



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GREYFURT KABUĞU ATIKLARINDAN NARİNGİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZGE AKSAY

DOKTORA TEZİ

ADANA, 2024



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GREYFURT KABUĞU ATIKLARINDAN NARİNGİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
ÖZGE AKSAY
DOKTORA TEZİ**

**Danışman
PROF.DR. HAŞİM KELEBEK**

ADANA, 2024

JÜRİ ONAY SAYFASI

GREYFURT KABUĞU ATIKLARINDAN NARİNGİNİN SAFLAŞTIRILMASI, PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında 19501003008 numaralı Özge AKSAY tarafından ilgili yönetmeliklerin belirlediği şartlar doğrultusunda tamamlanan **Doktora** aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca onaylanmıştır.

Doç. Dr. Mustafa AKYOL
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Zafer ERBAY
Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Danışman

Tez Jürisi

Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Serkan SELLİ
Çukurova Üniversitesi

Doç. Dr. Kemal ŞEN
Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi

Doç. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

26/12/2024

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

..../..../20..

[İmza]

Özge AKSAY

ÖZET

GREYFURT KABUĞU ATIKLARINDAN NARİNGİNİN SAFLAŞTIRILMASI, PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özge AKSAY

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Haşim KELEBEK

Aralık 2024, 165 sayfa

Bu tez çalışmasında narenciye endüstrisinin önemli bir yan ürünü olan greyfurt kabuklarından naringin saflaştırılmış ve daha sonra bir nanotaşıyıcı sistem olan pronizomlar ile enkapsüle edilerek serbest ve kapsüllenmiş formları biyoaktif özellikleri açısından analiz edilmiştir. Ekstraksiyon koşulları, çözücü oranı (%60-80), örnek miktarı (20-40 g) ve ekstraksiyon süresi (70-120 saat) dikkate alınarak optimize edilmiştir. Optimize edilen ekstraksiyon koşulu % 67,16 çözücü konsantrasyonu, 38 g örnek miktarı ve 119 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu ekstraksiyon koşulu sonucunda oluşan kristal miktarı 2,78 g ve kristal yapıdaki naringin miktarı %98,27 saflıkta 2,73 g olarak belirlenmiştir. Proniozomal formülasyonlar, değişen miktarlarda naringin bileşiği ve farklı tipte stabilizatörler (kolesterol, dodekanol) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar daha sonra fizikokimyasal özellikleri açısından karakterize edilmiş ve ileri analizler için kolesterol bazlı ve 50 mg naringin bileşiği yüklü proniozom formülasyonu seçilmiştir. Seçilen formülasyonda üretilen proniozomal tozlar yüksek enkapsülasyon etkinliğine (%70) sahip küçük veziküler yapılar (180 nm) oluşturmuştur. Ayrıca, proniozomal tozların yüksek zeta potansiyel değeri (-48 mV) ile kararlı bir yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Proniozom içerisindeki naringinin yapısında kimyasal değişiklikler olmadığını, ancak fiziksel formülasyon değişiklikleri ile etkileşimde

olduğunu FTIR analizi göstermektedir. Fizikokimyasal karakterizasyon, naringinin niozomal yapı içinde başarılı bir şekilde kapsüllenmesini doğrulamıştır ve bu da stabilite ve sürekli salım özelliklerinin iyileştirilmesiyle açısından önemli bir parametredir. Naringinin serbest formunun proniozomal naringine göre daha yüksek düzeyde antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde içeriği sergilediği gözlenmiştir. Naringin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* test mikroorganizmalarına karşı düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri ile antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Ayrıca, naringinin serbest formu, H₂O₂ fotolizinin neden olduğu oksidatif hasara karşı plazmid DNA üzerinde gözlemlenebilir bir koruyucu etki göstermiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim modeli, proniozomal enkapsülasyonun naringinin yapısını bozmadan salımını kontrol edebildiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyoerişilebilirlik, DNA hasarı, Greyfurt kabuğu, Naringin, Proniozomal naringin

ABSTRACT

PURIFICATION, PRONIOSOMAL ENCAPSULATION AND DETERMINATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF NARINGIN FROM GRAPEFRUIT PEEL WASTES

Özge AKSAY

PhD, Food Engineering of Department

Supervisor: Prof. Dr. Hasim KELEBEK

December 2024, 165 pages

In this thesis, naringin was purified from grapefruit peels, a significant by-product of the citrus industry. It was then encapsulated with proteasomes, a nanocarrier system, and its free and encapsulated forms were analyzed for their bioactive properties. The extraction conditions were optimized by considering the solvent ratio (60-80 %), the amount of sample (20-40 g), and the extraction time (70-120 hour). The optimized extraction condition was determined as 67,16 % solvent concentration, 38 g sample amount and 119 hour extraction time. This extraction condition resulted in 2,78 g of crystal formation, and the amount of naringin in the crystal structure was found to be 2,73 g, with a purity of 98,27%. Proniosomal formulations were prepared using varying amounts of naringin compound and different types of stabilizers (cholesterol, dodecanol). These formulations were then characterized in terms of their physicochemical properties and proniosomal formulation based on cholesterol and loaded with 50 mg naringin compound was selected for further analyses. The proniosomal powders produced in the selected formulation formed small vesicular structures (180 nm) with high encapsulation efficiency (70%). Additionally, it was determined that proniosomal powders had a stable structure with a high zeta potential value (-48 mV). FTIR analysis shows that there are no chemical changes in the structure of naringin within the proniosome, but it interacts with physical formulation changes. Physicochemical characterization confirmed the successful encapsulation of naringin within the niosomal structure, which is an important parameter for improving stability and sustained release properties. It was observed that the free form of

naringin exhibited a higher level of antioxidant capacity and total phenolic substance content than proniosomal naringin. Naringin exhibited antimicrobial activity, with a low minimum inhibitory concentration (MIC), against the test microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the free form of naringin showed an observable protective effect on plasmid DNA against oxidative damage caused by the photolysis of H₂O₂. *In vitro* gastrointestinal digestive tract model revealed that proniosomal encapsulation was found to be capable of controlling the release of naringin without disturbing its structure.

Keywords: Bioaccessibility, DNA damage, Grapefruit peel, Naringin, Proniosomal naringin



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım ve eğitimim süresince her zaman yanımda olan, değerli fikirleri ile bana yol gösteren, beni yönlendiren, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Haşim KELEBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezin yürütülmesi sırasında yapmış oldukları katkılardan dolayı Tez İzleme Komitesi Üyeleri sayın Prof. Dr. Serkan SELLİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN'e, tez jürisinde yer alarak tezime katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK ve Doç. Dr. Kemal ŞEN'e, analizlerim için laboratuvarında çalışmama olanak sağlayan Doç. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK'e ayrıca sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında, yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşım Ceren İLGİZ'a kıymetli desteği için çok teşekkür ederim.

