

Ateş Dikeni (*Pyracantha coccinea*) Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin, Antienzim, DNA Koruma/Kırılma ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması

Merve BALABAN¹, Şule Azime YENİÇERİ², Ebru AKKEMİK^{3*}, Bülent HALLAÇ⁴, Mehmet FİDAN⁵

¹Siirt. Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 56100, Siirt

²Siirt Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Gıda İşleme Bölümü, 56100, Siirt

^{3,4}Siirt Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 56100, Siirt

⁵Siirt Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 56100, Siirt

¹ <https://orcid.org/0000-0002-4188-1110>

² <https://orcid.org/0000-0003-4014-5274>

³ <https://orcid.org/0000-0002-4177-4884>

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-6948-1565>

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-0255-9727>

*Sorumlu yazar: eakkemik@siirt.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 09.05.2024

Kabul tarihi: 12.08.2024

Online Yayınlanma: 15.01.2025

Anahtar Kelimeler:

Tirozinaz

Glutatyon-S transferaz

Enzim aktivitesi

ÖZ

Ateş dikeni (*Pyracantha coccinea*) bitkisi sahip olduğu sekonder metabolitler sayesinde birçok hastalığın tedavisinde kullanıma potansiyeli taşımaktadır. Ancak literatürde *P. coccinea*'nin farmakolojide kullanımı ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Yapılan çalışmada *P. coccinea*'nin meyve ve yaprak metanol ekstreleri hazırlanarak antienzim aktivitesi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. Bu sebeple kanser tanı ve tedavisi ile ilişkisi olduğu literatürlerce bilinen Glutatyon-S transferaz (GST) ve Tirozinaz (TYR) enzim aktiviteleri üzerine *P. coccinea*'nin yaprak ve meyve ekstrelerinin etkisi belirlenmiştir. İlk kez *P. coccinea*'nin meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin DNA koruma/kırılma etkisi ve her iki ekstreinin *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29242), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. *P. coccinea*'nin yaprak ekstrelerinin GST'yi mikromolar düzeyde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Her iki ekstreinin TYR enzim aktivitesi üzerinde yeterli etki göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin DNA kırılmasına yol açmadığı ve 1 mg/mL konsantrasyonda koruma etkisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ancak ekstreler çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak *P. Coccinea* bitkisinin aday ilaç çalışmaları için doğal kaynak olabileceğini buna karşın ilave prelinik ve klinik çalışmalarla bitkinin tam potansiyelinin ortaya çıkarılması gerektiği düşünülmektedir.

Investigation of Antienzyme, DNA Protection/Breaking and Antimicrobial Activity of Firethorn (*Pyracantha coccinea*) Fruit and Leaf Extracts

Research Article

Article History:

Received: 09.05.2024

Accepted: 12.08.2024

Published online: 15.01.2025

Keywords:

Tyrosinase

Glutathione-S transferase

Enzyme activity

ABSTRACT

Firethorn (*Pyracantha coccinea*) plant has the potential to be used in the treatment of many diseases thanks to its secondary metabolites. However, there are very few studies in the literature on the use of *P. coccinea* in pharmacology. Therefore, in this study, we aimed to investigate the antienzyme activity of *P. coccinea* under *in vitro* conditions by preparing fruit and leaf methanol extracts. The effect of *P. coccinea* leaf and fruit extract on Glutathione-S transferase (GST) and Tyrosinase (TYR) enzyme activities, which are known in the literature to be related to cancer diagnosis and treatment, was investigated. In this study, for the first time, the DNA

protection/breaking effect of fruit and leaf methanol extracts of *P. coccinea* was investigated. Additionally, the antimicrobial activity of both extracts against *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29242), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) microorganisms was investigated. It was determined that *P. coccinea* leaf extract inhibited GST at micromolar level. It was determined that both extracts did not have a sufficient effect on TYR enzyme activity. It was determined that the extracts did not cause DNA breakage and had a protection effect of 1 mg/mL concentration. However, it did not show antimicrobial activity against all microorganisms studied. As a result, we think that *P. coccinea* plant can be a natural source for candidate drug studies, but the full potential of the plant should be revealed with additional preclinical and clinical studies.

To Cite: Balaban M., Yeniçeri ŞA., Akkemik E., Hallaç B., Fidan M. Ateş Dikeni (*Pyracantha coccinea*) Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin, Antienzim, DNA Koruma/Kırılma ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2025; 8(1): 67-81.

1. Giriş

Çin, Himalayalar (Popoviciu ve ark., 2020), İtalya ve Türkiye'de farklı rakımlarda 3 m yüksekliğe kadar yetişen dikenli bir çalı olan ateş dikeni (*Pyracantha coccinea*), halk arasında tavşan elması, köpek elması, kuş alıcı gibi isimler ile bilinmektedir. *Rosaceae* familyasına ait olan bu çalı, süs bitkisi olarak kullanılmasının yanı sıra, çay, marmelat, reçel, jöle, yemeklik sos olarak pişirilebilen küçük, parlak kırmızı meyvelere sahiptir (Fico ve ark., 2000). Antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu belirtilen bitkinin, ayrıca meyvelerinin başta kalp-damar sağlığı olmak üzere geleneksel tıpta kullanılabileceği belirtilse de yapılan çalışmalar istenen düzeyde değildir (Sarikurkcu ve Tepe, 2015). Farmakolojide kullanım potansiyeli taşıyan Ateş dikeni meyvesinin bu özelliği içeriğindeki Se ve vitamin türevlerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Çöteli ve Karataş, 2017). Ancak ilave prelinik çalışmalar ile mekanizmaların ve farmakolojik süreçlerin aydınlatılması gerekmektedir.

