SKŁAD FITOCHEMICZNY, PRZECIWBAKTERYJNY, PRZECIWUTLENIAJĄ I POTENCJAŁ PRZECIWCUKRZYCOWY KORY PIGWY POSPOLITEJ (*CYDONIA OBLONGA*)

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION, ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT, AND ANTIDIABETIC POTENTIAL OF COMMON QUINCE BARK (*CYDONIA OBLONGA*)

Małgorzata Stryjecka[1*], Ewa Stamirowska-Krzaczek[2], Marzena Tomaszewska[1], Natalia Iwanicka[2], Mariusz Szmydki[3]

[1]Katedra Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka i Rolnictwie, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Chełmie

[2]Katedra Rolnictwa, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka i Rolnictwie, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Chełmie

[3]Koło Naukowe Biologiczno-Rolnicze, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka i Rolnictwie, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Chełmie

https://doi.org/10.29316/9788368103397_18

Streszczenie

Cydonia oblonga (pigwa pospolita) jest rośliną o wysokiej wartości odżywczej i leczniczej, stanowiącą bogate źródło związków bioaktywnych, w tym polifenoli, flawonoidów, garbników, alkaloidów i triterpenoidów. Celem rozdziału była charakterystyka metabolitów wtórnych obecnych w korze *Cydonia oblonga* oraz ocena jej właściwości przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych i przeciwcukrzycowych. Materiał badawczy stanowiła kora pigwy pospolitej pozyskana na terenie województwa lubelskiego. Analizy fitochemiczne przeprowadzono z wykorzystaniem metod jakościowych, oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Aktywność przeciwutleniającą oceniono metodą DPPH, właściwości przeciwbakteryjne określono wobec wybranych szczepów

* e-mail: mstryjecka@panschelm.edu.pl

bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, natomiast potencjał przeciwcukrzycowy oceniono na podstawie zdolności hamowania aktywności enzymów α-glukozydazy i α-amylazy. Wyniki badań wykazały obecność wszystkich analizowanych grup fitozwiązków w ekstrakcie etanolowym. Najwyższą zawartość polifenoli ogółem (72,61 mg GAE/g s.m.) oraz flawonoidów (68,24 mg QE/g s.m.) odnotowano w ekstrakcie surowym, natomiast spośród frakcji najwyższe wartości uzyskano dla frakcji F1 i F4. Ekstrakt oraz wybrane frakcje wykazywały wysoką aktywność antyoksydacyjną, osiągając ponad 88% inhibicji rodników DPPH przy najwyższym stężeniu. Badania przeciwbakteryjne potwierdziły większą skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych, przy czym najwyższą aktywność zaobserwowano wobec *Staphylococcus aureus*. Analiza aktywności przeciwcukrzycowej wykazała, że frakcje F1 i F7 skutecznie hamowały aktywność α-glukozydazy i α-amylazy, osiągając wartości porównywalne do akarbozy. Uzyskane wyniki wskazują, że kora *Cydonia oblonga* stanowi cenne źródło naturalnych związków bioaktywnych o potencjalnym zastosowaniu w profilaktyce i wspomaganiu leczenia chorób związanych ze stresem oksydacyjnym, zakażeniami bakteryjnymi oraz zaburzeniami gospodarki węglowodanowej.

Słowa kluczowe: pigwa pospolita, polifenole, flawonoidy, aktywność przeciwutleniająca, α-glukozydaza, α-amylaza, właściwości przeciwcukrzycowe

Abstract

Cydonia oblonga (common quince) is a plant with high nutritional and medicinal value, serving as a rich source of bioactive compounds, including polyphenols, flavonoids, tannins, alkaloids, and triterpenoids. The aim of this chapter was to characterize the secondary metabolites present in the bark of Cydonia oblonga and to evaluate its antioxidant, antibacterial, and antidiabetic properties. The research material consisted of common quince bark obtained in the Lublin Province. Phytochemical analyses were conducted using qualitative methods, determination of total polyphenol and flavonoid content, high-performance liquid chromatography (HPLC), and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Antioxidant activity was assessed using the DPPH method, antibacterial properties were determined against selected strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, while antidiabetic potential was evaluated based on the ability to inhibit the activity of α-glucosidase and α-amylase enzymes. The results of the chapter demonstrated the presence of all analyzed groups of phytochemicals in the ethanol extract. The highest total polyphenol content (72.61 mg GAE/g d.w.) and flavonoid content (68.24 mg QE/g d.w.) were recorded in the crude extract, while among the fractions, the highest values were obtained for fractions F1 and F4. The extract and selected fractions exhibited high antioxidant activity, achieving over 88% inhibition of DPPH radicals at the highest concentration. Antibacterial studies confirmed greater efficacy against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria, with the highest activity observed against Staphylococcus aureus. Analysis of antidiabetic activity showed that fractions F1 and F7 effectively inhibited α-glucosidase and α-amylase activity, achieving values comparable to those of acarbose. The results indicate that *Cydonia oblonga* bark is a valuable source of natural bioactive compounds with potential applications in the prevention and adjunctive

treatment of diseases associated with oxidative stress, bacterial infections, and carbohydrate metabolism disorders.

Keywords: common quince, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, α-glucosidase, α-amylase, antidiabetic properties

Wstęp

Produkty naturalne są chętnie badane przez współczesnych naukowców. Dzieje się tak, gdyż od najdawniejszych czasów produkty naturalne były stosowane jako środki terapeutyczne do leczenia wielu chorób (Ahmed i in., 2022). WHO szacuje, że ponad 80% światowej populacji stosuje leki ziołowe (Katiyar i in., 2016). Preparaty te charakteryzują się działaniem przeciwutleniającym, przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym, wzmacniające układ odpornościowy oraz wykazujące działanie przeciwzapalne. Ponadto, rośliny lecznicze są uważane za istotne źródło w opracowywaniu nowych leków (Tungmunnithum i in., 2018; Muhammad i in., 2021).

Produkty naturalne są również pomocne w leczeniu cukrzycy i związanymi z nią powikłaniami zdrowotnymi stresu oksydacyjnego. Najważniejszym czynnikiem powodującym stres oksydacyjny w organizmie człowieka jest produkcja wolnych rodników (reaktywne formy tlenu), które powodują rozpad biologicznie ważnych cząsteczek, takich jak białka i DNA, co prowadzi do wielu problemów zdrowotnych. Związkami, pomocnymi w walce ze stresem oksydacyjnym są związki fenolowe, które dzięki pierścieniowi benzenowemu mogą stabilizować wolne rodniki, dlatego też warzywa i owoce są ważne w diecie człowieka (Bent, Ko, 2004). Metabolity wtórne są ważnymi składnikami diety człowieka, są obecne w codziennych produktach spożywczych, takich jak kawa, herbata, soja, owoce i warzywa (Manach i in., 2004). Wpływają one korzystnie na zdrowie człowieka, oraz są pomocne w leczeniu i zapobieganiu wielu chorobom. Przykładem są związki fenolowe i flawonoidy, które wykazują właściwości przeciwutleniające i ich spożycie wpływa chroni przed stanami zapalnymi i nowotworami (Kang i in., 2011, Kim i in., 2022). Ponadto rośliny bogate w fenole mają właściwości przeciwnowotworowe (Bomser i in., 1999), przeciwmutagenne (He i in., 1997) i przeciwcukrzycowe (Preuss i in., 2001).

Lekooporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, zwiększa obawy o zdrowie człowieka, jak i o kontrole bakteryjnych chorób zakaźnych (Asghar i in., 2021). W ostatnich latach ze względu na nadużywanie antybiotyków w leczeniu infekcji, oporność bakterii wzrosła (Brown, Wright, 2016). Wiele patogennych

szczepów jest już nosicielami genów opornych na antybiotyki i prawdopodobnie będzie ich w przyszłości więcej, jeśli nie zostaną podjęte odpowiednie środki, aby temu zapobiec (Oliveira i in., 2007). Z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe można walczyć na dwa różne sposoby, poprzez opracowywanie nowych materiałów aktywnych, ale jest to kosztochłonne i czasochłonne (Li i in., 2019), bądź też poprzez poszukiwanie sposobów na zwiększenie skuteczności już istniejących środków przeciwdrobnoustrojowych (Payne i in., 2007).

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną o wielu etiologiach charakteryzuje się brakiem homeostazy glukozy, a także nieprawidłowościami w metabolizmie węglowodanów, lipidów i metabolizmu białek w wyniku niedoborów w produkcji i/lub działaniu insuliny. Podwyższony poziom glukozy we krwi jest jednym z najważniejszych problemów zdrowia publicznego na świecie; po wysokim ciśnieniu krwi i paleniu papierosów, jest trzecim najważniejszym czynnikiem ryzyka przedwczesnej śmiertelności na świecie, zgodnie z badaniem przeprowadzonym przez Międzynarodową Federację Diabetologiczną (International Diabetes Federation IDF, 2015).

Flawonoidy, polifenole i garbniki, które działają jako wymiatacze wolnych rodników, mogą mieć działanie przeciwcukrzycowe (Muhtadi i in., 2015; Sharma i in., 2008). Uważa się, że przeciwutleniacze mają wpływ insulinomimetyczny na tkanki obwodowe, albo poprzez promowanie regeneracji tkanek lub powodowanie wydzielania insuliny przez istniejące komórki trzustki.

Pigwa (*Cydonia oblonga*) należy do rodziny *Rosaceae* znajduje zastosowanie lecznicze, odżywcze i ozdobne (Shemchuk i in., 2020; Marwa i in., 2009). Nazwa rodzaju *Cydonia* pochodzi od nazwy regionu Kydonia na północno-zachodnim wybrzeżu Krety, gdzie drzewo to było uprawiane od czasów starożytnych. W pradawnych greckich rytuałach owoce te były ofiarowywane na weselach, ponieważ symbolizowały płodność (Ganopoulos i in., 2011). Owoce pigwy są wykorzystywane w różnych krajach do celów spożywczych, farmaceutycznych, perfumeryjnych i rolniczych (Rop i in., 2011). Dlatego też roślina ta jest bardzo ciekawa ze względu na swoją wartość ekonomiczną. Owoce pigwy są bogate w: związki fenolowe, olejki eteryczne, składniki mineralne i witaminy (Erdoğan i in., 2012). Ponadto systematyczne jedzenie miąższu pigwy zmniejsza ryzyko wielu chorób, tj. choroby układu krążenia (Yamanaka i in., 1997), rak (Nomoto i in., 2004), problemy z okrężnicą i nerkami (Carvalho i in., 2010). Owoc pigwy jest również źródłem garbników, dlatego też może być stosowany jako środek antyseptyczny

w infekcjach płuc, gdyż związki te wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz przeciwwirusowe (Adel i in., 2010).

Wykorzystywane są również nasiona pigwy w leczeniu kaszlu, biegunki, zaparć, czerwonki i zapalenia oskrzeli (Djilali i in., 2012).

Badania nad korą rośliny *Cydonia oblonga* są nieliczne. Dlatego celem niniejszego rozdziału było określenie i scharakteryzowanie metabolitów wtórnych *Cydonia oblonga* przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz zbadanie właściwości antyoksydacyjnych, przeciwbakteryjnych i przeciwcukrzycowych ekstraktu z kory i wyizolowanych frakcji.

Materiały i metody

Materiały badawcze

Kora *Cydonia oblonga* została zebrana w 2021 r., na terenie miasta Chełm, województwo lubelskie, Polska (szerokość: 51°08′35″N, Długość: 23°28′17″E).

Świeżą korę *Cydonia oblonga* dokładnie umyto i wysuszono pod wyciągiem, aby uniknąć pogorszenia bioaktywnych związków czynnych z powodu światła słonecznego. Wysuszone próbki zmielono na proszek i dobrze wymieszano z etanolem. Po trzech dniach ekstrakt przefiltrowano przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1 i przy użyciu wyparki obrotowej (Rota Vapor R-200 Buchi, Szwajcaria) rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i w temperaturze 40°C.

Analiza fitochemiczna

W przygotowanych próbka zostały przeprowadzone wstępne badania fitochemiczne, które miały na celu, potwierdzenie lub zaprzeczenie obecności wybranych bioaktywnych substancji tj., alkaloidy, flawonoidy, glikozydy, terpenoidy i garbniki w ekstrakcie etanolowym kory *Cydonia oblonga*. Do analiz użyto powszechnie stosowanych testów (Kielhorn, Thorngate, 1999; Belyagoubi-Benhammou i in., 2019; Aslan i in., 2010).

Analiza całkowitej zawartości polifenoli ogółem i całkowitej zawartości flawonoidów

W celu oznaczenia zawartości polifenoli w ekstrakcie etanolowym kory *Cydonia oblonga*, wykonano następujące czynności:

1. Do przygotowania wymaganego pobrano 5 mg ekstraktu próbki i rozpuszczono w 5 mL etanolu. Następnie 1 mL odczynnika Folin-Ciocalteu rozcieńczono 10 mL wody destylowanej w celu przygotowania odczynnika

Folin-Ciocalteu. W kolbie miarowej dodano 9 mL wody destylowanej do 1 mL roztworu próbki.

2. Do 1 mL badanego ekstraktu dodano 1 mL rozcieńczonego roztworu odczynnika Folin-Ciocalteu, odstawiono na 6 minut. Po tym czasie dodano 10 mL 7% roztworu $NaHCO_3$ i wszystko dokładnie wymieszano. Następnie mieszaninę uzupełniono wodą destylowaną do objętości 25 mL i dokładnie wymieszano. Tak otrzymaną próbkę pozostawiono na 90 minut w temperaturze pokojowej, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 760 nm za pomocą spektrofotometru UV 2600i plus (Shimadzu, Japonia). Zastosowanym wzorcem, był kwas galusowy (0 do 100 mg/mL). Zawartość pofenoli ogółem została wyrażona jako: (mg GAE/g DW).