Destekleri hep üzerimde olan canım aileme, her zaman değerli hissettiren, çok sevdiğim canım eşim Kerim Emre AKSAY'a sabrı ve emeğine duyduğu saygı için sonsuz teşekkür ederim. Bu tez 21803001 no'lu proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve “Hijyen, Sanitasyon ve Gıda Güvenliği” alanında YÖK 100/2000 bursu tarafından desteklenmiştir. Doktora tezimi destekleyerek uygun şekilde yürütülmesini sağlayan Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi BAP birimine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	ii
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Tarımsal Atıkların Değerlendirilmesi	6
2.2. Greyfurt Atığının Değerlendirilmesi	10
2.3. Naringinin Önemi.....	15
2.4. Naringinin Ekstraksiyonu, İzolasyonu ve Karakterizasyonu	21
2.5. Nano-Enkapsülasyon Yöntemleri	28
2.6. Proniozomal ve Niozomal Nano-Taşıyıcı Sistemler	35
3. MATERYAL VE METOT	48
3.1. Örneklerin Temin Edilmesi	48
3.2. Kimyasallar	49
3.3. Naringin Bileşiğinin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu	49
3.4. Naringin Bileşiğinin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu	50
3.5. Naringinin Karakterizasyonu	50
3.6. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi	51
3.7. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	52

3.8. Mikrobiyolojik Analizler.....	52
3.8.1. Antimikrobiyal aktive tayini.....	52
3.8.2. Minumum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi	53
3.8.3. DNA koruyucu etkinin belirlenmesi	53
3.9. <i>İn vitro</i> Sindirim	54
3.10. Proniozomların Hazırlanması ve Formülasyonunun Belirlenmesi	55
3.11. Proniozomların Karakterizasyonu	56
3.11.1. Partikül boyutu ve polidispersite indeks (PDI)	56
3.11.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	57
3.11.3. Nem tayini	57
3.11.4. Enkapsülasyon etkinliği.....	58
3.11.5. Stabilite çalışması.....	58
3.12. İstatiksel Analiz.....	59
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	60
4.1. Naringin Bileşiğinin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu	60
4.2. Proniozomların Hazırlanması ve Proniozomal Formülasyonun Belirlenmesi.....	71
4.2.1. Zeta, PDI, Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçlarının Değerlendirilmesi	71
4.3. Stabilite Çalışması.....	77
4.4. Naringin ve Proniozomal Naringinin FTIR Analizi.....	80
4.5. Naringin ve Proniozomal Naringinin Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi	84
4.6. Naringin ve Proniozomal Naringinin Toplam Fenolik Madde Yönünden Değerlendirilmesi	87
4.7. Antimikrobiyal Aktivitenin ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK)	88
4.8. DNA Koruyucu Etkinin Belirlenmesi	95
4.9. <i>In Vitro</i> Sindirim	98
5. SONUÇLAR	104
KAYNAKÇA	106

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Greyfurt üretiminde önemli iller (2022, %)	10
Şekil 2.2. <i>Citrus paradisi</i> 'nin enine kesitinde görülen yapılar	14
Şekil 2.3. Naringinin yapısı	15
Şekil 2.4. Naringinin farklı biyolojik sistemler üzerindeki sağlık etkileri	18
Şekil 2.5. Lipozomun yapısı	33
Şekil 2.6. Niozomun yapısı	37
Şekil 2.7. Proniozomların niozomlara hidrasyonu ve niozomların hidrofilik, hidrofobik kısımları	40
Şekil 2.8. Proniozom hazırlama yöntemleri	42
Şekil 3.1. Kurutulmuş albedo örnekleri	48
Şekil 3.2. Naringin ekstraksiyon ve kristalizasyon aşaması	49
Şekil 3.3. Folin-Ciocalteu reaktif yöntemi ile toplam fenolik madde tayini	51
Şekil 3.4. Jel elektroforez yöntemi	54
Şekil 3.5. Bulamaç yöntemi ile proniozomların hazırlanması	56
Şekil 3.6. Partikül boyutu ve PDI değerinin belirlenmesi	57
Şekil 3.7. Nem tayini	57
Şekil 4.1. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapının miktarındaki değişim için cevap-yüzey grafiği	64
Şekil 4.2. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarındaki değişim için cevap-yüzey grafiği	67
Şekil 4.3. Optimum koşullarda üretilen naringine ait kromatogram	69
Şekil 4.4. Farklı denemelerden elde edilen niozomların HPLC kromatogramı	73
Şekil 4.5. Proniozomal naringinin FTIR spektrumu	81
Şekil 4.6. Naringinin FTIR spektrumu	81
Şekil 4.7. Örnek yüklenmemiş proniozomun FTIR spektrumu	82
Şekil 4.8. Naringinin <i>S. aureus</i> 'a karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)	89
Şekil 4.9. Naringinin <i>E. coli</i> 'ye karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)	90
Şekil 4.10. Naringinin <i>P. aeruginosa</i> karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)	91
Şekil 4.11. Örneklerin H ₂ O ₂ 'nin fotolizi tarafından üretilen OH'ye karşı plazmid DNA'nın korunması üzerindeki etkilerinin jel görüntüleri. 1: Marker, 2: Plazmid DNA, 3: Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ , 4: Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ + UV, 5: NRG+ Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ , 6: NRG+ Plazmid DNA+ UV, 7: NRG+ Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ + UV, 8: PNRG3+Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ , 9: PNRG3+Plazmid DNA+ UV, 10: PNRG3+Plazmid DNA+ UV+ H ₂ O ₂ , 11: Kontrol+ Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ , 12: Kontrol+ Plazmid DNA+ UV, 13: Kontrol+ Plazmid DNA+ H ₂ O ₂ + UV.	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Turunçgil fenolik bileşiklerinin fonksiyonel özellikleri ve ana uygulama alanları .	8
Tablo 2.2. <i>Citrus paradisi</i> kompozisyonu	11
Tablo 2.3. Farklı türdeki greyfurt kabuğu ekstraktları için flavanon glikozitler, flavanonlar ve polimetoksillenmiş flavonlar içeriği (mg/g kuru ağırlık).	13
Tablo 2.4. Naringinin tedavi edici etkileri.....	20
Tablo 2.5. Sürfaktanların HLB ve geçiş sıcaklığı değerleri	41
Tablo 3.1. Box Behnken Dizayn tasarımı ile optimize edilen greyfurt kabuğu ekstraksiyonunun proses değişken kodları	50
Tablo 3.2. Kolesterol ve dodekanol lipid fazlı proniozom toz formülasyonlarının bileşimi...	55
Tablo 4.1. Box Behnken dizayn tasarımı ile optimize edilen greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı miktarının ve kristal yapıdaki naringin içeriği	60
Tablo 4.2. Greyfurt kabuğundan farklı ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişen kristal yapı miktarları sonucu elde edilen ardışık model kareler toplamı	61
Tablo 4.3. Greyfurt kabuğundan oluşturulan kristal yapı miktarı için model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerine etkisi ile ilgili varyans analizi (ANOVA)	63
Tablo 4.4. Greyfurt kabuğunun farklı ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişen naringin miktarları sonucu elde edilen ardışık model kareler toplamı	65
Tablo 4.5. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarı için model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerine etkisi ile ilgili varyans analizi (ANOVA)	66
Tablo 4.6. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı ve kristal yapıdaki naringin miktarının yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulan Box Behnken deney tasarımındaki optimum ekstraksiyon koşulları	68
Tablo 4.7. Proniozomlara ait karakterizasyon sonuçları	72
Tablo 4.8. KONTROL ve PNRG3 örneklerinin 28 gün boyunca boyut, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri	78
Tablo 4.9. Naringin ve proniozomal naringinin antioksidan kapasite analiz sonuçları	85
Tablo 4.10. Naringin ve proniozomal naringinin toplam fenolik madde analiz sonuçları.....	87
Tablo 4.11. Naringin ve naringin yüklü proniozomun bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapı)	88
Tablo 4.12. <i>İn vitro</i> sindirim sırasında toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler	100

