Alpha amylase and angiotensin-converting enzyme-1 inhibitory effects of home-made pomegranate molasses

Dr. Wissam Zam*

(Received 26 / 6 / 2024. Accepted 1 / 8 / 2024)

□ ABSTRACT □

Pomegranate fruit and its products are rich sources of bioactive compounds, the most important of which are polyphenols. Pomegranate molasses is traditionally prepared in Syria and is considered to have a high nutritional value, which makes it of great importance. This study aims to evaluate the total polyphenols content and the antioxidant, anti-diabetic and anti-hypertensive properties in a number of home-made pomegranate molasses samples (10 samples). The average total content of polyphenols in the ten samples was 140.76±19.41 mg of gallic acid/g of sample. The samples also showed high antioxidant activity through the DDPH-scavenging activity assay, with IC50 values ranging between 0.05-0.13 mg/ml. As for anti-diabetic activity, the IC50 values for inhibiting the alpha-amylase enzyme for pomegranate molasses samples ranged between 0.83 and 3.67 mg/ml, which are values very close to the activity of the reference drug (acarbose). Finally, the rates of ACE inhibition for pomegranate molasses samples ranged between 32-41%, which indicates good antihypertensive effectiveness. As a result, it is recommended to use pomegranate molasses in the diets of diabetics and hypertensive patients in order to maintain blood sugar levels and blood pressure levels within their normal limits, through a synergistic mechanism and not an alternative to drug treatments.

Keywords: Pomegranate molasses, polyphenols, DPPH, alpha amylase enzyme, angiotensin-converting enzyme.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

*Assistant Professor - Faculty of Pharmacy - Tartous University - Tartous - Syria

النشاط المثبط لإنزيم ألفا أميلاز والإنزيم المحول للأنجيوتنسين-1 لعينات دبس الرمان منزلية الصنع

د. وسام زم*

(تاريخ الإيداع 26 / 6 / 2024. قبل للنشر في 1 / 8 / 2024)

□ ملخّص □

تعتبر فاكهة الرمان ومنتجاتها مصادر غنية بالمركبات النشطة حيوياً وأهمها مركبات البولي فنولات. يُحضر دبس الرمان بشكل تقليدي في سوريا وهو يعتبر ذو قيمة غذائية عالية مما يجعله ذا أهمية كبيرة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم محتوى البولي فنولات الكلي والخصائص المضادة للأكسدة والمضادة لمرض السكري وارتفاع ضغط الدم في عدد من عينات دبس الرمان منزلية الصنع (10 عينات). بلغ متوسط المحتوى الكلي للبولي فنولات في العينات العشر 140.76±19.41 ملغ من حمض الغاليك/ غرام من العينة، كما أظهرت العينات من خلال مقايسة العفالية الكابحة للـ DDPH نشاطًا مضادًا للأكسدة عالياً حيث تراوحت قيم IC50 بين 0.05-0.13 ملغ/مل. أما فيما يخص النشاط المضاد لمرض السكري، تراوحت قيم IC50 لتثبيط إنزيم ألفا أميلاز α-amylase لعينات دبس الرمان بين 0.83 و3.67 ملغ/مل، وهي قيم قريبة جداً من نشاط المادة المرجعية الدوائية (الأكاربوز). أخيراً، تراوحت نسب تثبيط الإنزيم المحول للأنجيوتنسين لعينات دبس الرمان بين 32-41% مما يدل على فعالية جيدة خافضة لضغط الدم. بالنتيجة لذا يُوصى باستعمال دبس الرمان في الحميات الغذائية الخاصة بمرضى السكري ومرضى ارتفاع الضغط من أجل الحفاظ على مستويات سكر الدم ومستويات ضغط الدم عند حدوده الطبيعية وذلك بآلية تآزرية وليست بديلة عن العلاجات الدوائية.

الكلمات المفتاحية: دبس الرمان، بولي فنولات، DPPH، إنزيم ألفا أميلاز، الإنزيم المحول للأنجيوتنسين.