Prelinik çalışmaların başında antienzim çalışmaları önem taşımaktadır çünkü enzimler birçok metabolik yolağı ve süreci doğrudan veya dolaylı olarak etkilerler. Bu nedenle enzimlerin aktiviteleri gen seviyesinde veya protein seviyesinde düzenlenerek metabolizmanın dengede kalması sağlanmaktadır. Günümüzde piyasada ilaç olarak kullanılan kimyasalların birçoğu aynı zamanda farklı enzimlerin spesifik inhibitörü veya aktivatörü olarak işlev görmektedir (Stamper ve ark., 2009; Aslam ve Gupta., 2023). Enzimlerin aktivitelerinin dengede kalmasını sağlamak için potansiyel inhibitörler/aktivatörler sentezlenmekte veya bitki ekstreleri yoluyla araştırılmaktadır (Akkemik ve ark., 2019; Akkemik ve ark., 2024). Araştırmalara konu olan enzimlerden biri kanser ile olan ilişkisi nedeniyle Glutatyon S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzimidir.

GST enzimleri, hücrenin farklı kısımlarında bulunan ve çok sayıda izoenzieme sahip olan eşsiz enzimlerdir. Sitoplazmik GST'ler, detoksifikasyon metabolizmasının bir parçası olan faz II enzimleri olarak bilinir ve en az 8 gruba ayrılır: [alfa (A), kappa(K), mu (M), omega (O), pi (P), sigma(S), teta(T) ve zeta (Z)] (Luo ve ark., 2011). GST'lerin işlevselliği (i) katalitik aktiviteleri–oksidatif stres, (ii) protein-protein etkileşimlerindeki rolü ve (iii) substrat olmayan ligandların GST'ler tarafından bağlanması olmak üzere üç kategoriye ayrılmıştır (Booth ve ark., 1961). GST'ler, elektrofil substratları

glutasyon ile konjuge ederek, ajanların inaktivasyonunu ve organizmadan atılmasını sağlamaktadır. Ancak bu süreç, sağlıklı organizmalarda sorunsuz ilerlerken kanser hastalarında tedavi direncine yol açan bir sürece dönüşebilir. Çeşitli kanser türleri ve dokuları üzerinde yapılan çalışmalar, GST'nin çeşitli izoenzimlerinin katı kanserlerde ilaç direncini artırdığını göstermiştir. Özellikle akciğer, yumurtalık ve mide kanserleri, kemoterapik ilaçlara karşı yüksek direnç göstermektedir (Singh ve Reindl, 2021; Özaslan, 2024). Ayrıca GST izoenzimlerinden biri olan GSTP1-1'in farklı insan tümörlerinde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir (Tew, 1994; Hamada ve ark., 1994; Yang ve ark., 2006; Özaslan, 2024). Tüm bu veriler ışığında özellikle kanser hastalarında GST'lerin aktivitelerinin durdurulması veya azaltılması kanser tedavisinde umut verici olabilmektedir. (Hayes ve ark., 2005; Tew ve Townsend, 2012; Boardve Menon, 2013; Özaslan, 2024). Bu nedenle araştırmacılar söz konusu enzimin yeni inhibitörlerini araştırmaya devam etmektedir (Özaslan, 2024). Ancak tasarlanan sentetik inhibitörlerin ilaç olarak kullanılabilmesi yüksek bir maliyet ve zaman gerektiren süreçleri içermektedir (Anonim, 2024). Bu bağlamda, enzimin doğal inhibitörlerinin bulunması, hastalığın tedavisi sırasında takviye gıda olarak kullanım kolaylığı sağlayabilir ve yeni inhibitörlerin tasarımı için araştırmacılara rehberlik edebilir.

Araştırmalara konu olan diğer bir enzim ise tirozinaz (TYR; EC 1.14.18.1) enzimidir. Enzim polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz isimleri ile de bilinmektedir. Doğada oldukça yaygın olan (Cooksey ve ark., 1997; Calay, 2010) tirozinaz başta bitkiler olmak üzere neredeyse tüm canlılarda bulunmaktadır (Parvez ve ark., 2007; Khan, 2006; Calay, 2010). Enzim bir biyopolimer olan melanin sentezinde görev almaktadır (Riley, 1997; Smit ve ark., 2003; Hałdys ve ark., 2020; Baber ve ark., 2023). Aktif merkezinde bakır iyonu ve histidin amino asidi içeren tirozinaz melanin üretiminde hız sınırlayıcı basamaklarda görev aldığı için anahtar enzimdir (Seo ve ark., 2003; Chang, 2009; Gasparetti ve ark., 2012; Zaidi ve ark., 2014; Yu ve ark., 2018; Matoba ve ark., 2018; Baber ve ark., 2023). Bu nedenle tıp, kozmetik ve tarım endüstrisinde oldukça önemlidir. Melanin, insanlarda UV ışınlarına karşı koruma sağlayan gözlerde, saçlarda ve ciltteki pigmentasyondan sorumludur (Brenner ve Hearing, 2008; Baber ve ark., 2023). TYR'nin aşırı aktivitesi veya aşırı ekspresyonu, hiperpigmentasyon bozukluklarla ve melanomlarla ilişkilendirilmiştir. Dahası meyve ve sebzelerde TYR aktivitesi enzimatik esmerleşmeye veya olgunlaşmaya sebep olmaktadır. Buda gıdaların raf ömrünü kısaltan bir etkidir. Bu nedenle TYR inhibitörleri, gıdaların korunmasında veya melanin birikimiyle ilişkili bozuklukların ve hastalıkların tedavisinde potansiyel tıbbi ajanlar olarak değerlendirilebilir (Chang, 2009; Deering ve ark., 2016; Baber ve ark., 2023). Çok sayıda çalışma TYR'nin hem sentetik hem de doğal inhibitörlerini tanımlamıştır (Baber ve ark., 2023). Ancak, birçok TYR inhibitörü, etkinlik eksikliği ve/veya kanserojenlik, sitotoksikite gibi toksisite nedeniyle yaygın kullanım görmemiştir (Baber ve ark., 2023). Dolayısıyla enzimin yeni doğal inhibitörlerinin araştırılması oldukça önemli bir hale gelmiştir.