KISALTMALAR

DES	: Derin Ötektik Çözücü
MDE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
UDE	: Ultrasound Destekli Ekstraksiyon
SCE	: Süperkritik Destekli Ekstraksiyon
PEF	: Darbeli Elektrik Alanların Uygulanması
PRG	: Pregabalin
NRG	: Naringin
PNRG3	: 50 mg örnek yüklü proniozom
NRN-TN	: Naringin Yüklü Transniozom
RMD	: Dirençli Maltodekstrin
SSF	: Tükürük Sıvısı
SGF	: Simüle Gastrik Sıvı
SIF	: Simüle İntestinal Sıvı
NN-NP _o	: Sodyum Alijinat Kullanılan Naringin Yüklü Partikül
Ns	: Niozom
HLB	: Hidrofilik Lipofilik Denge
T _c	: Faz Geçiş Sıcaklığı
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
DAD	: Diyot Array Dedektör
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
OD	: Optik Yoğunluk
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrihidrazil
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
TAE	: Tris Asetat
PDI	: Polidispersite İndeks

PP-NG	: Pickering Emülsiyonu ile Enkapsüle Edilen Naringin
CAN	: Candesartan Cilexetil
P-gp	: P-glikoprotein
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
BCS	: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TFM	: Toplam Fenolik Madde
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri

SEMBOLLER

°C	: Santigrat derece
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mL	: Mililitre
t	: Zaman
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
kob	: Koloni
U	: 1 mikromol substratın reaksiyonunu katalize eden enzim miktarı
Nm	: Partükül boyutu
mV	: Milivolt
IC50	: Maddenin maksimum inhibitör etkisinin yarısını gösterdiği konsantrasyon

1. GİRİŞ

Nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşmenin hızlanması ile çevreye geliş güzel bırakılan atık miktarı ve türü her geçen gün artmaktadır. Bundan dolayı özellikle katı atıklar günümüzün en önemli çevre sorunlarından birisi haline gelmiştir. Emek ve yüksek maliyetler ile yetiştirilen bir bitkinin, sadece tüketilen kısmının alınıp geri kalanının atılması, emeğin ve girdilerin de çöpe atılması anlamına gelmesi sebebiyle atıkların değerlendirilmesi günümüzün önemli konularından biri haline gelmiştir (Alkaya, Erguder ve Demirer, 2010). Atık Yönetimi Yönetmeliği'ne göre atık; “üreticisi veya fiilen elinde bulunduran gerçek veya tüzel kişi tarafından çevreye atılan veya bırakılan ya da atılması zorunlu olan herhangi bir madde veya malzeme” olarak ifade edilmektedir (Atık Yönetimi Yönetmeliği, 2015). Gıda atıkları ise tarladan sofraya, gıda tedarik zincirinin her aşamasında, üretici, işlemci, perakendeci ve tüketicilerden kaynaklı, kaybolan gıda olarak tanımlanabilmektedir (Bellemare, Çakir, Peterson, Novak ve Rudi, 2017). Bir başka tanıma göre ise, insan tüketimine uygun kaliteli gıdaların bireyler tarafından atılarak tüketilemeyen gıda olarak açıklanmaktadır (Lipinski, Hanson, Waite, Searchinger ve Lomax, 2013; Özkan, Subaşı, Beştepe ve Güven, 2022).

Narenciye işleme endüstrisinde üretilen turunçgil kabukları, çekirdekleri ve zar kalıntıları, meyvenin toplam ağırlığının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır (Mahato, Sinha, Sharma, Koteswararao ve Cho, 2019). Bu nedenle, turunçgil atığının ekonomik açıdan değerli ürünlere dönüştürülme potansiyelinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde önemli ekonomik değeri olmasa da atık sınıfına giren turunçgil kabukları fermantasyona uğraması ve mikrobiyal bozulma gibi nedenlerle ekonomik ve çevresel sorunların kaynağı haline gelmektedir. Bununla birlikte turunçgil kabukları narenciye endüstrisinin değerli bir yan ürünü olmakla birlikte gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde, fermente edilerek veya kurutularak biyogaz, etanol, hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Mahato ve diğerleri, 2019; O'sullivan, Lynch, Morrissey ve O'Grady, 2003). Turunçgil kabuğu kullanmanın en büyük avantajları,

kolayca bulunabilmesi ve yenilenebilen ucuz bir biyokütle kaynağı olmasıdır (Chavan, Singh ve Kaur, 2018).

Turunçgil kabuğu, polifenoller, pektinler, proteinler, pigmentler, diyet lifleri ve uçucu yağlar dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşiklerin değerli bir doğal kaynağı olmakla birlikte bu biyoaktif bileşikler dikkate değer biçimde antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, anti-inflamatuar ve antidiyabetik aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Huang, Liao, Qi, Jiang ve Yang, 2021; Liu ve diğerleri, 2021; Panwar, Saini, Panesar ve Chopra, 2021). Bu nedenle, turunçgil kabuğu, işlevsel gıdaların umut vadeden bir kaynağı olarak düşünülebilmektedir. Ayrıca gıda renklendirici, tatlandırıcı ve koyulaştırıcı madde olarak da kullanılabilir. Turunçgil kabuklarının farklı türlerinde bulunan değerli biyoaktif bileşikler ve bu bileşikler kabuktan çıkarmak için etkili ekstraksiyon tekniklerini araştıran birçok çalışma mevcuttur (Vilet, Gué, Servent, Delalonde ve Wisniewski, 2020). Turunçgil işleme endüstrisinde turunçgil kabuğu şeklinde üretilen atık, gıda işleme hattına gıda katkı maddesi olarak yeniden girerek potansiyel ekonomik faydalar gösterirken, gıda atığı kullanımına sürdürülebilir ve yenilikçi yaklaşımlar sunmaktadır (Wedamulla, Fan, Choi ve Kim, 2022).

Greyfurt (*Citrus paradisi*), flavonoid ve fenolik bileşiklerle ilişkili birçok besinsel ve antioksidan özelliğe sahip turunçgiller meyvesine aittir (Rafiq ve diğerleri, 2018). Greyfurt hem taze olarak pazarda hem de işleme için tüketilmektedir (Zheng, Zhang, Quan, Zheng ve Xi, 2016). Greyfurtların işlenmesi, meyve ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturan meyve suyudur ve geri kalanını kabuklar, çekirdekler ve posalardan oluşan yan ürünlerdir (Wilkins, Widmer, Grohmann ve Cameron, 2007). Kabuklar birincil yan ürün olarak kabul görmektedir ve doğal antioksidanların zengin bir kaynağıdır (Ahmad ve Langrish, 2012; El Kantar ve diğerleri, 2019).

Nutrasotik yararları yıllardır bilinen ve son dönemlerde bilimsel çalışmalarda da desteklenen greyfurt kabuğu, içerdiği fenolik bileşiklerle ilişkilendirilmiştir. Greyfurt kabuğunda bulunan fenolik bileşikler, terpenler, seskiterpenler, hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, esterler, flavanoidler gibi çok sayıda bileşikten oluşmaktadır (Cristóbal-Luna, Álvarez-González, Madrigal-Bujaidar ve Chamorro-Cevallos, 2018). Greyfurttaki acı tadın, flavanonlar (naringin ve hesperidin) ve limonoidlerin (limonin) den ileri gelmektedir (Ribeiro ve Ribeiro 2008). Greyfurt kabuğunun antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinin varlığı birçok *in vitro* çalışmada mevcuttur (Ademosun, 2022; Castro-Vazquez ve diğerleri, 2016; Negi ve Jayaprakasha, 2001; Okunowo, Oyedeji, Afolabi ve Matanmi, 2013).