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* **مدرسة- كلية الصيدلة – جامعة طرطوس- طرطوس- سورية**

مقدمة

تعتبر الفواكه مصادر غنية بالمركبات الفعالة حيوياً نظراً لاحتوائها على العديد من المركبات المضادة للأكسدة المرتبطة بخصائص طبية متنوعة وفوائد صحية عديدة [1]. تم استخدام الرمان (Punica granatum) على نطاق واسع في الطب الشعبي في العديد من الثقافات (Longtin، 2003). في الآونة الأخيرة، ثبت أن عصير الرمان يحتوي على نسبة عالية من النشاط المضاد للأكسدة (جيل وآخرون، 2000، شوبرت وآخرون، 1999). يُظهر عصير الرمان أيضًا فعالية خافضة لسكر الدم، خافضة للوزن، مضادة للالتهاب، خافضة لضغط الدم، مضادة للأورام [2]. ترتبط هذه التأثيرات بشكل أساسي مع المحتوى العالي من المركبات الفنولية المتنوعة الموجودة في عصير الرمان، بما في ذلك إيزومرات البونيكالاجين punicalagin ومشتقات حمض الإيلاجيك ellagic acid والأنثوسيانينات anthocyanins [3]. يُحضر دبس الرمان منزلياً عبر غلي عصير الرمان الطازج حتى الحصول على شراب سميك طعمه حلو وحامض، وهو قابض قليلاً [4]. يستخدم دبس الرمان بشكل شائع كعامل منكه في العديد من الأطباق لتحسين خصائص الرائحة والطعم.

يعتبر إنزيم ألفا أميلاز α-amylase (1,4-α-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) هدفًا علاجيًا رئيسيًا تم الاستفادة منه لتطوير العديد من الأدوية الصنعية مثل الأكاربوز [5]. يساعد هذا الإنزيم الموجود بشكل رئيسي في اللعاب والبنكرياس على بدء العملية الكيميائية لتحلل الكربوهيدرات عن طريق التحلل المائي للروابط الغليكوزيدية، وتحويل السكريات المعقدة إلى سكريات قليلة التماثر وسكريات بسيطة قابلة للامتصاص [6]. من المعروف أن المثبطات الصنعية المختلفة التي تتفاعل مع الموقع النشط وتضعف الوظيفة التحفيزية لهذا الإنزيم، فعالة كمضادات لمرض السكري مما حفز اهتمام الباحثين على تطوير العديد من مثبطات إنزيم الألفا أميلاز من مصادر طبيعية [7].

الأنجيوتنسينوجين هو غليكوبيتيد ذو وزن جزيئي 58.000-61.000 دالتون، يتم تصنيعه بشكل أساسي في الكبد ويتحول إلى أنجيوتنسين-1 عديم الفعالية بتأثير الرنين الكلوي المنشأ. يتحول بعدها الأنجيوتنسين-1 عديم الفعالية إلى أنجيوتنسين-2 الذي يتميز بفعاليته المقبضة للأوعية بفعل الإنزيم المحول للأنجيوتنسين ACE الذي يتواجد في بطانة العديد من الأوعية الدموية [8]. لذا فإن إحدى الاستراتيجيات العلاجية المهمة لعلاج ارتفاع ضغط الدم المزمن هي تثبيط الإنزيم المحول للأنجيوتنسين.

من أهم مثبطات الإنزيم المحول للأنجيوتنسين شائعة الاستخدام لعلاج ارتفاع ضغط الدم، وفشل القلبهي الكابتوبريل Captopril، ليزينوبريل Lisinopril، وإنالابريل Enalapril. ومع ذلك، فإن الاستخدام المزمن لهذه الأدوية يمكن أن يسبب بعض الآثار الجانبية مثل السعال، فرط بوتاسيوم الدم، الصداع، الدوخة، التعب، الغثيان، انخفاض ضغط الدم، وضعف الكلى [9]. لذلك اهتم الباحثون بتطوير واستخدام الأدوية العشبية كعوامل علاجية في الوقاية من ارتفاع ضغط الدم وتعزيز الصحة الاستقلابية [10].