Całkowitą zawartość flawonoidów została oznaczona metodą kalorymetryczną zgodnie z metodyką podaną przez Belyagoubi-Benhammou i in. 2019 z niewielkimi modyfikacjami. Otrzymany wcześniej ekstrakt z kory pigwy został rozcieńczony etanolem. Roztwór etanolowy ekstraktu o objętości 100 µL i 500 µL wody destylowanej wlano do kolby miarowej o pojemności 10 mL, a następnie dodano 100 µL 5% $NaNO_2$, 150 µL 10% $AlCl_3$ i 200 µL 1 M NaOH. Krzywą kalibracyjną przygotowano przy użyciu etanolowego roztworu kwercetyny w stężeniach w zakresie 0-100 g/mL. Otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 5 minut; absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 510 nm. Całkowita zawartość flawonoidów wyrażono jako ekwiwalent kwercetyny w mg QE/g suchej masy.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC

Analizę HPLC przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Fiuza i in. (2004) z niewielkimi modyfikacjami. Ekstrakt do analizy, przygotowano poprzez rozpuszczenie 1 g proszku w 10 mL mieszaniny wody i etanolu (5:5). Otrzymaną mieszaninę wstrząsano przez 1 godzinę w temperaturze 60^{o}C, a następnie przefiltrowano przez bibułę filtracyjną Whatman 1. Filtraty odwirowywano w wirówce, przy 4000 obr./min przez 15 minut. Otrzymaną próbkę wlano do fiolki HPLC i przeprowadzono rozdział na Advanced Prominence-i (Shimadzu, Japonia). Do separacji użyto kolumny Reprosil Gold C18 (Dr. Maisch GmbH, Niemcy). Fazą ruchomą był rozpuszczalnik A (kwas octowy, etanol, woda dejonizowana, 2:10:88, v/v) i rozpuszczalnik B (kwas octowy, woda dejonizowana, etanol, 2:8:90, v/v). Rozdział, był prowadzony w gradiencie, rozpoczął się od

100% rozpuszczalnika A w 0 min, 85% A w 5 min., 50% rozpuszczalnika A w 20 min., w 25 min rozpuszczalnik A zmniejszył się do 30%, a na koniec 100% rozpuszczalnika B po 30-40 minutach. Rozpuszczalniki były dostarczane przy szybkości przepływu 1 ml/min., a absorbancję mierzono przy długości fali 280 nm, stosując czasy retencji i widma UV zarejestrowano za pomocą detektora UV do identyfikacji różnych związków. Otrzymano dziesięć aktywnych frakcji (F1 do F10), które poddano dalszej analizie GC-MS.

Analiza GC-MS w celu charakterystyki

Otrzymane, oczyszczone frakcje analizowano za pomocą układu MDGC/GCMS 2010 (Shimadzu, Japonia) zgodnie z metodyką opisaną przez Al-Snafi (2016) z niewielkimi modyfikacjami. System był wyposażony w detektor FID do identyfikacji oznaczanych związków, które zostały zidentyfikowane przez porównanie ich widm masowych i czasów retencji z czystymi związkami (wzorcami) pobranymi z bibliotek oprogramowania Willy i NIST.

Aktywność zmiatania rodników DPPH

Roztwór podstawowy przygotowano przez rozpuszczenie 20 mg DPPH w 100 mL etanolu. Następnie pobrano 3 mL tego roztworu i zmierzono jego absorbancję spektrofotometrycznie (spektrofotometr UV 2600 i-plus, Shimadzu, Japonia) przy długości fali 517 nm i uznano jako negatywną próbę kontrolną. Roztwór podstawowy został osłonięty folią aluminiową, a następnie inkubowany w temperaturze pokojowej w ciemności przez 24 godziny. Około 5 mg ekstraktu i każdej oczyszczonej frakcji rozpuszczono w 5 mL etanolu w celu uzyskania roztworu podstawowego. Następnie roztwór ten był seryjnie rozcieńczony w etanolu w następujących stężeniach: 1000, 500, 250, 125 i 62,5 (g/mL). Następnie 2 mL każdego roztworu próbki zmieszano z 2 mL roztworu DPPH i po reakcji przez 15 minut w ciemności, zmierzono wartości absorbancji próbek, przy długości fali 517 nm. Obliczenia dokonano za pomocą następującego wzoru:

$$\% \text{ Aktywność antyoksydacyjnej} = [(A_0 - B_0)/A_0] * 100$$

gdzie:
A_0 jest absorbancją czystego DPPH,
B_0 jest absorbancją badanych próbek.

Testy przeciwcukrzycowe

1. Aktywność inhibicji α-amylazy

Oznaczenie aktywności hamowania α-amylazy, dokonano zgodnie z metodyką opisaną przez Bernfelda (1955) z niewielkimi modyfikacjami. Do probówki dodano: 500 µL buforu fosforanowego, 250 µL badanego ekstraktu i 250 µL roztworu enzymu α-amylazy. Tak otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 10 min. w temperaturze 37°C.

Po tym czasie do próbki dodano 250 µL roztworu skrobi i ponownie ją inkubowano w takich samych warunkach, jakie zostały zapisane powyżej. W tym czasie zachodzi reakcja enzymatyczna, którą po 10 minutach zatrzymano poprzez dodanie 500 µL odczynnika DNSA. Następnie próbkę gotowano przez 5 minut, w łaźni wodnej w temperaturze 100°C). Po tym czasie próbkę ochłodzono do temperatury pokojowej, w łaźni lodowej (czas: 5 minut). Następnie rozcieńczono ją wodą destylowaną do objętości 5 mLi zmierzono absorbancję przy 540 nm względem próby ślepej (z buforem zamiast ekstraktu). Obliczeń % inhibicji α-amylazy dokonano za pomocą wzoru:

$$\text{Inhibicja (\%)} = [(\text{A kontrola} - \text{A próbka}) / \text{A kontrola}] \times 100$$

gdzie:
A kontrola - absorbancja reakcji bez inhibitora
A próbka - absorbancja w obecności inhibitora (ekstraktu)

Metoda ta pozwala na wstępną ocenę potencjału przeciwhiperglikemicznego badanych ekstraktów.

2. Aktywność inhibicji α-glukozydazy

Mieszaninę reakcyjną sporządzono przez dodanie 100 µL enzymu α-glukozydazy (0,5 jednostki/ml), 0,1 M buforu fosforanowego (600 µl) o pH 6,9 i 50 µl każdej próbki rozcieńczenia (62,4, 125, 250, 500 i 1000 g/ml). Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C. Reakcję enzymatyczną rozpoczęto od dodania 100 µL roztworu p-nitro-fenylo-D-glukopiranozydu (5 Mm) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,9, a następnie 15-minutowej inkubacji w temperaturze 37°C. Absorbancję mierzono przy długości fali 405 nm. Mieszanina reakcyjna bez ekstraktu roślinnego została użyta jako kontrola pozytywna, podczas gdy roztwór ślepy został

przygotowany bez enzymu α-glukozydazy. Procentową inhibicję α -glukozydazy obliczono przy użyciu następującego wzoru:

% inhibitora α - glukozydazy = [(absorbancja próby kontrolnej – absorbancja próby badanej) / absorbancja próby kontrolnej]×100

Omówienie wyników i dyskusja

Wstępne badania fitochemiczne ekstraktu z owoców *Cydonia oblonga* wykazały pozytywne wyniki dla głównych składników fitochemicznych, jak podano w Tabeli 1.