Polifenoller, gıda endüstrilerinde lipitlerin bozulmasını ve oksidasyonunu önlemek için kullanılmaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Ayrıca kanser gibi oksidatif stresle ilişkili birçok hastalığa karşı da faydalıdır. Greyfurt kabuklarında bulunan polifenoller arasında en bol bulunan flavonoid naringindir. Naringin antioksidan, antikanser, antiviral, anti-inflamatuar ve anti-kardiyovasküler etkiler dahil olmak üzere birçok farmakolojik aktiviteye sahiptir (Mahmoud, Hernandez Bautista, Sandhu ve Hussein, 2019; Ahmed, AbouZid, Ahmed, Zaky ve Liu, 2021; Alam, Mohammadin, Shafique, Amjad ve Asad, 2022). Ayrıca obezite ve diyabet tedavisinde, gıda katkı maddesi olarak, gıda endüstrisinde gıda ve içeceklerde doğal bir pigment ve acılaştırıcı madde olarak ve tatlandırıcıların sentezi için bir öncü malzeme olarak kullanılmaktadır (Niu, Ren, Li, Zeng ve Li, 2021; Liu, Qiao, Gu, Yang ve Yang, 2017, Raafat ve diğerleri, 2018). Naringinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda farklı hücresel yollarla çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini engellediği sonucuna varılmıştır (Memariani, Abbas, Ul Hassan, Ahmadi, ve Chabra, 2021). Naringinin önemli bir biyoaktif bileşik olması, aynı zamanda da atık değerlendirilmesi sebebiyle greyfurt kabuklarından izole edilmesini gündeme getirmiştir.

Naringin oral yoldan alındığında, ana metaboliti olan naringenin'e hidrolize edilir (Bacanlı, Başaran ve Başaran 2015). Naringenin kısmen emilir ve faz I ve faz II reaksiyonlarında glukuronid ve sülfat metabolitlerine metabolize edilir. Bu hızlı metabolizasyon olayları nedeniyle, naringenin farklı kronik hastalıklardaki terapötik etkilerini artırmak için nanopartikül tabanlı sistemler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Secerli ve diğerleri, 2023; Dall'Asta ve diğerleri, 2013). Naringenin istenmeyen acı tadı ve suda zayıf çözünürlüğü, çoğunlukla fonksiyonel gıdalarda, besin ürünlerinde ve farmasötik ürünlerde kullanımını kısıtlamaktadır. Suda çözünürlüğü artırmak ve aynı zamanda naringenin acı tadını azaltmak için güvenli ve ekonomik bir yaklaşım geliştirmek, fonksiyonel gıdalarda araştırma odağı olmuştur. Niozomlar, fenoliklerin daha stabil yapılarla hapsolmasını sağlayarak, gıda ürünlerine ilave edilmeleri durumunda gıda sistemlerinin dayanıklılığına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir (Moammeri ve diğerleri, 2023).

Niozom nanoformülasyonları, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve kolesterolden oluşan ve benzersiz özelliklere sahip veziküller oluşturan gelişmiş ilaç dağıtım sistemleridir. Bu nanoveziküller, suda az çözünen bileşiklerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını iyileştirmede dikkate değer bir potansiyel göstermektedir (Jabri ve diğerleri, 2019). Niozomlar, çok çeşitli terapötik ajanları kapsülleyerek bunları bozulmadan koruyabilmekte ve stabilitelerini arttırabilmektedir. Yapıları, kontrollü ve sürekli ilaç salımına izin vererek uzun süreli terapötik etkilere ve azaltılmış dozlama sıklığına yol açmaktadır (Bharti, Rani, Krishnamurthy, ve Arya, 2014). Çok yönlü taşıyıcılar olarak niozom nanoformülasyonları, bileşiklerin etkinliğini artırma konusunda umut vaat etmektedir. Greylift kabuğundan izole edilen naringenin niozom yöntemiyle enkapsüle edilerek gıda ürünleri içerisindeki kullanımı fonksiyonel ürün özellik göstermesinin yanısıra organoleptik etkilerinin giderilmesi ve biyoyararlılığının artırılması açısından önemlidir.

Bu tez kapsamında, greyfurt kabuğundan naringin saflaştırılması sağlanarak naringin yüklü niozomal formülasyonun geliştirilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmış, enkapsülasyonun naringinin biyoaktif ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tarımsal Atıkların Değerlendirilmesi

Tarımsal atıkların değerlendirilmesi ve yenilebilir ürünlerin sürdürülebilir şekilde üretilmesi hem ekoloji hem de insanlık için son derece önemlidir. Hasattan sonra atıkların bir kısmı gübre olarak kullanılsa da büyük bir kısmı biyolojik olarak doğaya bırakılmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için genetik, metabolik ve biyolojik çalışmalar yapılarak yüksek verimlilikte mahsül almak ve ortaya çıkan atıklardan yan ürünler elde etmek son dönemlerde ilgi odağı haline gelmiştir. Turunçgiller, yıllık 10,07 milyon hektar hasat alanı ve 158,49 milyon tonluk üretim oranıyla dünyanın en çok yetiştirilen meyve ailelerinden biridir (FAO, 2022). Turunçgil işleme endüstrileri yılda yaklaşık 50 milyon metrik ton atık üretmektedir (Mahato, Sinha, Sharma, Koteswararao ve Cho, 2019) ve üretilen atıkların %50-55'ini kabuklar oluşturmaktadır (Suri, Singh ve Nema, 2022). USDA (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı) verilerine göre, 2022/23 piyasa yılında dünyada yaklaşık 48 milyon ton portakal, 37 milyon ton mandalina, 9 milyon ton limon, 7 milyon ton greyfurt üretimi olmak üzere toplam 101 milyon ton turunçgil üretimi gerçekleşmiştir. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri'ne göre, 2022 yılında 1 milyon 865 bin ton mandalina, 1 milyon 323 bin ton limon, 1 milyon 322 bin ton portakal, 2 bin 808 ton turunç, 198 bin ton greyfurt üretimi gerçekleşmiştir. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü'nün 2023 verilerine göre, toplam turunçgil tüketiminde son 5 yıl içerisinde %27 artış görülmekle birlikte, en fazla artış %111 ile limon, %76 ile greyfurt tüketiminde gerçekleşmiştir. Dünya çapında, toplam turunçgillerin beşte biri işlenmekte ve turunçgil suyunun işlenmesi sırasında her yıl yaklaşık olarak 120 milyon ton kabuk tarımsal endüstriyel atık olarak oluşmaktadır (FAO,2021; Chavan, Singh ve Kaur, 2018; Zema ve diğerleri, 2018; Negro, Mancini, Ruggeri ve Fino, 2016). Turunçgillerin yaklaşık olarak %33'ü meyve suyu üretimi için işlenmektedir. Turunçgillerin %45'i meyve suyundan, %26'sı posadan, %27'si kabuklardan ve %2'si tohumlardan oluşmaktadır (Leporini, Tundis, Sicari ve Loizzo,2021).