يُحضر دبس الرمان بشكل تقليدي في سوريا وهو يعتبر ذو قيمة غذائية عالية مما يجعله ذا أهمية كبيرة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم محتوى البولي فنولات الكلي والخصائص المضادة للأكسدة والمضادة لمرض السكري وارتفاع ضغط الدم في عدد من عينات دبس الرمان منزلية الصنع (10 عينات) وذلك من خلال تقييم فعاليته المثبطة لإنزيم ألفا أميلاز والمثبطة للإنزيم المحول للأنجيوتنسين-1.

طرائق البحث ومواده

تحضير العينات

تم جمع عشر عينات من دبس الرمان منزلية الصنع من محافظتي حمص وطرطوس في الفترة بين 15 تشرين الثاني و15 كانون الأول من عام 2023، حيث تم إنتاج العينات بشكل تقليدي ويدوي عن طريق تنظيف ثمار الرمان وسحقها لاستخراج عصير الرمان وترشيح العصير ثم تركيزه عن طريق الغليان والتبخير في أوعية مفتوحة دون إضافة المزيد من السكر أو المواد المضافة أو حمض الليمون. بعد انتهاء عمليات التحضير، حفظت العينات في أوعية محكمة الإغلاق وبدرجة حرارة 1-4ْ م. قبل إجراء عمليات الفحص والتحليل، تم تمديد العينات بالماء المقطر بنسبة 1:4، حيث أجريت التجارب في كلية الصيدلة بجامعة طرطوس في الفترة بين 15 كانون الثاني و20 أيار من عام 2024.

تحديد المحتوى الكمي من البولي فنولات

تم تحديد المحتوى الكمي من البولي فنولات وفقًا لطريقة Folin–Ciocalteu الموصوف من قبل Martins وزملائه [11]، حيث تم وضع 100 ميكرولتر من العينة الممدة في أنبوب اختبار وتم مزجه مع 0.4 ميكرولتر من محلول كاشف Folin–Ciocalteu 10٪. بعد 3 دقائق، تمت إضافة 0.8 مل من محلول Na2CO3 بنسبة 1% وحضنت الأنابيب لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة. أخيراً، تم قياس امتصاصية العينات عند طول موجة 725 نانومتر مقابل محلول شاهد يحتوي على 100 ميكرولتر من الماء المقطر بدلاً من العينة. تم استخدام حمض الغاليك gallic acid كمادة عيارية، حيثتم التعبير عن النتائج كمكافئ لحمض الغاليك (مغ من حمض الغاليك/ غرام من العينة).

تحديد الفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH

تم تحديد الفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH باستخدام الإجراء الذي وصفه Matthäus [12]. حيث تم تفاعل 0.5 مل من العينة الممدة مع 0.2 مل من محلول DPPH المحضر بحل 5 غرام من الكاشف في 50 مل من الميتانول. وُضع المزيج في الظلام لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تم بعد ذلك تحديد الامتصاصية عند طول موجة 515 نانومتر. تم التعبير عن الفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH وفقًا للعلاقة التالية:

النسبة المئوية للقدرة المضادة للأكسدة % = $[(A_0-A_1)/A_0]$ * 100

حيث تعبر A_0 عن امتصاصية الشاهد السلبي بعد مرور 60 دقيقة، وتعبر A_1 عن امتصاصية عينة خلاصة الخرنوب بعد مرور 60 دقيقة.

