.
- [48] Betancur-Galvis, L.A., Morales, G.E., Forero, J.E., Roldan, J. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 541-546.
- [49] Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(6), 650-664.
- [50] Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. J., Nicoli, M.C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109-117.
- [51] Singh, R.P., Chidambara-Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (1), 81-86.
- [52] Ibrahim, M.I. (2010). Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6 (4), 338-344.
- [53] Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.
- [54] MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.

- [55] Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., Rizvi, S.S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.
- [56] Fawole, O.A., Makunga, N.P., Opara, U.L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 200.
- [57] Farag, M.A., Al-Mahdy, D.A., Salah El Dine, R., Fahmy, S., Yassin, A., Porzel, A., Brandt, W. (2015). Structure activity relationships of antimicrobial gallic acid derivatives from pomegranate and acacia fruit extracts against potato bacterial wilt pathogen. *Chemistry & Biodiversity*, 12(6), 955-962.
- [58] Gullon, B., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, 59, 94-98.
- [59] Dik, B. (2013). Metabolik sendromun tedavisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(3), 259-269.
- [60] Jung, M., Park, M., Lee, H.C., Kang, Y.H., Kang, E.S., Kim, S.K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (10), 1203-1218.
- [61] Longo, R. (2010). Diabetes under control: Understanding oral antidiabetic agents. *The American Journal of Nursing*, 110(2), 49-52.
- [62] Çam, M., İçyer, N.C. (2015). Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1489-1497.
- [63] Šavikin, K., Živković, J., Alimpić, A., Zdunić, G., Janković, T., Duletić-Laušević, S., Menković, N. (2018). Activity guided fractionation of pomegranate extract and its antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative properties. *Industrial Crops and Products*, 113, 142-149.
- [64] Kam, A., Li, K.M., Razmovski-Naumovski, V., Nammi, S., Shi, J., Chan, K., Li, G.Q. (2013). A Comparative Study on the Inhibitory Effects of Pomegranate on α -Amylase and α -Glucosidase. *Phytotherapy Research*, 27(11), 1614-1620.
- [65] Hasenah, P., Houghton, J., Soumyanath, A. (2006). α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 10(3), 449-455.
- [66] Trouillas, P., Calliste, C.A., Allais, D.P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., Duroux, J.L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, 80(3), 399-407.
- [67] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. (2006). İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 21-37s, Ankara.
- [68] Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai, E.F., Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase—mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS Journal*, 275(13), 3278-3289.
- [69] Çam, M., İçyer, N.C., Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 117-123.
- [70] Akhtar, S., Ismail, P., Riaz, M., Ismail, A., Labbe, R.G. (2016). Antioxidant, antimicrobial and urease inhibitory activities of phenolics-rich pomegranate peel hydro-alcoholic extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 550-558.
- [71] Tew, K.D., Gate, L. (2001). Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 5(4), 477.
- [72] Çağlar, H.O., Süslüer, S.Y., Kavaklı, Ş., Gündüz, C., Ertürk, B., Özkınay, F., Haydaroğlu, A. (2017). Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş mRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi*, 56(4), 183-192.
- [73] Hwang, H.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Lee, S.K. (2005). Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(5), 356-362.
- [74] Yang, J.H.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D., Chou, C.C., Wei, Y.H., Hchung, J.G. (2006). Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(1), 296-304.
- [75] Lea, M.A., Xiao, Q., Sadhukhan, A.K., Cottle, S., Wang, Z.Y., Yang, C.S. (1993). Inhibitory effects of tea extracts and (-)-epigallocatechin gallate on DNA synthesis and proliferation of hepatoma and erythroleukemia cells. *Cancer letters*, 68(2), 231-236.
- [76] Sakarkar, D.M., Deshmukh, V.N. (2011). Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), 298-308.
- [77] Moradzadeh, M., Roustazadeh, A., Tabarraei, A., Erfanian, S., Sahebkar, A. (2017). Epigallocatechin-3-gallate enhances differentiation of acute promyelocytic leukemia cells via inhibition of PML-RAR α and HDAC1. *Phytotherapy Research*, 3, 1-9.