Turunçgil atıkları gıda, ilaç, kozmetik, prebiyotik, pektin, uçucu yağ, polifenol, şeker, diyetlifi, organik asit, amino asit ve protein, mineral karetenoid kaynakları olarak kullanılmasının yanında biyogübre, biyogaz, biyoetanol üretiminde de kullanılmaktadır (Venkataraman, Rajendran, Kumar, Rangasamy ve Vaidyanathan, 2024; Huang ve diğerleri, 2020; Mahato ve diğerleri, 2018; Mahato ve diğerleri, 2019; Suri ve diğerleri. 2022). Turunçgil kabukları, özellikle fenolik asitler ve flavonoidler bakımından zengindir (Sawalha, Arráez-Román, Segura-Carretero ve Fernández-Gutiérrez, 2009) ve bu bileşiklerin önemli miktarda antioksidan, antienflamatuar, antiproliferatif, antialerjik, antiviral, antikarsinojenik, nöroprotektif ve antibakteriyel, antifungal, antineoplastik, antimalaryal, antimitojenik, yaşlanma karşıtı özellikler gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Chaudhary ve Singh, 2024; Ibrahim ve diğerleri, 2024; Manakas, Balafoutis, Kottaridi ve Vlysidis, 2024; Sharma ve diğerleri, 2022; Khalil, Farghal ve Farag, 2022; Liu ve diğerleri, 2021; Panwar, Panesar ve Chopra, 2021; Zarate-Vilet, Gu'e, Servent, Delalonde ve Wisniewski, 2020; Oboh ve Ademosun, 2012; Putnik ve diğerleri, 2017; Kovačević ve diğerleri, 2016; Forbes ve diğerleri, 2014). Turunçgil atıklarında bulunan başlıca fenolik bileşikler ferulik, gallik ve *p-kumarik asit*, flavonoidler ise hesperidin, narirutin ve naringindir (Sharma, Mahato, Cho ve Lee, 2017). Tablo 2.1' de turunçgil fenolik bileşiklerinin fonksiyonel özellikleri ve ana uygulama alanları görülmektedir.

Tablo 2.1. Turunçgil fenolik bileşiklerinin fonksiyonel özellikleri ve ana uygulama alanları (M'hiri, Ioannou, Ghoul ve Mihoubi Boudhrioua 2017)

Bileşikler	Sınıf	Özellikler	Uygulama alanları	Kaynaklar
Hesperidin	Flavanon	• Antiviral aktivite • <i>Salmonella typhi</i> ve <i>S.typhimurium</i>'a karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite • Histamin salınımının inhibisyonu yoluyla antialerjik aktivite. • Glikoz metabolizmasının düzenlenmesi yoluyla hipoglisemik ajan • Anti-obezite aktivite	Farmasötik uygulamalar	Kawaguchi ve diğerleri, 2004 Scalbert, Manach, Morand, Rémésy ve Jiménez, 2005 Shirsatha, Sonawane ve Gogate, 2012 Choi ve diğerleri, 2011
Eriositrin	Flavanon	• Multi-vitaminik kompleks • İşleme ve depolama sırasında yüksek stabilite	Farmasötik uygulamalar	Del Río ve diğerleri, 2004

Tablo 2.1. Turunçgil fenolik bileşiklerinin fonksiyonel özellikleri ve ana uygulama alanları
(Devamı)

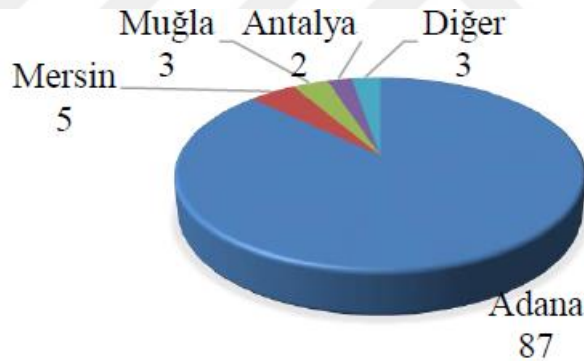
Naringin	Flavanon	• Plazmadaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi • Ateroskleroz riskinin azaltılması • Plazma E vitamini seviyesinin korunması • Etanol metabolizmasının geliştirilmesi • Anti-apoptotik ajan	Gıda endüstrisi ve farmasötik hazırlık	Giannuzzo, Boggetti, Nazareno ve Mishima, 2003 Nogata ve diğerleri, 2006 Zhang JiuXu, 2007
Neohesperidin	Flavanon	• Dihidrokalçonların sentezi (tatlılık)	Gıda endüstrisi	Frydman ve diğerleri, 2005
Nobiletin, tangeretin, sinensetin	Polimetoksillenmiş flavon	• Farmakolojik aktiviteler: antiinflamatuar aktivite, yaşamsal enerjinin aktivasyonu	Farmaşötik hazırlık	Huang ve Ho, 2010
Diosmin	Glikozile flavon	• Bazı ilaçların aktivasyon bileşeni (dolaşım sistemi hastalıkları). • Kas tonusunun ve enflamatuar süreçlere karşı vasküler direncin iyileştirilmesi	Farmaşötik uygulamalar	Del Río ve diğerleri, 2004
Antosiyaninler	Flavonoid	• Organoleptik özellikler: renklendirme	Gıda endüstrisi (şekerleme, tatlılar)	Macheix, Fleuriet ve Sarni-Manchado, 2006

Turunçgil flavanonlarının çeşitli hastalıkların tedavisinde, çeşitli deney hayvanları kullanılarak farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapıldığı araştırmada, flavanonların kanser, diyabet, iltihaplanma, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi farklı rahatsızlıkların önlenmesinde terapötik ajanlar oldukları belirlenmiştir (Pandey, Gurung ve Sohng, 2015).

Turunçgil kabukları karotenoidler, uçucu yağlar, vitaminler, polifenoller vb. gibi önemli biyoaktif bileşikler içermesine rağmen, tam olarak kullanılmamakta ve atık olarak atılmaktadır. Ancak bu atıkların ekonomik ve etkili bir şekilde katma değeri daha yüksek bir ürüne dönüştürülerek uygun bir endüstri dalında kullanılabilmesi için, araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Greyfurt Atığının Değerlendirilmesi

Türkiye’de 2022/23 yılı için illere göre greyfurt üretimine bakıldığında %87 üretim payı ile Adana’nın greyfurt üretiminde ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Adana’yı Mersin (%5) ve Muğla (%3) illeri izlemektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Greyfurt üretiminde önemli iller (2022, %) (TÜİK, 2023)

Turunçgil ailesinden olan greyfurt, birçok besin maddesinin önemli kaynaklarından ve sağlıklı bir diyet katkısında bulunabilen fitokimyasallar içermektedir. İyi bir C vitamini, diyet lifi, pektin, A vitamini, potasyum, folat, B5 vitamini, glukonik asit ve karotenoid kaynağı

olmakla birlikte (Mallick ve Khan 2016; Yu ve diğeri, 2005) greyfurtta tanımlanan diğeri kimyasal bileşenler, limonoid aglikonlar, glukozitler ve furanokumarinler (bergamottin, 67-dihidroksibergamottin) olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.2. *Citrus paradisi* kompozisyonu (Edet ve diğeri, 2016)

Parametreler	Kompozisyon (%)
Ham	10,71
Yağ	6,64
Kül	3,97
Ham Lif	7,55
Karbonhidrat	71,86
Nem	11,86

Nutrasotik yararları yıllardır bilinen ve son dönemlerde bilimsel çalışmalarda da desteklenen greyfurt kabuğu, içediği fenolik bileşiklerle ilişkilendirilmiştir. Greyfurt kabuğunda bulunan fenolik bileşikler, terpenler, seskiterpenler, hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, esterler, flavanoidler gibi çok sayıda bileşikten oluşmaktadır (Cristóbal-Luna ve diğeri, 2018). Flavanonlar (naringin ve hesperidin) ve limonoidlerin (limonin)'lerin greyfurtun acı tadından sorumlu olduğu belirtilmiştir (Ribeiro ve Ribeiro, 2008). Bu biyoaktif bileşiklerin miktarı ve çeşitliliği; coğrafi konuma, hasat zamanına ve işleme yöntemine göre değişmektedir (De Castro, Mertens-Talcott, Rubner, Butterweck ve Derendorf, 2006).