تحديد النشاط المثبط لإنزيم ألفا أميلاز

تم تحديد النشاط المثبط لإنزيم α–amylase لعينات دبس الرمان بالطريقة الموصوفة بواسطة Mccue وزملائه [13]. تم تحضير خليط 0.03٪ (وزن/حجم) من إنزيم α–amylase في 100 مل من الماء المقطر. بعد ذلك، تم مزج 0.5 مل من العينة الممددة، و0.5 مل من محلول ألفا أميلاز، و0.5 مل من وقاء الفوسفات (pH=7) وحضنها عند درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، حيث تم استخدام 0.5 مل من الماء المقطر بدلاً من محلول العينة لتحضير المحلول الشاهد. بعد ذلك، تمت إضافة 0.5 مل من هلامة النشاء وحضن المزيج عند درجة الحرارة 25 درجة مئوية لمدة 10 دقائق في حمام مائي. تمت بعدها إضافة 1 مل من الكاشف اللوني 3,5–dinitrosalicylic acid (DNS)، وتم تسخين الخليط في حمام مائي عند درجة الحرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق ومن ثم تبريده إلى

درجة حرارة الغرفة. أضيف الماء المقطر إلى المزيج حتى الوصول إلى حجم 10 مل، ومن ثم تم تحضير محاليل بتراكيز 0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، و2.5 ملغ/مل. أخيراً، تم قياس الامتصاص عند طول الموجة 540 نانومتر.
تم حساب النشاط المثبط لإنزيم α-amylase وفقًا للمعادلة التالية:

$$\frac{(ABc - ABs)}{ABc} * 100$$

حيث ABc هو امتصاص محلول الشاهد عند طول الموجد 540 نانومتر وABs هو امتصاص العينة عند نفس طول الموجة. وتم التعبير عن النتائج من خلال حساب IC_{50} التي تعبر عن الكمية اللازمة من العينة من أجل تحقيق 50٪ من تثبيط الإنزيم.

تحديد النشاط المثبط للإنزيم المحول للأنجيوتنسين-1 (ACE)

تم تحديد النشاط المثبط لل ACE وفقًا لطريقة Li وزملائه [14]. تم استخدام 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES-HCL) لتحضير المحلول الموقي وذلك بإضافة 1.30 غرام من ملح HEPES و1.75 غرام من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر. تم استخدام هذا المحلول في تحضير Hippuryl-histidyl-leucine (HHL) وذلك عن طريق إذابة 6 ميكرولتر من HHL في 2 مل من محلول HEPES-HCl. تم تحضير محلول إنزيم ACE عن طريق خلط 0.33 وحدة منه في 1 مل من الماء المقطر.
تم مزج 100 ميكرولتر من عينات دبس الرمان الممددة مع 200 ميكرولتر من محلول HHL متبوعة بإضافة 50 ميكرولتر من محلول إنزيم ACE، وتم حضن المزيج عند 37 درجة مئوية. بعد مرور 15 دقيقة، تمت إضافة 0.25 مل من HCL لإيقاف التفاعل، كما تمت إضافة 2 مل من أسيتات الإيثيل لاستخلاص حمض الهيبوريك المحرر. تم إجراء طرد مركزي للمزيج عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق، وتم بعدها جمع 1 مل من طبقة ethyl acetate الطافية وتبخيرها باستخدام حمام ماء مغلي. بعد مرور 15 دقيقة، تمت إضافة 3 مل من الماء المقطر، وتم قياس كمية حمض الهيبوريك المحرر عن طريق قياس الامتصاص عند طول موجة قدره 228 نانومتر.
تم تحضير محلول شاهد عن طريق إضافة 200 ميكرولتر من HHL و 50 ميكرولتر من ACE في 100 ميكرولتر من الماء المقطر بدلاً من العينة.
تم تعريف نشاط ACE بنسبة 100% على أنه كمية حمض الهيبوريك المحررة في محلول الشاهد. تم تكرار التجربة ثلاثة مرات لكل عينة وتم حساب النسبة المئوية لتثبيط الإنزيم المحول للأنجيوتنسين باستخدام المعادلة التالية:

$$\frac{(ABc - ABs)}{ABc} * 100$$

حيث ABc هو امتصاص محلول الشاهد عند طول الموجة 228 نانومتر وABs هو امتصاص العينة عند نفس طول الموجة.