Klinik öncesi çalışmaların önemli bir ayağını da DNA koruma etkisi ve antimikrobiyal aktivite oluşturmaktadır. DNA'da meydana gelebilecek bir hasar protein seviyesinde veya gen seviyesinde bir

mutasyona sebep olmaması için replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi normal hücrel mekanizmalar ile onarılmaktadır. Ancak her zaman bu mümkün olmamaktadır (de Almeida ve ark., 2015; Ramadan, 2019). Çünkü biyolojik, kimyasal ve toksik materyaller ile oluşan bazı DNA hasarları normal hücrel mekanizmaları engeller, bunun sonucunda genetik ve kanserli hastalıkların oluşumuna zemin hazırlanmış olur (de Almeida ve ark., 2015; Ramadan, 2019). Sonuç olarak ilaç adayı olarak üretilen birçok kimyasalın muhtemel yan etkisi DNA hasarına sebep olabilir. Bu bağlamda, sentezlenen veya ekstrakte edilen ilaç adaylarının potansiyel yan etkileri, özellikle DNA hasarına neden olma riski göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Bu nedenle, DNA koruma etkisi veya DNA hasarı çalışmaları, aday ilaçların ve tedavi yöntemlerinin güvenliğini ve etkinliğini belirlemek için önemlidir. Bununla birlikte Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 21. yüzyılın en büyük halk sağlığı tehditlerinden biri olarak kabul edilen mikrobiyal hastalıklar özellikle düşük, orta-alt gelirli ülkeler için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (World Health Organization, 2020; Murray ve ark., 2020; Bhattarai ve ark., 2021). 2019 yılında meydana gelen ölümlerin yaklaşık %12'si bulaşıcı hastalıklar nedeniyle gerçekleşmiştir (GBD, 2019; Bhattarai ve ark., 2021). Bu durumun güncel verilerin işlenmesine bağlı olarak Covid 19 salgın hastalığının da verilere dahil edilmesi ile daha dramatik bir tabloya dönüşeceği düşünülmektedir. Bu etkenler ışığında patojen mikroorganizmalara karşı başta antibakteriyel ilaç tasarımları olmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Belirtilen gerekçeler neticesinde Ateş dikenini (*Pyracantha coccinea*)'nin meyve ve yaprak ekstraktı hazırlanarak, antienzim, DNA koruma ve antimikrobiyal analizleri *in vitro* şartlarda gerçekleştirilmiştir. Böylece ekstraktların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeli ve elde edilen verilerin ilaç tasarımı yapan araştırmacılara yol gösterici bir kaynak oluşturması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

pBR322 plazmit DNA Thermo Scientific firmasından, metanol, etanol, DMSO (Dimetil sülfoksit), 1,2-Dihydroxybenzene, 1-kloro-2,4- dinitrobenzene, GSH, H₂O₂, askorbik asit, FeCl₃, EDTA, Tris, K-Fosfat, Etanol, Borik asit Sigma Aldrich Firmasından elde edilmiştir. Muz (*Musa acuminata*) tirozinaz (Yeniçerive ark., 2023), ve Shabut (*Barbus grypus*) balık Glutatyon S transferaz (Balaban M., ve Akkemik E., (2021)) enzimleri daha önceki çalışmalarımızdan elde edilmiştir.

2.2. Metot

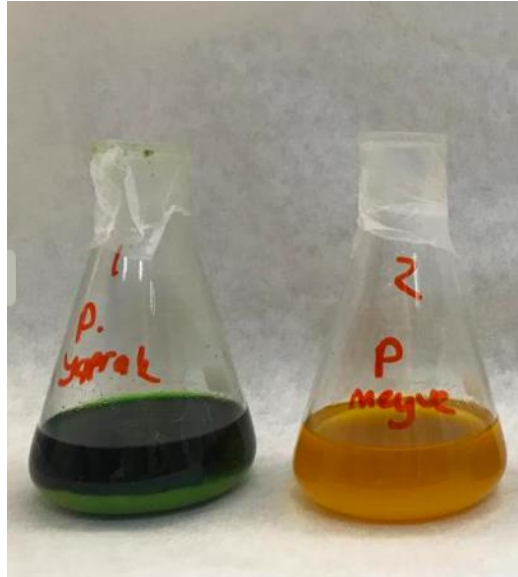
2.2.1 *Pyracantha coccinea* bitki ekstraktının hazırlanması

Pyracantha coccinea meyvesi ve yaprakları Siirt Üniversitesi, Kezer Yerleşkesinden temin edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Pyracantha coccinea* bitkisi (Siirt Üniversitesi, Kezer Yerleşkesi, 01.11.2023)

Türün tespitini Siirt Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet Fidan yapmıştır. Ekstraksiyon için doku örnekleri uygun koşullarda laboratuvarımıza taşınmıştır. Bitkilerin ekstraksiyonu Karacaer (2023)'in uyguladığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. 5 gram bitki tartılıp üzerine 50 mL çözücü (metanol %100) eklenip homojenize (IKA/T18) edilerek erlenmayere aktarılmıştır. Çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm hızda oda sıcaklığında gece boyunca inkübe (Selecta Rotabit) edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Pyracantha coccinea* yaprak ve meyve bitki ekstresi

Ardından elde edilen çözelti filtre kâğıdı ile süzildükten sonra, süzüntü 40°C vakum altında evapore (Heidolph/Heizbad-heivap) edilerek çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kuru madde DMSO (% 10, v/v) ile yeniden çözülmüş, konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır ve gerekli seyreltmeler saf su ile yapılmıştır. Tüm çalışma +4°C'de yürütülmüştür.

2.2.2. Enzim İnhibisyonu

Örneklerin tirozinaz enzim aktivitesi tayini için (Duckworth ve Coleman, 1970; Şakiroğlu, 1994) literatürdeki yöntemler laboratuvar şartlarımıza göre modifiye edilerek kullanılmıştır. Enzim aktivitesi A420 nm'de bir dakikada 25°C'de pH 7,5'te 1,2-Dihydroxybenzene içeren 3 mL'lik reaksiyon ortamında 0,001 absorbans artışının ölçülmesi ile 420 nm'de spektrofotometrik (VWR UV/VIS Spektrofotometre VWR UV-1600PC) belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi, absorbansta dakikada 0,001 değişime neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Wong ve ark., 1971). Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi ölçümünde Habig ve ark., (1974)'ün yöntemi laboratuvar şartlarımıza göre modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre pH 7,0'de 0,5 mM 1-kloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB) ve 1 mM GSH içeren 1 mL'lik reaksiyon ortamına enzim ilave edilmesi ile absorbans artışı 3 dakika boyunca 340 nm'de spektrofotometrik (VWR UV/VIS Spektrofotometre VWR UV-1600PC) olarak ölçülmüştür. Ekstraktların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için reaksiyon ortamlarına en az 5 farklı konsantrasyonda *P. coccinea* yaprak ve meyve ekstraktları eklenip absorbans değerleri kaydedilmiştir. %Aktiviteye karşı konsantrasyon grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ekstrakt ilave edilmeyen reaksiyon ortamında enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir (Akkemik ve ark., 2022).