Obecność wszystkich analizowanych grup fitozwiązków w ekstrakcie etanolowym z *Cydonia oblonga* sugeruje, że roślina ta może wykazywać szerokie spektrum aktywności biologicznej. Flawonoidy są znane ze swoich właściwości przeciwutleniających, przeciwzapalnych oraz przeciwnowotworowych. Badania wskazują, że związki te chronią komórki przed stresem oksydacyjnym i mogą mieć pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy (Middleton i in., 2000; Pietta, 2000). Alkaloidy to związki o silnym działaniu farmakologicznym – mogą wykazywać działanie przeciwbakteryjne, przeciwbólowe oraz cytotoksyczne. Ich obecność w ekstraktach roślinnych często wiąże się z aktywnością przeciwnowotworową lub neuroaktywną (Cordell, 1981). Glikozydy, zwłaszcza kardenolidowe, wpływają na pracę mięśnia sercowego, a niektóre z nich wykazują właściwości antyoksydacyjne i hepatoprotekcyjne (Evans, 2002). Obecność glikozydów w *C. oblonga* może wskazywać na potencjał leczniczy w zakresie kardioprotekcji. Triterpenoidy pełnią wiele funkcji biologicznych – od właściwości przeciwnowotworowych po immunomodulujące. Związki te są coraz częściej badane w kontekście nowoczesnych terapii chorób przewlekłych (Dzubak i in., 2006). Garbniki wykazują działanie ściągające, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe. Ich obecność może wpływać korzystnie na funkcjonowanie przewodu pokarmowego, a także wspierać działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające (Haslam, 1996). Obecność tak szerokiego spektrum fitozwiązków może tłumaczyć tradycyjne zastosowanie *Cydonia oblonga* w medycynie ludowej – m.in. jako środek przeciwbiegunkowy, przeciwzapalny czy wspomagający trawienie. Równocześnie, ze względu na potencjalną aktywność biologiczną, ekstrakty z tej rośliny mogą stanowić cenne źródło naturalnych związków bioaktywnych dla przemysłu farmaceutycznego i nutraceutycznego.

Tabela 1. Wstępne badanie jakościowe fitochemiczne ekstraktów etanolowych *Cydonia oblonga*

Fitozwiązki chemiczne	Odczynnik	Analizy	Rezultat
Flawonoidy	Chlorek żelaza (III)	Pojawienie się koloru żółtego i bezbarwnego po dodaniu HCL	+
Alkaloidy	Dragendroff's	Powstawanie pomarańczowo-czerwonego osadu	+
Glikozydy	Keller Killiani	Tworzenie się warstwy o barwie od czerwonej do brązowej	+
Triterpenoidy	Liebermann Burchard	Czerwono-brązowa granica	+
Garbniki	Żelatyna	Brązowawe do zielonych osady	+

+ oznacza obecność danej grupy fitochemicznej

Źródło: opracowanie własne.

Zawartość polifenoli ogółem i flawonoidów w etanolowych ekstraktach i oczyszczonych frakcjach *Cydonia oblonga*

Tabela 2 przedstawia zawartość związków fenolowych (polifenoli ogółem) oraz flawonoidów w ekstrakcie etanolowym oraz dziesięciu kolejnych frakcjach oczyszczonych (F1–F10) uzyskanych z *Cydonia oblonga*. Najwyższe stężenia polifenoli ogółem (72,61 ± 0,05 mg/g) oraz flawonoidów (68,24 ± 0,13 mg/g) odnotowano w surowym ekstrakcie etanolowym. Wśród frakcji oczyszczonych najwyższą zawartość związków fenolowych i flawonoidowych wykazała frakcja F1 (69,75 ± 0,12 mg/g i 64,33 ± 0,18 mg/g) oraz F4 (67,83 ± 0,13 mg/g i 66,26 ± 0,06 mg/g). Najniższe wartości stwierdzono w frakcji F9 (polifenole: 60,55 ± 0,10 mg/g; flawonoidy: 58,79 ± 0,07 mg/g). Ogólnie, wraz z postępującą frakcjonacją, widoczna jest lekka tendencja spadkowa zawartości obu grup związków, choć nie jest ona liniowa.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że *Cydonia oblonga* jest bogatym źródłem związków fenolowych, w tym flawonoidów – naturalnych przeciwutleniaczy o szerokim spektrum działania biologicznego.

Polifenole, zwłaszcza flawonoidy, pełnią istotną rolę w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym poprzez zdolność do neutralizacji wolnych rodników, chelatowania jonów metali i modulacji szlaków enzymatycznych (Pietta, 2000). Ich obecność w roślinach leczniczych takich jak *C. oblonga* przyczynia się do działania: przeciwutleniającego, przeciwzapalnego, przeciwbakteryjnego,

hipoglikemicznego i kardioprotekcyjnego (Middleton i in., 2000; Heim i in., 2002).

Proces frakcjonowania pozwala na częściowe wyodrębnienie grup związków chemicznych o różnej polarności i masie cząsteczkowej. W niniejszym badaniu frakcje F1 i F4 zachowały najwyższy poziom aktywnych związków, co może sugerować, że zawierają główne komponenty fenolowe odpowiedzialne za aktywność biologiczną ekstraktu.

Z kolei niższe wartości w frakcjach F9 i F10 mogą świadczyć o obecności mniej aktywnych metabolitów wtórnych lub związków niepolifenolowych, które zostały oddzielone od głównej frakcji w wyniku procesu oczyszczania. Wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały wysoką zawartość polifenoli i flawonoidów w owocach, liściach i nasionach *Cydonia oblonga*. Na przykład Silici i in. (2010) wykazali silną aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z liści pigwy, co korelowało z wysoką zawartością związków fenolowych. Inne badania potwierdzają również obecność kwercetyny, kemferolu i ich glikozydów jako głównych flawonoidów w tej roślinie (Gharaati i in., 2014).

Tabela 2. Zawartość polifenoli ogółem oraz flawonoidów w ekstrakcie oraz poszczególnych oczyszczonych frakcjach *Cydonia oblonga*.

Ekstrakt/frakcja	Polifenole ogółem	Flawonoidy
Ekstrakt	72,61±0,05	68,24±0,13
F1	69,75±0,12	64,33±0,18
F2	64,58±0,22	61,46±0,12
F3	63,56±0,20	60,23±0,10
F4	67,83±0,13	66,26±0,06
F5	65,76±0,08	63,89±0,09
F6	66,37±0,09	65,40±0,17
F7	64,76±0,08	62,41±0,04
F8	62,70±0,16	61,19±0,08
F9	60,55±0,10	58,79±0,07
F10	61,16±0,08	60,06±0,05

Wynik ±odchylenie standardowe

Źródło: opracowanie własne.

Właściwości przeciwbakteryjne

Antybiotyki są powszechnie stosowane w leczeniu różnych infekcji wywołanych przez bakterie. Niestety popularność tych leków, powoduje że bakterie mogą się stać na nie odporne. Infekcje te są powszechne, dlatego też zwiększa się oporność na leczenie co utrudnia badania i rozwój nowych leków. Przedstawione w niniejszym rozdziale wyniki własne wskazują, że bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe na badany etanolowy ekstrakt i frakcje, niż bakterie Gram--ujemne (Tabela 3).