النتائج والمناقشة

المحتوى الكلي من البولي فنولات

بلغ متوسط المحتوى الكلي للبولي فنولات في العينات العشر 140.76±19.41 ملغ من حمض الغاليك/ غرام من العينة ويبين الجدول (1) المحتوى الكمي من البولي فنولات في كل عينة على حدى.

الجدول 1: المحتوى الكمي من البولي فنولات في عينات دبس الرمان المختلفة.

العينة	المحتوى الكمي من البولي فنولات (ملغ من حمض الغاليك/ غرام من العينة)
1	14.67±137.78
2	13.78±142.85
3	17.49±145.29
4	25.71±135.79
5	16.91±136.20
6	24.19±143.69
7	23.18±146.24
8	13.61±141.30
9	26.29±139.39
10	18.27±139.10

بشكل عام يعزى المحتوى العالي من البولي فنولات الكلية في دبس الرمان بالمقارنة مع عصير الرمان بسبب حقيقة دبس الرمان هو مركز عصير الرمان وهذا ما يتوافق مع العديد من الدراسات التي وجدت أن محتوى البولي فنولات الكلية في دبس الرمان كان أعلى بثلاث إلى عشر مرات من عصير الرمان الطازج [15, 16].

الفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH

تم تحديد قيمة IC_{50} للفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH لعينات دبس الرمان، حيث تراوحت القيم بين 0.05–0.13 ملغ/مل (الجدول 2)، وتجدر الإشارة إلى أن انخفاض قيم IC_{50} يشير إلى قوة النشاط المضاد للأكسدة.

الجدول 2: الفعالية الكابحة للجذور الحرة في عينات دبس الرمان المختلفة.

العينة	قيم IC_{50} للفعالية الكابحة للجذور الحرة DPPH
1	0.11
2	0.05
3	0.08
4	0.12
5	0.11
6	0.09
7	0.06
8	0.05
9	0.13
10	0.08

بينت العديد من الدراسات فعالية كابحة للجذور الحرة قوية لدبس الرمان تعود بشكل أساسي لمحتوى هذه العينات العالي من مضادات الأكسدة مثل الفيتامين C وحمض الغاليك gallic acid والروتين rutin وحمض الإيلاجيك ellagic acid [17].

النشاط المثبط لإنزيم ألفا أميلاز

تم خلال هذا البحث تحديد النشاط المضاد للسكري لعينات دبس الرمان التجارية باستخدام المقايسة المثبطة لإنزيم ألفا أميلاز α-amylase وتم التعبير عن النتائج من خلال حساب IC_{50} حيث تدل القيم المنخفضة على فعالية أعلى كنشاط مضاد للسكري. تم استخدام الأكاربوز وهو أحد الأدوية المضادة للسكري المعروفة كمادة معيارية مرجعية حيث بلغت IC50 له 0.51 ملغ/مل.

تراوحت قيم IC50 لتثبيط إنزيم ألفا أميلاز α-amylase لعينات دبس الرمان بين 0.83 و3.67 ملغ/مل. تدل هذه القيم أن فعالية دبس الرمان الخافضة لسكر الدم قريبة جداً من نشاط المادة المرجعية الدوائية (الأكاربوز) وهو ما يتوافق مع العديد من الدراسات السابقة [18, 19].

تؤكد الدراسات أن هذه الفعالية تعود لمحتوى دبس الرمان من الأحماض الفنولية مثل حمض الغاليك [20] وحمض الإيلاجيك [21]، كما يمكن أن تعود الفعالية أيضاً إلى المحتوى المرتفع من الروتين rutin والبونيكالاجين punicalagin [22, 23]. بالمجمل تستطيع المجموعات الهيدروكسيلية في المركبات الفنولية أن تشكل روابط هيدروجينية مع البروتينات الموجودة في الموقع النشط للإنزيم مما يؤدي إلى تثبيط فعاليته [24].