2.2.3. *Pyracantha coccinea* yaprak ve meyve ekstraktlarının DNA koruma/kırılma etkisi

Akkemik ve ark., (2022) yöntemi kullanılarak *P. coccinea* yaprak ve meyve ekstraktları Fenton çözeltisinin pBR322 plazmit DNA üzerine zararlı etkilerini korumak için kullanılmıştır. Ayrıca bu ekstraktların DNA kırılma etkisi de araştırılmıştır. Her bir bitki doku ekstraktı için iki farklı konsantrasyon (0,5 mg/mL ve 1 mg/mL) uygulanarak deney tasarımı için negatif (sadece plazmit DNA) ve pozitif kontrol (Fenton + plazmit DNA) grupları oluşturulmuştur. Buna göre inkübe edilecek reaksiyon karışımları 3 µL pBR322 plazmit DNA, 5 µL Fenton solüsyonu (30 mM H₂O₂, 50 mM askorbik asit ve 80 mM FeCl₃) ve farklı konsantrasyonlardan 5 µL (0,5 mg/mL ve 1 mg/mL) bitki ekstraktları alınarak son hacim distile su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından reaksiyon karışımına 3 µL 6x yükleme boyası ilave edilerek oluşan karışımdan 10 µL alınıp EtBr ile işaretlenerek %0,8'lik agaroz jeline yüklenmiştir. Agaroz jeli elektroforezi (Major Science) 100 voltta 60 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel görüntüleme cihazı (Major Science) ile jel görüntüsü alınmıştır.

2.2.4. *Pyracantha coccinea* yaprak ve meyve ekstraktlarının Antimikrobiyal etkisi

Antimikrobiyal etkinin (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29242, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231) belirlenmesinde Agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Temiz 2010). Her bir bakteri ve maya hücresi aktifleştirildikten sonra 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmış 0,6 cm çapındaki

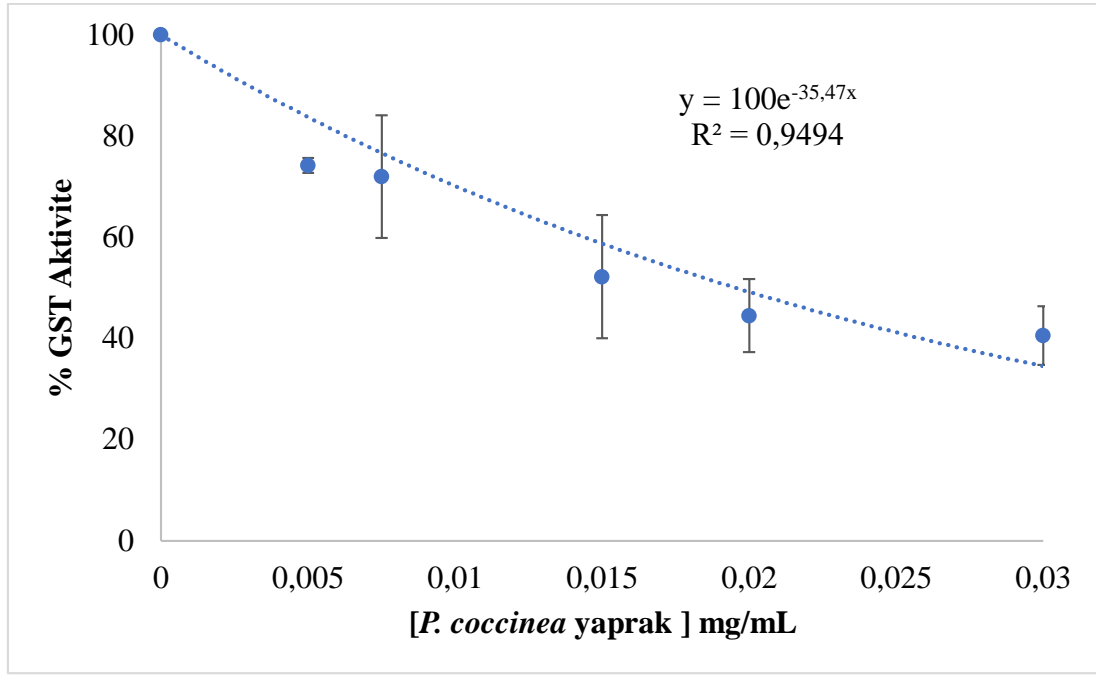
kuyucuklara 1 mg/mL konsantrasyondaki örnek 30 mikrolitre ilave edildikten sonra 37°C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübe edilmiştir (Yeniçeri ve ark., 2023).

2.2.5. İstatistik Analiz

Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için Microsoft Excel programı kullanıldı. Tüm verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplandı.