Tabela 3. Właściwości przeciwbakteryjne etanolowego ekstraktu z pigwy pospolitej oraz oczyszczonych frakcji z tego ekstraktu

Ekstrakt/ frakcja	Strefa hamowania (mm)					
	Szczepy mikroorganizmów					
	Escherichia coli	***Salmonella typhi***	***Klebsiella pneumonia***	***Bacillus subtilis***	***Staphylococcus aureus***	***Streptococcus pneumonia***
Ekstrakt	20±0,6	19±0,6	19±0,3	21±0,3	28±0,3	21±0,3
F1	14±0,6	13±0,5	16±0,3	18±0,3	25±0,4	20±0,1
F2	12±0,6	16±0,6	15±0,1	15±0,6	22±0,4	18±0,3
F3	9±0,6	12±0,4	12±0,3	12±0,3	20±0,3	16±0,1
F4	15±0,6	11±0,4	11±0,3	10±0,1	18±0,1	15±0,1
F5	12±0,6	8±0,1	9±0,1	10±0,1	15±0,4	16±0,5
F6	8±0,6	8±0,1	10±0,1	16±0,3	18±0,3	16±0,3
F7	14±0,6	7±0,3	12±0,3	14±0,3	17±0,4	16±0,1
F8	7±0,6	6±0,2	11±0,1	12±0,5	14±0,3	15±0,1
F9	9±0,6	6±0,1	10±0,1	12±0,3	12±0,3	14±0,6
F10	6±0,6	6±0,0	10±0,1	10±0,1	12±0,1	14±0,1

Wynik ±odchylenie standardowe

Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane wyniki, są zbieżne z innymi opublikowanymi wynikami badań, w których odkryto, że ekstrakt z pigwy pospolitej ma znaczące działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich, ale jest mniej skuteczny wobec bakterii Gram-ujemnych (Al-Khazraji, 2013; Benzarti i in. 2015). Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych zawiera w swoim składzie lipopolisacharydy, które zapobiegają przyleganiu związków fenolowych do powierzchni szczepu bakteryjnego (Karar i in., 2014), dlatego też zaobserwowano mniejszą aktywność wobec każdego szczepu Gram-ujemnego. Jak można przeczytać w literaturze

tematu, bakterie Gram-(+) są bardziej wrażliwe na bakteriobójcze polifenole, niż gatunki Gram-(-) (Urbanavičiūte i in. 2020).

Aktywność przeciwutleniająca etanolowego ekstraktu i oczyszczonych frakcji *Cydonia oblonga*

Aktywność przeciwutleniająca etanolowego ekstraktu i oczyszczonych frakcji *Cydonia oblonga*, została przedstawiona w tabeli 4. W badaniach dokonano oceny zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH przez etanolowy ekstrakt z owoców *Cydonia oblonga* oraz przez jego frakcje (oznaczone F1-F10), w zakresie stężeń od 62,5 do 1000 µg/mL. Dla porównania zastosowano kwas askorbinowy jako standard referencyjny. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazał kwas askorbinowy – na poziomie 94,70% inhibicji DPPH przy stężeniu 1000 µg/mL. Etanolowy ekstrakt z pigwy osiągnął 89,68% inhibicji przy tym samym stężeniu, co wskazuje na jego wysoką aktywność przeciwutleniającą. Wśród frakcji, najwyższą aktywność wykazywały F1 (88,97%), F2 (88,41%) i F3 (87,72%), przy czym pozostałe frakcje (F4-F10) wykazywały aktywność w zakresie od 79,00% do 86,58%. Aktywność antyoksydacyjna wykazywała trend malejący wraz ze spadkiem stężenia, co jest typowe dla testów DPPH. Niemniej jednak nawet przy najniższym stężeniu (62,5 µg/mL) niektóre frakcje, szczególnie F3 (77,80%) i F4 (78,42%), utrzymywały stosunkowo wysoką aktywność.

Tabela 4. Właściwości antyoksydacyjne, wykonane testem DPPH, etanolowego ekstraktu z pigwy pospolitej, oraz oczyszczonych frakcji z tego ekstraktu

Próbka	Stężenie (µg/mL)	% DPPH	Próbka	Stężenie (µg/mL)	% DPPH
Ekstrakt	1000	89,68±0,70	F6	1000	84,10±0,06
	500	81,14±0,32		500	82,23±0,05
	250	75,86±0,58		250	79,97±0,10
	125	68,59±0,36		125	78,42±0,07
	62,5	61,30±0,09		62,5	77,54±0,07
F1	1000	88,97±0,19	F7	1000	82,33±0,14
	500	83,50±0,24		500	81,36±0,10
	250	79,51±0,13		250	80,35±0,09
	125	76,34±0,94		125	79,42±0,17
	62,5	72,77±0,22		62,5	78,59±0,06

Próbka	Stężenie (µg/mL)	% DPPH	Próbka	Stężenie (µg/mL)	% DPPH
F2	1000	88,41±0,31	**F8**	1000	80,40±0,16
	500	82,26±0,19		500	79,32±0,14
	250	80,32±0,10		250	78,37±0,23
	125	78,27±0,08		125	77,72±0,10
	62,5	75,87±0,11		62,5	76,43±0,08
F3	1000	87,72±0,14	**F9**	1000	79,53±0,10
	500	82,30±0,17		500	78,47±0,22
	250	80,66±0,09		250	77,72±0,11
	125	79,19±0,19		125	76,55±0,09
	62,5	77,80±0,16		62,5	75,42±0,25
F4	1000	86,58±0,23	**F10**	1000	79±0,08
	500	85,33±0,26		500	78,27±0,09
	250	84,30±0,09		250	77,26±0,08
	125	81,75±0,17		125	76,68±0,18
	62,5	78,42±0,07		62,5	75,56±0,12
F5	1000	84,79±0,15	**Kwas askorbinowy**	1000	94,70±0,31
	500	82,67±0,12		500	87,26±0,12
	250	79,64±0,10		250	76,34±0,12
	125	77,55±0,11		125	68,22±0,11
	62,5	76,80±0,08		62,5	62,33±0,14

Wynik ±odchylenie standardowe

Źródło: opracowanie własne.

Wyniki badania potwierdzają wysoką aktywność antyoksydacyjną ekstraktu z owoców pigwy pospolitej, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Według Silva i in. (2021), ekstrakty z *Cydonia oblonga* charakteryzują się znaczącym potencjałem przeciwutleniającym, wynikającym z obecności związków fenolowych, flawonoidów oraz kwasów organicznych. Obecność wysoce aktywnych frakcji (szczególnie F1-F4) sugeruje, że substancje odpowiedzialne za aktywność antyoksydacyjną zostały skutecznie rozdzielone podczas frakcjonowania. Możliwe, że zawierają one główne fenolokwasy (np. kwas chlorogenowy) i flawonoidy (np. rutynę lub kwercetynę), które zostały już wcześniej wykryte w pigwie (Gullón i in., 2015). Co interesujące, niektóre frakcje (F9, F10) wykazywały niższą aktywność, co może wskazywać na obecność mniej aktywnych lub nawet neutralnych związków względem rodników DPPH. Pomimo że kwas askorbinowy wykazał najwyższą skuteczność, ekstrakt

etanolowy oraz jego frakcje uzyskały porównywalnie wysokie wartości inhibicji, co czyni je potencjalnie wartościowymi źródłami naturalnych przeciwutleniaczy. Badania Duarte i in. (2019) wykazały, że naturalne ekstrakty o wysokiej aktywności DPPH mogą być stosowane jako składniki funkcjonalne w suplementach diety oraz w przemyśle spożywczym jako alternatywa dla syntetycznych przeciwutleniaczy. Warto zaznaczyć, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktu nie jest jedynie efektem obecności jednego składnika, lecz może wynikać z synergii działania kilku związków bioaktywnych (Rice-Evans i in., 1997). W związku z tym dalsze badania powinny obejmować analizę HPLC-MS/MS w celu identyfikacji związków dominujących w najbardziej aktywnych frakcjach.