Greyfurt, antioksidan, antikarsinojenik ve anti-hipertansif, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir dizi temel bileşenin varlığı nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Huang ve diğeri, 2020; Nishad ve diğeri, 2018; Al-Âni ve diğeri, 2011). Greyfurtun yapısında bulunan naringinin insülin direnci ve diyabet üzerindeki etkilerinin olduğu birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda bildirilmiştir (Maity, Mukhopadhyay, Kundu ve Chakraborti, 2017; Adeneye ve diğeri, 2008).

Greyfurtun büyük ölçekli tüketimi ve işlenmesi, genellikle tarımsal-endüstriyel atık olarak atılan büyük miktarda greyfurt kabuğunun oluşmasına neden olmakta ve tüm meyvenin %25-35'ini oluşturmaktadır (Mahato ve diğerleri, 2019). Meyve suyu üretiminde atık olarak değerlendirilen kabuklar, pektin, hayvan yemi, yağ ekstraksiyonu olarak değerlendirilmektedir (Fakhari, Salehi, Heydari, Ebrahimi ve Haddad, 2005). Yapılan bir çalışmada, greyfurt kabuğundan elde edilen pektinin, jel oluşturma kalitesinin gıda endüstrisinde stabilizör olarak kullanılan ticari pektinle benzer olduğu belirtilmiştir (Mohamed, 2016), ayrıca greyfurt kabuğunun etlerde antioksidan görevi görerek gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Nishad ve diğerleri, 2018). Başka bir greyfurt atığı olan greyfurt çekirdeğinin *S. aureus*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Polat, Eyılmaz, Akalın ve Coşkun, 2018). Bir başka çalışmada, greyfurt kabuğu ekstraktının toplam fenolik ve flavonoid içeriği sırasıyla 117.3 µg gallik asit/mg ve 39.30 µg kuersetin/mg olarak saptanmıştır, Hazar beyaz balığının 60 gün boyunca greyfurt kabuğu ekstraktıyla beslendiği ve kontrol grubuna göre büyüme performansını önemli ölçüde iyileştirdiği belirtilmiştir (Samavat, Shamsaie Mehran, Jamili, Soltani, ve Hosseini Shekarabi, 2019). Farklı citrus meyvelerinin biyokimyasal özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada, greyfurt meyvesi ve kabuğu ayrı ayrı incelenmiş, sırasıyla diyet lifi (7,41-13,9 g/100g), toplam fenolik bileşik (135-155 mg/100g), ferulik asit (27,1-32,3 mg/100g), sinapik asit (27,3-31,9 mg/100g), p-kumarik asit (10,8-13,1 mg/100g), kafeik asit (5,0-5,6 mg/100g), askorbik asit (35,1-43,8 mg/100g) miktarları açısından önemli potansiyele sahip olduğu saptanmıştır (Gorinstein ve diğerleri, 2001). Greyfurt kabukları, suda çözünen ve çözünmeyen çeşitli monomerler ve polimerler içermesi ve bu polimerlerin, karboksil ve hidroksil fonksiyonel grupları açısından zengin olması sebebiyle sulu çözeltilerden ağır metallerin veya boyaların çıkarılması için uygun bir adsorban malzeme olduğu belirtilmiştir (Liu, Wan, Liu, Fu ve Zou, 2018). Yapılan bir çalışmada, greyfurt kabuğundan türetilen yeni biyokömür/pektin/aljinat hidrojel boncukları (BPA) sentezlenerek atık sularından ağır metal, Cu (II) adsorpsiyonu sağlamak amacıyla

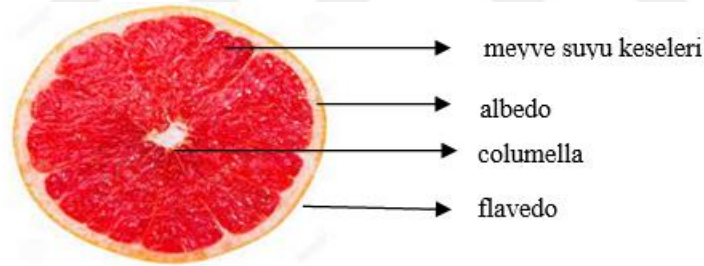
adsorbent olarak kullanılmıştır (Zhang ve diğerleri, 2020). Günümüzde gıda, eczacılık, kimya, petrol, otomobil, atık gaz ve suların temizlenmesinde adsorban olarak kullanılan aktif karbonun düşük maliyetli greyfurt kabuğundan üretildiği ve atık sulardaki fenolik bileşiklerin (pirokatekol, 4-klorofenol ve 2,4-diklorofenol) tutunmasında adsorban olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018).

Tablo 2.3. Farklı türdeki greyfurt kabuğu ekstraktları için flavanon glikozitler, flavanonlar ve polimetoksillenmiş flavonlar içeriği (mg/g kuru ağırlık) (Castro-Vazquez ve diğerleri 2016)

	Kurutulmuş beyaz greyfurt (45°C)	Kurutulmuş beyaz greyfurt (60°C)	Kurutulmuş pembe greyfurt (45°C)	Kurutulmuş pembe greyfurt (60°C)
İsonaringin	4,57	4,02	3,72	3,55
Naringin	59,41	51,16	45,92	43,50
Hesperidin	0,51	0,37	0,21	0,13
Neohesperidin	0,79	0,67	0,30	0,27
Naringenin	5,05	4,54	2,87	2,49
Hesperetin	0,54	0,43	0,42	0,39
İzozinsetin	0,56	0,45	0,41	0,43
Sinensetin	1,82	1,78	0,63	0,63
Nobiletin	1,22	1,35	0,63	0,58
Tangeretin	2,05	1,98	0,97	0,97

Farklı turuncgil kabuklarının antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, DPPH radikali üzerindeki radikal süpürme potansiyeli, en yüksek inhibisyon yüzdesinin greyfurtta (%87,5) olduğu belirtilmiştir (Denkova-Kostova ve diğerleri, 2020). Greyfurt kabuğu ekstraktının antibakteriyel ve antioksidan özellikleri birçok *in vitro* çalışmada bildirilmiştir (Ademosun ve diğerleri, 2015; Castro-Vazquez ve diğerleri, 2016; Negi ve Jayaprakasha, 2001).