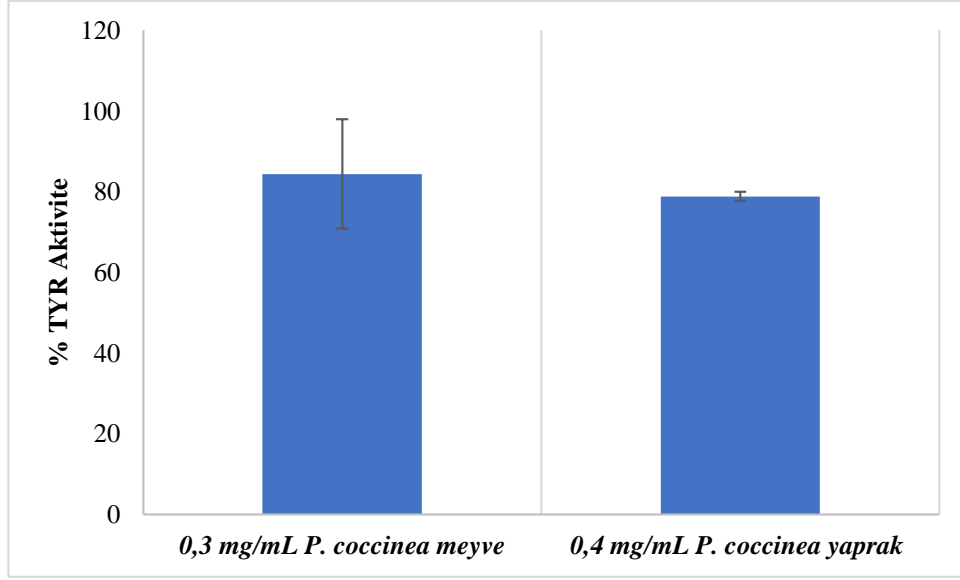
3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızın ilk adımını antienzim aktivite analizleri oluşturmaktadır. *P. coccinea*'nın meyve ve yaprak ekstralarının GST ve TYR enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri *in vitro* şartlarda belirlenmiştir. *P. coccinea*'nın yaprak ekstresi GST enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken IC₅₀ değeri 19,587±3,320 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3). *P. coccinea*'nın meyve ekstresi ise GST enzim aktivitesi üzerinde yaklaşık %22,736 inhibisyon etkisi göstermiştir. *P. coccinea*'nın meyve ve yaprak ekstralarının GST enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ilk kez ekibimiz tarafından çalışılmıştır. Yaprak ekstresinin mikro düzeyde inhibisyon etkisi, ilaç tasarımı çalışmaları için umut verici bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Ancak ileri çalışmalarda yaprak ekstresinin içeriği ve etken maddelerinin belirlenmesi, özellikle ilaç tasarımı çalışmaları için önemlidir. Dahası bugüne kadar çalışmamızla benzer şekilde GST enzim aktivitesi üzerine çeşitli bitki ekstralarının inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Siyah havuç'un (*Daucus carota L. ssp*) metanol ekstresinin GST (IC₅₀12,84 mM), asetil kolinesteraz (AChE; IC₅₀ 15,07 mM), ve Alfa-glikozidaz (α - Gly IC₅₀11,75 mM) enzim aktiviteleri üzerinde *in vitro* şartlarda inhibisyon etkisi gösterdiği ifade edilmiştir (Atalar ve ark., 2021). AChE ve GST enzim aktiviteleri üzerine *R. acetosella* metanol ekstresinin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada GST için IC₅₀ değeri 9,10mg/mL, AChE için 9,23 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Irteğün Kandemir ve ark., 2024). Her iki çalışmanın sonuçları ile çalışmamız kıyaslandığında *P. coccinea*'nın yaprak ekstresinin GST enzim aktivitesi üzerindeki etkinliğinin daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Ancak *P. coccinea*'nın meyve ekstresinin inhibisyon etkinliğinin daha az olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar neticesinde bitkilerin sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde yaprak, meyve, kök gibi farklı kısımlarından hazırlanan ekstraların inhibisyon etkinliğinin ayrı ayrı analiz edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.



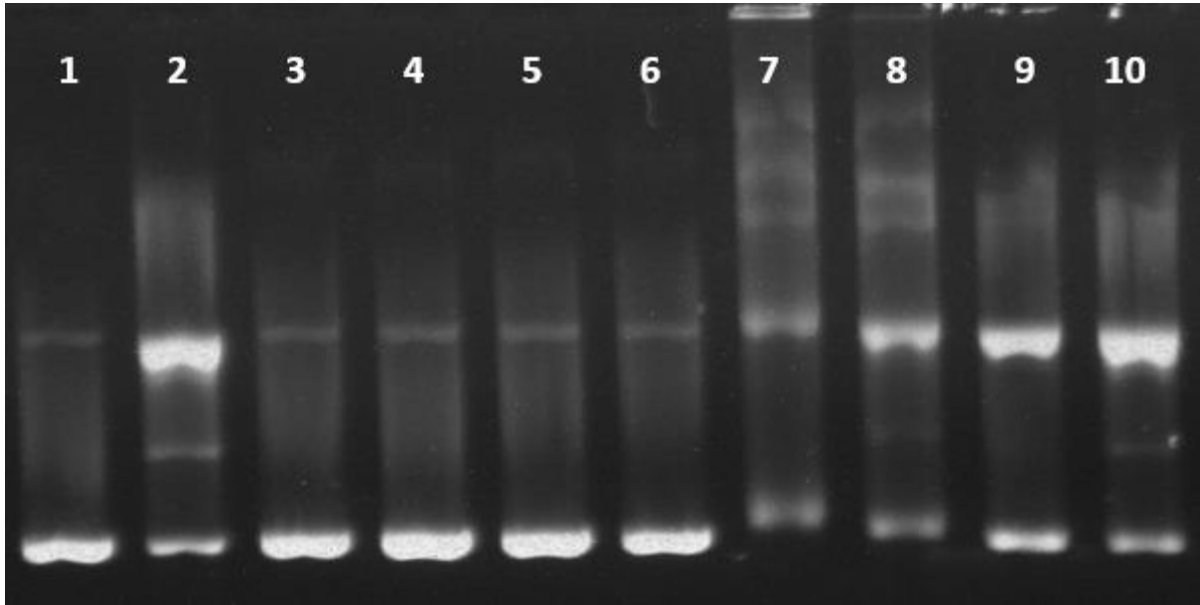
Şekil 3. *P. coccinea* yaprak ekstraktının GST enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkisi

P. coccinea'nin meyve ve yaprak ekstrelerinin TYR enzim aktivitesi üzerindeki etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. 0,3 mg/mL *P. coccinea* meyve ekstresi yaklaşık %15,655'lik bir inhibisyon sergilerken 0,4 mg/mL *P. coccinea* yaprak ekstresi yaklaşık %21,175'lik bir inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 4). Her iki ekstrenin TYR enzim aktivitesi üzerinde istenen düzeyde bir inhibisyon profili sergilemediği tespit edilmiştir. Buna karşın literatürde *P. coccinea* meyvenin etanol ve su ekstresinin asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz, α -amilaz, α -glukosidaz ve tirozinaz enzim aktiviteleri üzerinde inhibisyon profilinin incelendiği çalışmada elde edilen ekstraktların asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz üzerinde oldukça zayıf inhibitör aktivite gösterdiği en yüksek inhibisyonu etanol ekstresinin α -glukosidaz üzerinde yaptığı (9,94 mg ACE/g taze meyve) bunu tirozinaz (3,72 mg kojik asid equivalent/g taze meyve) ve α -amilaz (2,24 mg akarboz equivalent/g taze meyve)'in takip ettiği belirtilmiştir (Sarıkurucu ve Tepe., 2015). Yaptığımız çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmesine karşın *P. coccinea* meyve etanol ve su ekstresinin tirozinaz üzerinde yüksek bir inhibisyon profili sergilemediği görülmektedir. 0,3 mg/mL *P. coccinea* meyve ekstresi uygulandığında TYR'nin aktivitesi %84,345 \pm 13,544 iken, 0,4 mg/mL *P. coccinea* yaprak uygulandığında TYR aktivitesi %78,825 \pm 1,153'dür. Dahası çalışmamızda metanol ekstresi kullanıldığı için *P. coccinea* meyve ekstresinin içerisinde çözücüye bağlı olarak çözünen sekonder metabolitler değişeceği için farklı inhibisyon profili sergilediği düşünülmektedir. Ayrıca *P. coccinea* yaprak ekstresi GST de olduğu gibi TYR'de de daha iyi bir inhibisyon profili sergilemiştir. Çalışmamız kendi içerisinde tutarlı sonuçlar üretmiştir.



Şekil 4. *P. coccinea* yaprak ve meyve ekstraktlarının TYR enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkisi

Pyracantha coccineay yaprak ve meyve ekstraktlarının DNA koruma/kırılma etkisi incelendiğinde (Şekil 5) çalışılan ekstraktların her iki konsantrasyonun da DNA üzerinde kırılmaya veya hasara yol açmadığı görülmektedir. Dahası ortamda Fenton çözeltisi varlığında da yaprak ve çiçek 1 mg/mL konsantrasyonun DNA üzerinde koruma etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. *Pyracantha coccineay* yaprak ve meyve ekstraktlarının DNA koruma/ kırılma etkisi ilk kez ekibimiz tarafından incelenmiştir.



Şekil 5. *P. coccinea* yaprak ve meyve ekstraktlarının DNA koruma/kırılma aktivitesine ait jel agaroz görüntüsü. 1. Negatif kontrol (pBR322 plazmit DNA), 2. Pozitif kontrol (pBR322 plazmit DNA+Fenton reaktifi), 3-4. *P. coccinea* yaprak (1-0,5 mg/mL), 5-6. *P. coccinea* meyve (1-0,5 mg/mL), 7-8. *P. coccinea* yaprak (1-0,5 mg/mL)+Fenton reaktifi, 9-10. *P. coccinea* meyve (1-0,5 mg/mL)+Fenton reaktifi.



Şekil 6. *P. coccinea* yaprak ve meyve ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği

P. coccinea yaprak ve meyve ekstraktlarının incelenen patojen bakteri ve maya hücrelerine karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 6). Tunç ve arkadaşları (2020), *Pyracantha coccinea* meyvesi etanolik ekstraktlarının (6,4 mg/mL) antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemiyle *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 1029 suşları üzerinde pozitif kontrol olarak Gentamisin ve Amfoterisin B kullanarak incelemiştir. Bu çalışmada bu suşlar üzerinde antimikrobiyal etki gözlemlenemediklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Uçar-Türker ve ark. (2012) da *Pyracantha coccinea* meyve özütünde herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edememişlerdir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Pyracantha coccinea* meyve ekstraktının doğal bir antimikrobiyal ajan olarak etkisinin zayıf olduğu söylenebilir. Bir başka çalışmada etanol, dietil eter ve sıcak su gibi farklı çözücüler kullanılarak elde edilen *Pyracantha coccinea* meyve özütlerinin agar kuyu difüzyon yöntemiyle *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri pozitif kontrol olarak Gentamisin kullanılarak test edildiği çalışmada *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı üç özütün de antimikrobiyal aktivite sergilediği, en yüksek etkinin sıcak su özütünden sağlandığı bildirilmiştir (Karacaer, 2023). Turu ve ark., (2020), 45 bakteri (standart suş, gıda kökenli, klinik izolat, çoklu ilaç direnci gösteren) ve 3 maya (standart suş ve klinik izolat) olacak şekilde 48 farklı mikroorganizma üzerine *P. coccinea* etanolik meyve ekstraktının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi kullanarak test etmişlerdir. Disklere 50, 100 ve 200 µL emdirilen ekstraktlarda antimikrobiyal

aktivitenin konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı belirlendiği bildirilmiştir. Araştırmacıların bu çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre *B. cereus*, *E. faecium*, *S. hominis*, *S. warneri* ve *S. aureus* gibi Gram pozitif bakterilerin de yer aldığı 22 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir. Özellikle tıbbi yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonlardan sorumlu *S. aureus*'a karşı *P. coccinea*'nın aktif bir etkisi olduğunu savunmuşlardır. Bitkilerde var olan fenolikler, flavonoidler, organik asitler gibi ikincil metabolitler antioksidan görevi görürler. Bilindiği üzere antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizleyerek bunların oluşumunu engeller. Böylece canlı organizmalardaki hasarların onarılması ve canlılar üzerindeki enfeksiyonlara karşı koruma sağlamış olurlar (Sadeghi ve ark., 2015). Ayrıca anti-kanser, anti-inflamasyon ve anti-aging gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptirler (Zou ve ark., 2016). Ancak bitkilerin sahip olduğu sekonder metabolitlerin cinsi, çeşidi ve konsantrasyonu yetiştikleri topraklara göre değişmektedir. Bunun sonucunda da mikroorganizmalar üzerinde farklı etkiler sergilemektedirler. Ayrıca yukarıdaki kaynaklar ve çalışmamızda elde ettiğimiz veriler neticesinde *P. coccinea*'nın mikroorganizmaya göre de antimikrobiyal etkinliğinin değiştiği söylenebilir.