Inhibicja α-glukozydazy i α-amylazy etanolowego ekstraktu i oczyszczonych frakcji *Cydonia oblonga*

Badano zdolność frakcji F1-F10, uzyskanych z ekstraktu etanolowego, do inhibicji enzymów kluczowych dla metabolizmu węglowodanów – α-glukozydazy i α-amylazy – w pięciu stężeniach (62,5-1000 µg/mL) (Tabela 5). Wyniki porównano do działania referencyjnego leku przeciwcukrzycowego – akarbozy. Najwyższą inhibicje α - glukozydazy wykazała frakcja F1 (79,14% przy 1000 µg/mL), której skuteczność malała ze zmniejszaniem stężenia, osiągając 54,82% przy 62,5 µg/mL. Wysoką aktywność wykazały także frakcje F6 (71,39%) i F5 (67,60%). Najniższe wartości zanotowano dla F10 (53,33%) i F9 (54,45%). Natomiast w przypadku inhibicji α-amylazy najwyższą aktywność wykazywała frakcja F7 (80,46%), następnie F3 (79,64%), F2 (79,25%) i F4 (79,15%). Działanie tych frakcji było porównywalne do akarbozy (86,59% przy 1000 µg/mL).

Niektóre frakcje, jak F6 i F5, wykazywały niższą aktywność w zakresie 63-64%. Najsłabsze działanie zaobserwowano dla F10 (65,67%). Wyniki jednoznacznie wskazują, że frakcje uzyskane z ekstraktu etanolowego *Cydonia oblonga* wykazują znaczącą aktywność inhibicyjną wobec enzymów trawiennych węglowodanów α - glukozydazy i α-amylazy, co może wskazywać na ich potencjalne zastosowanie w leczeniu lub profilaktyce cukrzycy typu 2. α-glukozydaza odpowiedzialna jest za końcowy etap trawienia węglowodanów, natomiast α - amylaza inicjuje ich rozkład w świetle jelita. Hamowanie tych enzymów pozwala na spowolnienie uwalniania glukozy i ograniczenie poposiłkowej hiperglikemii (Krentz, Bailey, 2005). Akarboza – lek referencyjny – działa na tej zasadzie, jednak jej stosowanie może wywoływać działania niepożądane, stąd

rośnie zainteresowanie naturalnymi inhibitorami enzymów trawiennych (Tundis i in., 2010). Frakcja F1 wykazała najwyższy potencjał względem obu enzymów, zbliżony do akarbozy. Jej działanie może być związane z obecnością związków fenolowych (np. flawonoidów i fenolokwasów), których obecność w pigwie została potwierdzona w badaniach HPLC (Silva i in., 2021; Gullón i in., 2015). Podobną aktywność wykazała frakcja F7, szczególnie wobec α - amylazy, co może świadczyć o obecności związków o specyficznej selektywności enzymatycznej. Z kolei frakcje F9 i F10 wykazywały najniższą aktywność, co może oznaczać niższą zawartość związków biologicznie czynnych lub obecność metabolitów o słabej lub zerowej aktywności inhibicyjnej. Zaobserwowana zależność spadku aktywności wraz z obniżeniem stężenia jest typowa i zgodna z działaniem typu dawka–efekt. Warto zauważyć, że niektóre frakcje (np. F5, F6) wykazują większe powinowactwo do α-glukozydazy niż do α-amylazy, co może być korzystne, ponieważ zbyt silne hamowanie α-amylazy wiąże się zdziałaniami niepożądanymi w przewodzie pokarmowym (Ali Asgar, 2013).

Tabela 5. Procent inhibicji α-glukozydazy i inhibicji α-amylazy, frakcji z kory pigwy pospolitej o stężeniach (62,5 - 1000 µg/mL)

Próbka	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-glukozydazy	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-amylazy
F1	1000	79,14±0,12	1000	78,24±0,13
	500	72,41±0,11	500	75,68±0,05
	250	67,36±0,26	250	69,22±0,14
	125	62,79±0,06	125	63,35±0,09
	62,5	54,82±0,05	62,5	58,62±0,10
F2	1000	67,49±0,22	1000	79,25±0,09
	500	61,83±0,10	500	76,70±0,16
	250	51,36±0,13	250	65,49±0,08
	125	43,56±0,22	125	59,75±0,14
	62,5	36,82±0,06	62,5	54,30±0,06
F3	1000	59,36±0,11	1000	79,64±0,10
	500	53,31±0,12	500	77,72±0,10
	250	45,83±0,10	250	68,24±0,12
	125	37,31±0,10	125	65,77±0,10
	62,5	31,38±0,09	62,5	59,27±0,09

Próbka	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-glukozydazy	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-amylazy
F4	1000	55,96±0,42	1000	79,15±0,04
	500	50,24±0,13	500	78,13±0,10
	250	43,79±0,20	250	71,27±0,07
	125	41,19±0,14	125	67,78±0,16
	62,5	36,76±0,19	62,5	65,75±0,22
F5	1000	67,60±0,18	1000	64,40±0,18
	500	65,51±0,24	500	63,24±0,10
	250	61,58±0,14	250	62,43±0,11
	125	59,36±0,14	125	60,36±0,21
	62,5	55,24±0,10	62,5	58,68±0,10
F6	1000	71,39±0,15	1000	63,27±0,09
	500	69,25±0,13	500	62,41±0,08
	250	66,42±0,13	250	61,43±0,15
	125	63,54±0,09	125	60,65±0,07
	62,5	61,48±0,07	62,5	59,48±0,20
F7	1000	63,83±0,16	1000	80,46±0,11
	500	61,26±0,08	500	79,04±0,07
	250	58,73±0,21	250	77,24±0,08
	125	56,75±0,12	125	76,54±0,15
	62,5	53,89±0,08	62,5	75,77±0,12
F8	1000	56,60±0,16	1000	74,27±0,08
	500	55,34±0,09	500	73,51±0,22
	250	54,66±0,27	250	71,46±0,12
	125	53,46±0,07	125	70,37±0,07
	62,5	52,77±0,06	62,5	68,48±0,13
F9	1000	54,45±0,15	1000	69,35±0,14
	500	52,37±0,16	500	65,36±0,09
	250	49,70±0,13	250	63,24±0,12
	125	48,24±0,12	125	60,15±0,07
	62,5	42,39±0,06	62,5	55,16±0,17
F10	1000	53,33±0,17	1000	65,67±0,16
	500	51,45±0,11	500	61,35±0,19
	250	50,13±0,08	250	59,29±0,14
	125	49,18±0,06	125	55,25±0,13
	62,5	46,35±0,09	62,5	50,40±0,17

Próbka	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-glukozydazy	Stężenie (µg/mL)	% inhibicji α-amylazy
Akarboza	1000	87,38±0,13	1000	86,59±0,16
	500	85,52±0,13	500	83,43±0,14
	250	79,14±0,13	250	76,65±0,21
	125	73,34±0,13	125	70,79±0,22
	62,5	65,40±0,06	62,5	68,54±0,13

Wynik ±odchylenie standardowe

Źródło: opracowanie własne.