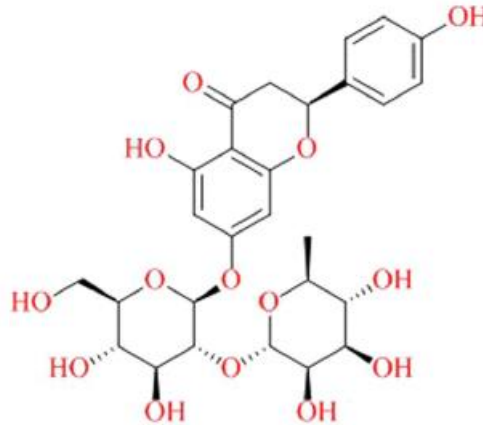
Diğer turunçgil türleri gibi greyfurt da yüksek flavonoid içeriğine sahiptir. Yapılan çok sayıda çalışma, farklı çeşitlerde, coğrafi bölge, olgunluk aşamalarında greyfurt flavonoidlerinin bileşimini detaylandırmıştır. Greyfurtta bulunan flavonoidleri, flavanon, flavon, flavonol ve polimetoksillenmiş flavonlar olmak üzere dört farklı gruba ayırmak mümkündür. Toplam flavonoidlerin %98'ini flavanonlar oluşturmaktadır ve rutinosit veya neohesperidosit gibi -O-glikozidler olarak bulunmaktadır (Khalil ve diğerleri, 2022). Neohesperidositli glikozidler genellikle rutinositlerden daha acıdır; bunlar arasında naringin ilk sırada yer almaktadır ve bunu narirutin, poncirin takip etmektedir (Ross ve diğerleri, 2000; Zhang, 2007). Greyfurtun yapısında albedo kısmı flavonoidler açısından en zengin kısım olarak bulunmuş, bunu flavedo, posa ve tohumlar izlemiştir (Şekil 2.2) (De Castro ve diğerleri, 2006; Maurer, Burdick, ve Waibel, 1950). Flavonoller meyve suyu ve posada tespit edilirken, polimetoksillenmiş flavonoidlerin sadece greyfurtun albedo ve flavedo kısımlarında tespit bulunduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, furanokumarin monomerlerinin kabukta daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Lee ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.2. *Citrus paradisi*'nin enine kesitinde görülen yapılar

2.3. Naringinin Önemi

Naringin ilk olarak 1857 yılında DeVry tarafından keşfedilmiştir (Hoffmann, 1879) ve kimyasal yapısı ilk olarak 1928 yılında Asahina ve Inubuse tarafından karakterize edilmiştir. (Asahina ve Inubuse, 1928). Naringinin, greyfurt, limon, domates, kekik, biberiye gibi diğer pek çok bitkide bulunmasıyla birlikte, greyfurtta (16,28–62,8 mg/100 g) baskın olduğu bilinmektedir (Haytowitz, Wu ve Bhagwat, 2018). Farklı Pomelo türlerinde naringin miktarlarının bakıldığı çalışmada ise, albedo, flavedo, çekirdek ve suyunda sırasıyla, 10065,06-28508,01 ppm, 2483,96-8964,24 ppm, 257,87-426,66 ppm ve suyunda 242,63-386,45 ppm olarak bulunmuştur (Pichaiyongvongdee ve Haruenkit, 2009). Lime’da ise kabukta, meyve suyunda ve çekirdekte bulunan naringin miktarı sırasıyla 517,2 g/mL, 98 g/mL ve 29,2 g/mL, ekşi portakaldaki naringin içeriği 47,1 g/mL olduğu rapor edilmiştir (Sir Elkhathim, Elagib ve Hassan, 2018; Hassan ve diğerleri, 2021). Greyfurt ve ilgili turuncgil türlerinden elde edilen, bir biyoflavonoid türü olan ve kimyasal olarak naringenin-7-O-neohesperidosid olarak bilinen naringin bileşiği, greyfurtun hem suyunda hem de kabuğunda bulunan başlıca flavanon glikozitidir. Kimyasal formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$ ’tür ve naringinin kimyasal yapısı bir flavonoid omurga, iki fenolik halka ve bir heterosiklik piran halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.3).

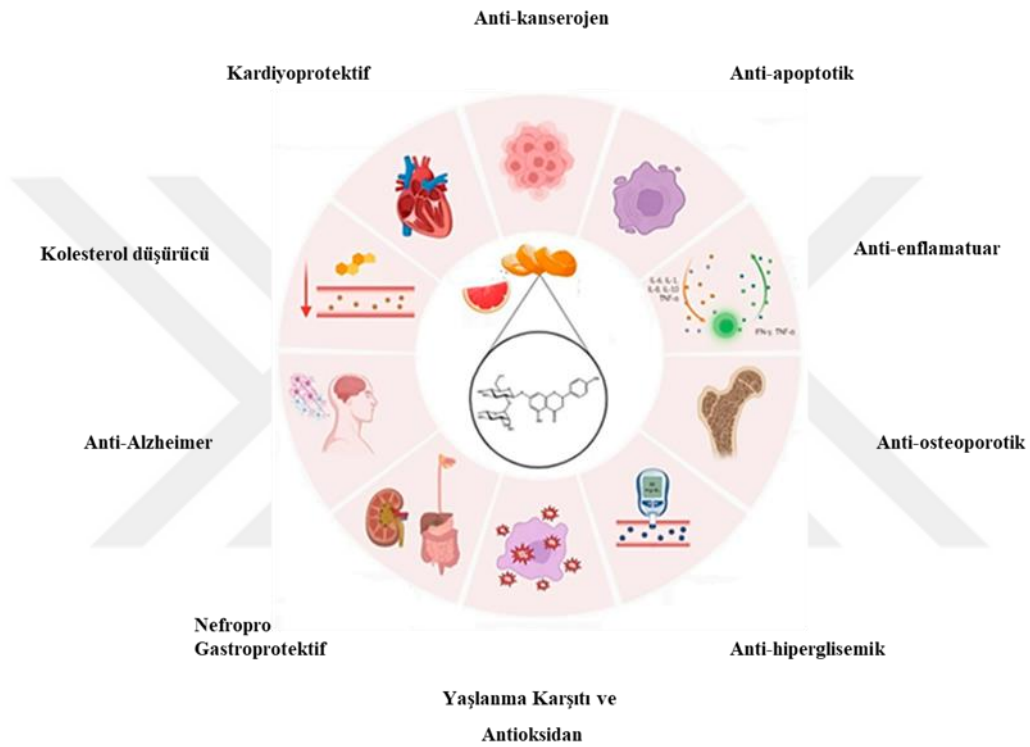


Şekil 2.3. Naringinin yapısı (Pande ve diğerleri, 2024)