5. Sonuçlar

P. coccinea'nın meyve ve yaprak metanol ekstraktları hazırlanarak ilk kez *in vitro* şartlarda GST enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırıldı. Yaprak ekstresinin mikromolar seviyede inhibisyon etkisi göstermesi kanser tedavisinde kullanılabilecek bir potansiyel taşıdığını sergilemiştir. Ancak *P. coccinea*'nın klinik ve faz çalışmalarının yapılması ekibimizce önerilmektedir. Bununla birlikte özellikle GST enzim aktivitesi üzerindeki etkiyi yaratan etken maddenin tespit edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. TYR enzim aktivitesi üzerindeki etki düzeyi her iki ekstre için istenen düzeyde olmasa da yaprak ekstresinin nispeten inhibisyon etkisinin daha iyi olduğu görülmektedir. Bunun sonucunda da bitkinin yaprak içeriğinin meyve içeriğinden fenolik ve flavonoidlerce daha zengin olduğunu düşünmekteyiz. *P. coccinea*'nın meyve ve yaprak metanol ekstraktları DNA koruma/kırılma etkisi ilk kez ekibimiz tarafından çalışılmıştır. *P. coccinea*'nın DNA üzerinde bir hasar oluşturmadığı gibi 1 mg/mL konsantrasyonda fenton çözeltisinin hasar oluşturmaya engel olduğu tespit edilmiştir. Toksik bileşiklerin oluşturacağı zararı en aza indirmek ve ilaç tasarımında oluşabilecek yan etkileri tolere etmek için *P. coccinea*'nın iyi bir potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. Son olarak *P. coccinea*'nın meyve ve yaprak metanol ekstraktlarının 1 mg/mL konsantrasyonu çalıştığımız mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinliğe sahip olmadığı belirlenmiştir. Ancak çok sayıda patojen bakteri, virüs ve mantar olduğunu düşünürsek bitkinin mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğinin araştırılmasının devam etmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları olarak aramızda herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederiz.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynakça

- Akkemik E., Aybek A., Felek İ. Effects of cefan melon cucumis melo l seedextracts on human erythrocyte carbonicanhydrase i-ii enzymes. Applied Ecology And Environmental Research 2019; 17(6): 14699-14713.
- Akkemik E., Fidan M., Balaban M., Inal B. ICP-OES And LC-ESI-MM/MM analyses, enzyme inhibition and DNA protection potential of pelargonium quercetorum agnew. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia 2022; 67(4).
- Anonim. <https://www.pfizer.com.tr/pfizerde-Bilim/Arge/Ar-Ge-Ana-Sayfa>. 2024.
- Aslam S., Gupta V. Carbonic anhydrase inhibitors. [Updated 2023 Apr 17]. In: Statpearls [Internet]. Treasure Island (FL): Statpearls Publishing; 2024 Jan-. Available From: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk557736/>
- Atalar MN., Aras A., Türkan F., Barlak N., Yildiko Ü., Karatas OF., Alma MH. The effects of daucus carota extract against pc3, pnt1a prostate cells, acetylcholinesterase, glutathione s-transferase, and α -glycosidase; an in vitro–in silico study. Journal of Food Biochemistry 2021; 45(12): E13975.
- Baber MA., Crist CM., Devolve NL., Patrone JD. Tyrosinase inhibitors: a perspective. Molecules 2023; 28, 5762.
- Balaban M., Akkemik E. Investigation of natural inhibitors of liver glutathione s-transferase enzyme of shabut (barbus grypus) fish. International Siirt Conference on Scientific Research Siirt University, November 5-7 2021, 144s. Siirt, Türkiye
- Bhattarai S., Sharma BK., Subedi N., Ranabhat S., Baral MP. Burden of serious bacterial infections and multidrug-resistant organisms in an adult population of Nepal: A comparative analysis of minimally invasive tissue sampling informed mortality surveillance of community and hospital deaths. Clin Infect Dis. 2021; S415-S421.
- Board PG., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology, biochim. Biophys. Acta 2013; 1830, 3267-3288.
- Booth J., Boyland E., Sims AP. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochem. J., 1961; 79, 516.
- Brenner M., Hearing VJ. The protective role of melanin against uv damage in human skin. Photochem Photobiol 2008; 84, 539-549.
- Calay Ö., Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu. İstanbul Üniversitesi, Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü; Biyokimya ABS, 73s İstanbul, Türkiye, 2010.
- Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. Int. J. Mol. Science 2009; 10, 2440-2475.