النشاط المثبط للإنزيم المحول للأنجيوتنسين-1 (ACE)

تراوحت نسب تثبيط الإنزيم المحول للأنجيوتنسين لعينات دبس الرمان بين 32-41%. وقد بينت الدراسات فعالية كل من pedunculagin و punicalin وحمض Gallagic كمثبطات للإنزيم المحول للأنجيوتنسين حيث تحجب هذه المركبات الإنزيم المحول للأنجيوتنسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية متعددة وتداخلات كارهة للماء مع أيونات الزنك بشكل مشابه للإنزيمات المثبطة للمعادن metalloproteinase ومواقع الفعالية الإنزيمية في النطاقين C و N للإنزيم المحول للأنجيوتنسين، وبالتالي تثبيط النشاط التحفيزي للإنزيم. أيضًا بينت الدراسات أن مركب pedunculagin قادر على تحفيز إنتاج أكسيد النيتريك (NO) ذو الخواص الموسعة الوعائية وتخفيض إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) [25, 26].

الاستنتاجات والتوصيات

- بينت الدراسة أن دبس الرمان يعتبر مصدراً جيداً للمركبات الفنولية التي تتمتع بخواص مضادة للأكسدة، حيث يوصى بتطوير طرق تحليلية لاستخلاص وتنقية هذه المركبات واستعمالها كمضادات أكسدة غذائية أو في الصناعة الدوائية والتجميلية.
- أثبتت الدراسة أن دبس الرمان يملك فعالية جيدة مثبطة لإنزيم ألفا أميلاز مقاربة لفعالية الأكاربوز، وبالتالي يُوصى باستعمال دبس الرمان في الحميات الغذائية الخاصة بمرضى السكري من أجل مؤازرة التراكيب الدوائية في ضبط مستويات سكر الدم.

- أثبتت الدراسة فعالية دبس الرمان المثبطة للإنزيم المحول للأنجيوتنسين-1 وبالتالي فعالية خافضة لضغط الدم، لذا يُوصى أيضاً باستعمال دبس الرمان في الحميات الغذائية الخاصة بمرضى ارتفاع الضغط من أجل الحفاظ على مستويات ضغط الدم عند حدوده الطبيعية وذلك بآلية تآزرية وليست بديلة عن العلاجات الدوائية.

Reference

1. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry 2006;96(2):254-260.
2. Al-Muammar MN, Khan F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (Punica granatum). Nutrition. 2012;28:595-604.
3. Amri Z, Zaouay F, Lazreg-Aref H, Soltana H, Mneri A, Mars M, et al. Phytochemical content, fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: comparison between edible and non-edible varieties grown in Tunisia. Int J Biol Macromol. 2017;104:274-80.
4. Arafa S. Chemical and Biological Studies on Some Pomegranate Products. Egypt. J. Agric. Sci. 2013;64:396–408.
5. Alqahtani AS, Hidayathulla S, Rehman MT, ElGamal AA, Al-Massarani S, Razmovski-Naumovski V, et al. Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from nuxia oppositifolia. Biomolecules 2019;10:E61.
6. Ogunyemi OM, Gyebi GA, Saheed A, Paul J, Nwaneri-Chidozie V, Olorundare O, Adebayo J, Koketsu M, Aljarba N, Alkahtani S, Batiha GE-S and Olaiya CO. Inhibition mechanism of alpha-amylase, a diabetes target, by a steroidal pregnane and pregnane glycosides derived from Gongronema latifolium Benth. Front. Mol. Biosci. 2022;9:866719.
7. Lankatillake C, Luo S, Flavel M, Lenon GB, Gill H, Huynh T, et al. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: Protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α-amylase, α-glucosidase and lipase assays. Plant Methods 2021;17:3.
8. Belović MM, Ilić NM, Tepić AN, Šumić ZM. Selection of conditions for angiotensin-converting enzyme inhibition assay: Influence of sample preparation and buffer. Food Feed Res 2013;40(1):11-5.
9. Kostis WJ, Shetty M, Chowdhury YS, Kostis JB. ACE inhibitor-induced angioedema: A review. Curr. Hypertens. Rep. 2018;20:55.
10. Kumar R, Sharma R, Bairwa K, Roy RK, Kumar A, Baruwa A. Modern development in ACE inhibitors. Lettre, Der Pharmacia 2010;2(3):388-419.
11. Martins GR, Monteiro AF, do Amaral FRL, da Silva AS. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. J Food Sci Technol. 2021;58(12):4693-4702.
12. Matthäus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002;50(12):3444-3452.
13. Mccue P, Kwon YI, Shetty K. ANTI-AMYLASE, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. Journal of Food Biochemistry 2005;29(3):278-294.