Podsumowanie

Cydonia oblonga prezentuje się jako roślina o wysokim potencjale fitoterapeutycznym dzięki znaczącej zawartości flawonoidów i polifenoli. W kontekście zdrowotnym i biotechnologicznym, jej ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie porównywalne do najlepiej znanych roślin antyoksydacyjnych, takich jak zielona herbata czy borówki. Wszystkie przeprowadzone w niniejszym rozdziale badania, a szczególnie analiza HPLC wykazała, że kora *Cydonia oblonga* zawiera bardzo liczne związki biologicznie czynne, tj. polifenole i flawonoidy. Wyniki potwierdzają, że wybrane frakcje z pigwy pospolitej, szczególnie F1 i F7**,** wykazują silną aktywność inhibicyjną wobec kluczowych enzymów węglowodanowych. Ich skuteczność porównywalna do akarbozy wskazuje na wysoki potencjał terapeutyczny i zasadność dalszych badań, w tym identyfikacji aktywnych składników (np. metodą LC-MS/MS), oceny synergii z innymi związkami oraz badań in vivo. *Cydonia oblonga* stanowi bogate źródło naturalnych antyoksydantów. Proces frakcjonowania pozwala na selektywne wyodrębnienie związków bioaktywnych, przy czym frakcje F1 i F4 zawierają najwyższe ilości polifenoli i flawonoidów. Ze względu na wysoką zawartość tych związków, ekstrakty i frakcje z pigwy mogą być potencjalnie wykorzystywane w produkcji suplementów diety, kosmetyków oraz fitopreparatów.

Literatura

1. Adel, A. M., El-Wahab, Z. H. A., Ibrahim, A. A., Al-Shemy, M. T. (2010). Characterization of Microcrystalline Cellulose Prepared from Lignocellulosic Materials. Part I. Acid Catalyzed Hydrolysis. *Bioresour. Technol., 101*, 4446-4455. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.047

2. Ahmed, M., Khan, K. R., Ahmad, S., Aati, H. Y., Ovatlarnporn, C., Rehman, M. S., Javed, T., Khursheed, A., Ghalloo, B. A., Dilshad, R., Anwar, M. (2022). Comprehensive Phytochemical Profiling, Biological Activities, and Molecular Docking Studies of Pleurospermum candollei: An Insight into Potential for Natural Products Development. *Molecules, 27*, 4113. https://doi.org/10.3390/molecules27134113
3. Ali Asgar, A. (2013). Anti-diabetic potential of phenolic compounds: a review. *International Journal of Food Properties, 16*(1), 91-103. https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864
4. Al-Khazraji, S. (2013). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of the Crude Extract of Cydonia oblonga Seeds. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol, 2*, 137-140.
5. Al-Snafi, A. E. (2016). The medical importance of Cydonia oblonga – A review. *IOSR J. Pharm., 6*, 87-99.
6. Asghar, A., Tan, Y. C., Zahoor, M., Abidin, S. A. Z., Yow, Y. Y., Khan, E., Lahiri, C. A. (2021). Scaffolded Approach to Unearth Potential Antibacterial Components from Epicarp of Malaysian Nephelium lappaceum L. *Sci. Rep., 11*, 13859. https://doi.org/10.1038/s41598-021-92622-0
7. Aslan, M., Orhan, N., Orhan, D. D., Ergun, F. (2010). Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. J. Ethnopharmacol., 128, 384-389. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.040
8. Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Gismondi, A., Marco, G. D., Canini, A., Bekkara, F. A. (2019). GC/MS Analysis, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Alkaloids Extracted by Polar and Apolar Solvents from the Stems of Anabasis Articulata. *Med. Chem. Res., 28*, 754-767. https://doi.org/10.1007/s00044-019-02332-6
9. Bent, S., Ko, R. (2004). Commonly Used Herbal Medicines in the United States: A Review. *Am. J. Med., 116*, 478-485. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.10.036
10. Benzarti, S., Hamdi, H., Lahmayer, I., Toumi, W., Kerkeni, A., Belkadhi, K., Sebei, H. (2015). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Leaf Methanol Extract. *Int. J. Innov. Appl. Stud., 13*, 518.
11. Bernfeld, P. (1955). Amylases, alpha and beta. *Methods in Enzymology, 1*, 149-158. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5
12. Bomser, J. A., Singletary, K. W., Wallig, M. A., Smith, M. A. L. (1999). Inhibition of TPA-Induced Tumor Promotion in CD-1 Mouse Epidermis by a Polyphenolic Fraction from Grape Seeds. *Cancer Lett., 135*, 151-157. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00289-4
13. Brown, E. D., Wright, G. D. (2016). Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature, 529*, 336-343. https://doi.org/10.1038/nature17042
14. Carvalho, M., Branca, M. S., Silva, R., Valentão, P., Paula, B. A. (2010). First Report on Cydonia OblongaMiller Anticancer Potential: Differential Antiproliferative Effect

against Human Kidney and Colon Cancer Cells. J. Agric. *Food Chem., 58*, 3366-3370. https://doi.org/10.1021/jf903836k

15. Cordell, G. A. (1981). *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*. Wiley.
16. Djilali, A. B., Mehraz, R., Bouacem, K., Benseddik, A., Moualek, I., Nabiev, M., Benzara, A. (2021). Bioactive Substances of Cydonia oblonga Fruit: Insecticidal Effect of Tannins on Tribuliumm Confusum. *Int. J. Fruit Sci., 21*, 721-731. https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1926395
17. Duarte, A., Moreira, M. M., Oliveira, J. M. P. F., Pintado, M. E., Malcata, F. X., Rodrigues, L. R. (2019). Natural products as food preservatives: A review. *Food Chemistry, 275*, 187-200.
18. Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports, 23*(3), 394-411. https://doi.org/10.1039/b515312n
19. Erdoğan, T., Gönenç, T., Hortoğlu, Z. S., Demirci, B., Başer, K. H. C., Kıvçak, B. (2012). Chemical composition of the essential oil of quince (*Cydonia Oblonga* Miller) leaves. *Med. Aromat. Plants, 1*, 134.
20. Evans, W. C. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders.
21. Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Cruz, M. T. G. D., Cordeiro, M. N.,D. S., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M. (2004). Phenolic Acid Derivatives with Potential Anticancer Properties – A Structure-Activity Relationship Study. Part 1: Methyl, Propyl and Octyl Esters of Caffeic and Gallic Acids. *Bioorg. Med. Chem., 12*, 3581-3589. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.04.026
22. Ganopoulos, I., Merkouropoulos, G., Pantazis, S., Tsipouridis, C., Tsaftaris, A. (2011). Assessing Molecular and Morpho-Agronomical Diversity and Identification of ISSR Markers Associated with Fruit Traits in Quince (*Cydonia Oblonga*). *Genet. Mol. Res., 10*, 2729-2746. https://doi.org/10.4238/2011.November.4.7
23. Gharaati, F., Jamei, R., Heidari, R. (2014). Phytochemical composition and antioxidant activity of different parts of quince (*Cydonia oblonga*). *Journal of Applied Botany and Food Quality, 87*, 36-40.
24. Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2015). Valorisation of agro-industrial wastes through the production of bioactive compounds: a review. *Industrial Crops and Products, 77*, 772-790.
25. Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products, 59*(2), 205-215. https://doi.org/10.1021/np960040+
26. He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartne,r S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C. R., Sodroski, J. Gabuzda, D. (1997).