- Cooksey CJ., Garratt PJ., Land EJ., Pavel S., Ramsden CA., Riley PA. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 26226-26235.
- Çöteli E., Karataş F. Ateş dikeninin (*pyracantha coccinea roemer var. lalandi*) kırmızı meyvelerindeki A, E, C vitamini, β -karoten, likopen, glutatyon ve malondialdehit miktarlarının araştırılması. *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi* 2017; 29(1): 41-46.
- De Almeida SM., Lafayette EA., Da Silva LP., Amorim CA., De Oliveira TB., Ruiz AL., De Carvalho JE., De Moura RO., Beltrão EI., De Lima MC., De Carvalho JL. Synthesis, dna bnding, and antiproliferative activity of novel acridine-tiosemikarbazon derivatives. *Int J Mol Science* 2015; 16(6): 13023-13042.
- Deering RW., Chen J., Sun J., Ma H., Dubert J., Barja JL., Seeram NP., Wang H., Rowley DC. N-acyl dehydrotyrosines, tyrosinase inhibitors from the marine bacterium *thalassotalea* sp. Pp2-459. *J. Nat. Prod.* 2016; 79, 447-450.
- Duckworth HW., Coleman JE. Sigma quality control test procedure, enzymatic assay of tyrosinase (*Ec* 1.14. 18. 1). *J. Biol. Chem.* 1970; 245, 1613-1625.
- Gasparetti C., Nordlund E., Jänis J., Buchert J., Kruus K. Extracellular tyrosinase from the fungus *trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta Bba Proteins Proteom.* 2012; 1824, 598-607.
- GBD. Demographics collaborators. global age-sex-specific fertility, mor- tality, healthy life expectancy (hale), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet* 2020; 396: 1160-203.
- Haldys K., Goldeman W., Jewgi 'Nski M., Woli 'Nska E., Anger-Góra N., Rossowska J., Latajka R. Halogenated aromatic thiosemikarbazones as potent inhibitors of tyrosinase and melanogenesis. *bioorg. Chem.* 2020; 94, 103419.
- Hamada SI., Kamada M., Furumoto H., Hirao T., Aono T. Expression of glutathione s-transferase- π in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy, *gynecol. Oncol.*, 1994; 52, 313-319.
- Hayes JD., Flanagan JU., Jowsey IR. Glutathione transferases, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.
- Irtegin Kandemir S., Aktepe N., Baran A. Determination of chemical composition and antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and enzyme inhibition activities of *rumex acetosella* L. *Plant Extract. Chem. Pap.* 2024.
- Karacaer NT. The medicinal effects of different solvent extracts of *pyracantha coccinea roem.* fruits: heavy metal content, antioxidant, and antimicrobial properties. *Bezmialem Science* 2023; 11(1).

- Khan AA., Akhtar S., Husain Q. Direct immobilization of polyphenol oxidases on celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*solanum tuberosum*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006; 40(1-2): 58-63.
- Luo W., Kinsey M., Schiffman JD., Lessnick SL. Glutathione s-transferases in pediatric cancer. *Front. Oncol.*, 2011; 1, 39.
- Matoba Y., Kihara S., Bando N., Yoshitsu H., Sakaguchi M., Kayama K., Yanagisawa S., Ogura T., Sugiyama M. Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the tyr 98 residue in the caddie protein. *Plos Biol.* 2018; 16(12): E3000077.
- Murray Cjl., Abbafati C., Abbas KM. Five insights from the global burden of disease study 2019. *Lancet* 2020; 396: 1135-1159.
- Özaslan MS. Investigation of potential effects of some indole compounds on the glutathione s-transferase enzyme. *Biochemistry Moscow* 2024; 89, 553-561.
- Parvez S., Kang M., Chung HS., Bae H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health. *Cosmetic and Agriculture Industries, Phytotherapy Research*, 2007; 21, 805-816.
- Popoviciu Dr., Negreanu-Pirjol T., Motelica L., Negreanu-Pirjol BS. Carotenoids, flavonoids, total phenolic compounds content and antioxidant activity of indigenous *pyracantha coccinea* M. roem. *Fruits. Rev Chim* 2020; 71: 258-266.
- Ramadan Mohamed AG. Izatin türevlerinin dna koruma, etkileşim ve antimikrobiyal aktivitesinin analizleri ve seftriakson-fenilalanin kombinasyonunun sinerjistik etkilerinin değerlendirilmesi. Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi Genetik Ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, 105s, Kastamonu, Türkiye, 2019.
- Riley PA., Melanin. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29, 1235-1239.
- Robert LS., Marc FL., Michael VD. Chapter 26 - Carbonic anhydrase inhibitors, editor(s): robert l stamper, marc f lieberman, michael v drake, becker-shaffer's diagnosis and therapy of the glaucomas (eighth edition), Mosby, 2009, Pages 407-419.
- Sadeghi Z., Valizadeh J., Azizian Shermeh O., Akaberi M. Antioxidant activity and total phenolic content of *boerhavia elegans* (choisy) grown in baluchistan, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2015; 5(1): 1-9.
- Seo SY., Sharma VK., Sharma N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 2837-2853.
- Şakiroğlu H. Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD, 121s, Erzurum, Türkiye, 1994.
- Sarikurkcü C., Tepe B. Biological activity and phytochemistry of firethorn (*pyracantha coccinea* m.j. roemer). *J Funct Foods* 2015; 19: 669-675.
- Singh RR., Reindl KM. Glutathione s-transferases in cancer. *Antioxidants* 2021; 10, 701.

- Smit N., Vicanova J., Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10, 5326–5349.
- Temiz A. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri (5. Baskı). HatiboğluYayınevi, Ankara, Türkiye, 2010.
- Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.*, 1994; 54, 4313-4320.
- Tew KD., Townsend DM. Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid. Redox Signal.*, 2012; 17, 1728-1737.
- Tunç K., Semerci AB., Okur I. Antioxidant activity of the fruits of *pyracantha coccinea* using ethanolic extract method. *Food And Health* 2020; 6(1): 35-40.
- Turu D., Bozyel ME., Candan K., Yakan MA., Benek A., Canli K. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of *pyracantha coccinea* fruits ethanol extract. *Vitro* 2020; 4, 89-93.
- Ucar-Türker A., Birinci-Yildirim A., Pehlivan-Karakas F. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2012; 26(1): 2765-2772.
- Wong TC., Luh BS., Whitaker JR. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiology* 1971; 48(1): 19-23.
- World Health Organization. The top ten causes of death. 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed 25 April 2021.
- Yang P., Ebbert JO., Sun Z., Weinshilboum RW. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: A review. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24, 1761-1769.
- Yeniçeri ŞA., Balaban M., Hallaç B., Akkemik E. Investigation of the antienzyme and antimicrobial properties of the fruit extracts of the oleaster (*elaegnus angustifolia* l.) under in vitro conditions, proceedings of IKTS 2023 - 2nd International Karatekin Science and Technology Conference, 21-22 December 2023,281s, Çankırı, Türkiye
- Yu F., Pan Z., Qu B., Yu X., Xu K., Deng Y., Liang F. Identification of a tyrosinase gene and its functional analysis in melanin synthesis of *pteria penguin*. *Gene* 2018; 656, 1–8.
- Zaidi KU., Ali AS., Ali SA., Naaz I. Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochem. Res. Int.* 2014; 2014, 854687.
- Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C., Zhou Z. Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chemistry* 2016; 196, 885-896.