14. Li GH, Liu H, Shi YH, Le GW. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. J Pharm Biomed Anal. 2005;37(2):219-24.
15. Chalfoun-Mounayar A, Nemr R, Yared P, Khairallah S, Chahine R. Antioxidant and Weight Loss Effects of Pomegranate Molasses. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2012;2(6):45-50.
16. Yilmaz Y, Çelik I, Isik F. Mineral composition and total phenolic content of pomegranate molasses. Journal of Food, Agriculture & Environment 2007;5(3-4): 102-104.
17. Kamal YT, Alam P, Alqasoumi SI, Foudah AI, Alqarni MH, Yusufoglu HS. Investigation of antioxidant compounds in commercial pomegranate molasses products using matrix-solid phase dispersion extraction coupled with HPLC. Saudi Pharmaceutical Journal 2018;26(6):839-844.
18. Kam A, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Nammi S, Shi J, Chan K, Li GQ. A comparative study on the inhibitory effects of different parts and chemical constituents of pomegranate on α-amylase and α-glucosidase. Phytother Res. 2013;27(11):1614-20.
19. Šavikin K, Živković J, Alimpić A, Zdunić G, Janković T, Duletić-Laušević S, Menković N. Activity guided fractionation of pomegranate extract and its antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative properties. Industrial Crops and Products 2018;113:142-149.
20. Ullah MA, Tungmunnithum D, Garros L, Drouet S, Hano C, Abbasi BH. Effect of Ultraviolet-C Radiation and Melatonin Stress on Biosynthesis of Antioxidant and Antidiabetic Metabolites Produced in In Vitro Callus Cultures of *Lepidium sativum* L. Int. J. Mol. Sci. 2019;20:1787.
21. Pottathil S, Nain P, Morsy MA, Kaur J, Al-Dhubiab BE, Jaiswal S, Nair AB. Mechanisms of Antidiabetic Activity of Methanolic Extract of *Punica granatum* Leaves in Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. Plants. 2020;9:1609.
22. Di Sotto A, Locatelli M, Macone A, Toniolo C, Cesa S, Carradori S, Eufemi M, Mazzanti G, Di Giacomo S. Hypoglycemic, Antiglycation, and Cytoprotective Properties of a Phenol-Rich Extract from Waste Bark of *Punica granatum* L. var. Dente di Cavallo DC2. Molecules. 2019;24:3103.
23. Bellesia A, Verzelloni E, Tagliazucchi D. Pomegranate ellagitannins inhibit α-glucosidase activity in vitro and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. Int. J. Food Sci. Nutr. 2015;66:85–92.
24. Habib HM, El-Fakharany EM, Souka UD, Elsebaee FM, El-Ziney MG, Ibrahim WH. Polyphenol-Rich Date Palm Fruit Seed (Phoenix dactylifera L.) Extract Inhibits Labile Iron, Enzyme, and Cancer Cell Activities, and DNA and Protein Damage. Nutrients 2022;2022:3536.
25. Ali MY, Jannat S, Chang MS. Discovery of Potent Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Pomegranate as a Treatment for Hypertension. J Agric Food Chem. 2023;71(30):11476-11490.
26. Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Muguerza B. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. PLoS One. 2012;7(11):e49493.