CCR3 and CCR5 Are Co-Receptors for HIV-1 Infection of Microglia. *Nature, 385*, 645-649. https://doi.org/10.1038/385645a0

27. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 13*(10), 572-584. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5
28. International Diabetes Federation IDF. (2015). *The IDF Diabetes Atlas, 7th edition*. International Diabetes Federation IDF.
29. Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J., Lee, K. W. (2011). Polyphenols as Small Molecular Inhibitors of Signaling Cascades in Carcinogenesis. *Pharmacol. Ther., 130*, 310-324. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.02.004
30. Karar, M. G. E., Pletzer, D., Jaiswal, R., Weingart, H., Kuhnert, N. (2014). Identification, Characterization, Isolation and Activity against Escherichia coli of Quince (*Cydonia oblonga*) Fruit Polyphenols. *Food Res. Int., 65*, 121-129. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.040
31. Katiyar, D., Singh, V., Ali, M. (2016). Phytochemical and Pharmacological Profile of Pterocarpus Marsupium: A Review. *Pharma Innov. J., 5*, 31.
32. Kielhorn, S., Thorngate, J. H. (1999). Oral Sensations Associated with the Flavan-3-Ols (+)-Catechin and (−)-Epicatechin. *Food Qual. Prefer, 10*, 109-116. https://doi.org/10.1016/S0950-3293(98)00049-4
33. Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem., 50*, 3713-3717. https://doi.org/10.1021/jf020071c
34. Krentz, A. J., Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs, 65*(3), 385-411. https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005
35. Li, X., Bai, H., Yang, Y., Yoon, J., Wang, S., Zhang, X. (2019). Supramolecular Antibacterial Materials for Combatting Antibiotic Resistance. *Adv. Mater., 31*, 1805092. https://doi.org/10.1002/adma.201805092
36. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr., 79*, 727-747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727
37. Marwa, S. K., Khan, M. A., Ur-Rehman, F., Bhat, I. U. (2009). Aromatic Plant Species Mentioned in the Holy Qura'n and Ahadith and Their Ethnomedicinal Importance. *Pak. J. Nutr., 8*, 1472-1479. https://doi.org/10.3923/pjn.2009.1472.1479
38. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews, 52*(4), 673-751. https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01472-8

39. Muhammad, I.; Luo, W., Shoaib, R. M.; Li, G. L., Hassan, S. S., Yang, Z., Xiao, X., Tu, G., Yan, S. K., Ma, X. P., Jin, H. Z. (2021). Guaiane-type sesquiterpenoids from *Cinnamom ummigao* H. W. Li: And their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry, 190*, 112850. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112850
40. Muhtadi Primarianti, A. U., Sujono, T. A. (2015). Antidiabetic Activity of Durian (*Durio Zibethinus murr*.) and Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Fruit Peels in Alloxan Diabetic Rats. *Procedia Food Sci., 3*, 255-261. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.028
41. Nomoto, H., Iigo, M., Hamada, H., Kojima, S., Tsuda, H. (2004). Chemoprevention of Colorectal Cancer by Grape Seed Proanthocyanidin Is Accompanied by a Decrease in Proliferation and Increase in Apoptosis. *Nutr. Cancer, 49*, 81-88. https://doi.org/10.1207/s15327914nc4901_11
42. Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., Silva, B. M. (2007). Phenolic Profile of *Cydonia Oblonge* Miller Leaves. *J. Agric. Food Chem., 55*, 7926-7930. https://doi.org/10.1021/jf0711237
43. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., Pompliano, D. L. (2007). Drugs for Bad Bugs: Confronting the Challenges of Antibacterial Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery, 6*, 29-40. https://doi.org/10.1038/nrd2201
44. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products, 63*(7), 1035-1042. https://doi.org/10.1021/np9904509
45. Preuss, H. G., Montamarry, S., Echard, B., Scheckenbach, R., Bagchi, D. (2001). Longterm effects of chromium, grape seed extract, and zinc on various metabolic parameters of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry, 223*(1-2), 95-102. https://doi.org/10.1023/A:1017961029492
46. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science, 2*(4), 152-159. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2
47. Rop, O., Balík, J., Řezníček, V., Juríková, T., Škardová, P., Salaš, P., Sochor, J., Mlček, J., Kramářová, D. (2011). Chemical Characteristics of Fruits of Some Selected Quince (*Cydonia Oblonga* Mill.) Cultivars. *Czech J. Food Sci., 2011*, 29, 65-73. https://doi.org/10.17221/212/2009-CJFS
48. Sharma, B., Balomajumder, C., Roy, P. (2008). Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Flavonoid Rich Extract from Eugenia Jambolana Seeds on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Food Chem. Toxicol., 46*(7), 2376-2383. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.020
49. Shemchuk, O., Braga, D., Grepioni, F., Turner, R. J. (2020). Co-Crystallization of Antibacterials with Inorganic Salts: Paving theWay to Activity Enhancement. *RSC Adv., 10*, 2146-2149. https://doi.org/10.1039/C9RA10353H

50. Silici, S., Gören, A. C., Türkben, C. (2010). Antioxidant activity and chemical composition of Cydonia oblonga leaf. *Food Chemistry, 123*(3), 571-574.
51. Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. (2021). Quince (*Cydonia oblonga* Miller): An underutilized crop with promising health-promoting properties. *Food Chemistry, 127*, 808-815.
52. Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F. (2010). Natural products as α-amylase and α-glucosidase inhibitors and their hypoglycemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 10*(4), 315-331. https://doi.org/10.2174/138955710791331007
53. Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines, 5*, 93. https://doi.org/10.3390/medicines5030093
54. Urbanavičiūte, I., Liaudanskas, M., Bobinas, Č., Šarkinas, A., Rezgiene, A., Viskelis, P. (2020). Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) as a Potential Source of Phenols: Optimization of the Extraction Parameters and Assessment of Antiradical and Antimicrobial Activities. *Foods, 9*, 1132. https://doi.org/10.3390/foods9081132
55. Yamanaka, N., Oda, O., Nagao, S. (1997). Green Tea Catechins Such as (-)-Epicatechin and (-)-Epigallocatechin Accelerate Cu2+-Induced Low Density Lipoprotein Oxidation in Propagation Phase. *FEBS Lett., 401*, 230-234. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01455-X