Naringin, gıda endüstrisinde yiyecek ve içecek üretimi sırasında doğal pigment, lezzet arttırıcı, yağ stabilizatörü ve acılık verici ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca dihidrokalkon ve neohesperidin dihidrokalkon gibi yüksek yoğunluklu, toksik olmayan ve düşük enerjili yeni tatlandırıcıların sentezi için kullanılan bir hammaddedir (Wu, Calvarano ve Giacomo, 1991). İlaç endüstrisinde naringin, kardiyovasküler hastalıkları önleyici ve iltihap önleyici ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Birçok çalışma, naringinin spazmları ve ağrıyı hafifletme, kılcal geçirgenliği azaltma, osteoartiküler hastalıkların görülme sıklığını azaltma ve insan vücudunda ilacın emilimini ve metabolizmasını artırma, antikanser, lipid düşürücü, antiülser, antihipertansif, antidiyabetik, antiapoptotik, antimitojenik, antiaterojenik, antiastimatik ve antioksidan etkileri gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Gupta, Adin, Aqil, Mujeeb ve Akhtar, 2023; Stabrauskiene, Kopustinskiene, Lazauskas ve Bernatoniene, 2022; Bai ve diğerleri, 2020; Rauf ve diğerleri, 2022; Chavda ve diğerleri, 2022; Rajadurai ve Prince 2009; Jeon, Park ve Choi, 2004; Choe, Kim, Jeong, Bok ve Park, 2001; Jagetia ve Reddy 2005; Bacanlı ve diğerleri, 2015; Alam ve diğerleri, 2014) (Şekil 2.4). Ayrıca, naringinin serbest radikalleri temizleme yeteneği gösterdiği ve iyi bir metal şelatlama ajanı olduğu belirtilmiştir (Jagetia ve Reddy 2011). Antioksidanlar, ROS (reaktif oksijen türleri)'a karşı savunma görevini üstlenmiştir. Oksidasyon sürecini engellemek için propil gallat (PG), butillenmiş hidroksil toluen (BHT) ve butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi çok sayıda sentetik antioksidan kullanılmaktadır fakat sentetik antioksidanların kullanımı, sağlık yönünden tehlike yaratma ihtimali son yıllarda üzerinde durulan bir konu haline gelmiş ve araştırmacıları doğal antioksidan üretimine teşvik etmektedir. Naringin son zamanlarda bir antioksidan besin takviyesi olarak dikkat çekmekle birlikte çalışmalar ayrıca naringinin hem in vitro hem de in vivo ortamda anti-inflamatuar etkisi olduğunu göstermiştir (Ribeiro, Barateiro, Vila-Real, Fernande ve Brites, 2009; Alam ve diğerleri, 2014). Naringinin anti-inflamatuar etkisinin incelendiği çalışmada, farelerin plevral boşluğuna Karagenan (Cg) enjeksiyonunun neden olduğu inflamatuvarın naringin ile önemli ölçüde azaltıldığı belirtilmiştir (Ahmad ve diğerleri, 2015). Benzer şekilde farelerdeki ülser hastalığı için potansiyel bir doğal ajan

olabileceği belirtilmiştir (Cao ve diğerleri, 2018). Başka bir çalışmada ise Pomelo kabuğu flavonoid ekstraktında baskın bileşik olarak bulunan naringinin (%91,62), inhibisyon mekanizmasının, QS (quorum sensing) sinyallerini taklit etme ve bakteriyel QS sistemini bozma kabiliyetinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir (Liu, Pan, Li, Jie ve Zeng 2017). Naringinin diğer patojenlere karşı anti-biyofilm aktivitesinin QS genlerinin düzenlenmesiyle ilişkili olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (Rasamiravaka ve diğerleri, 2015). Naringinin, *P. aeruginosa* biyofilmine karşı antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği çalışmada, naringinin antimikrobiyal özellik gösterdiği fakat antibiyotiklerle oluşturduğu kombinasyonla (naringin & siproflaksin, naringin & tetrasiklin) daha etkin antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir (Dey, Parai, Banerjee, Hossain ve Mukherjee, 2020). Siproflaksin ve naringinle birlikte yüklenen bir polielektrolit kompleksinin antioksidan enzim seviyelerini artırarak oksidatif stres ortamını azalttığı, malonaldehit seviyelerini düşürdüğü ve siproflaksinin antibakteriyel özelliklerini artırdığı bulunmuştur (Mohamed, Mahmoud, Embaby, Haroun, ve Sabra, 2024). Naringinin antifungal etki mekanizmasının incelendiği çalışmada, patojenik ve insanlarda mantar enfeksiyonlarına (kandidiyaz) sık neden olan *C. albicans* seçilmiş ve naringin tarafından üretilen O₂'nin ve OH'ın *C. albicans* mitokondrisine zarar vererek apoptoza (hücre ölümü) neden olduğu belirtilmiştir (Kim ve Lee, 2021). COVID-19 viral proteinlerine karşı yapılan çalışmada, naringinin viral proteinlerin aktif bölgelerine bağlanarak inhibitör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Manokaran, Keerthi, Kallapur ve Soujanya, 2021). Ahmed, Khan, Aschner, Hasan ve Hassan (2019), naringinin nörolojik rahatsızlıklara yönelik tedavi etkisi olduğuna dair birçok çalışma olduğunu belirtmişler ve naringinin algısal bozukluğu iyileştirdiğine dair çalışmaları rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, naringinin, *Pseudomonas* izolatlarının biyofilm oluşumunu %57'ye kadar azaltabileceği, biyofilm oluşumunu başarılı bir şekilde engelleyebileceği, ayrıca önceden oluşmuş biyofilmi kaldırabileceği ve biyofilmle ilişkili proteinlere karşı güçlü bir bağlanma afinitesi gösterebileceği rapor edilmiştir (Husain ve diğerleri, 2021).

Tansiyon ilacı olan Candesartan Cilexetil'in (CAN) P-glikoprotein (P-gp) inhibitör özellikleri ile bilinen naringin ile birlikte uygulanarak farmakokinetik davranışının araştırıldığı çalışmada, naringin, P-gp'nin substratları olan ilaçların emilimini ve biyoyararlanımını potansiyel olarak artırabilen etkili bir P-gp inhibitörü olarak tanımlanmış ve naringin içeren dondurularak kurutulmuş katı dispersiyonların saf CAN süspansiyonuna kıyasla biyoyararlanımda 3,7 kat artış gösterdiği belirtilmiştir (Gurunath, Nanjwade, ve Patil, 2015).



Şekil 2.4. Naringinin farklı biyolojik sistemler üzerindeki sağlık etkileri (Ravetti ve diğerleri, 2023)

Naringin, antiinflatuar, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri gibi farmakolojik özellikleriyle yaygın olarak bilinen bir flavonoid olmasının yanı sıra Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, epilepsi, felç, Alzheimer hastalığı, anksiyete, hafıza bozuklukları ve bilişsel işlev bozuklukları gibi nörolojik patolojiler üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle çeşitli

in vitro ve *in vivo* modellerde mevcuttur (Kim, 2017; Kola, Akula, NissankaraRao ve Danduga, 2017; Kulasekaran ve Ganapasam 2015; Hale, Shekhar ve Lowry, 2012; Borodovitsyna, Flamini ve Chandler 2017). Sıçanlarda naringinin diyabetik etkisinin incelendiği çalışmada, hipoglisemiye yol açmadığı diyabetik komplikasyonları ve oksidatif stresi iyileştirdiği belirtilmiştir (Murunga ve diğerleri 2016). Farklı düzeylerde E vitamini ile yüksek kolesterolle beslenen sıçanlarda naringin takviyesinin plazma kolesterol konsantrasyonunu düşürmede faydalı olduğu belirtilmiştir (Choi ve diğerleri, 2001).

Yapılan birtakım *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, naringinin kemik hastalıklarında terapötik ajan olarak kullanılabileceği ve ayrıca naringinin, hareket kabiliyeti kısıtlı olan hastalarda veya astronotlarda mekanik yüklenmenin neden olduğu kemik erimesine en yüksek tedavi potansiyelini sergilediği rapor edilmiştir (Rivoira, Rodríguez, Picotto, Battaglino ve de Talamoni, 2018; Lavrador, Gaspar Mano, 2018; Lin ve diğerleri, 2016; Gan, Deng, Le, Lai ve Liao, 2023).

Kemoterapötik ajanların uygulaması sırasında kullanılan ilaçların önemi kadar, bu ilaçlara olumlu ya da olumsuz etki yapan maddeleri bilmek de tedavinin önemli bir kısmıdır. Bu ilaçların sitotoksik etkilerini en az düzeye indirmek amacıyla bitkisel kökenli bileşiklerin kullanıldığı çalışmaların sayısı giderek artmakta ve bu amaçla kullanılan bileşiklerden birisi de naringin bileşiği olmuştur (Bacanlı ve diğerleri, 2015). Naringin, ilaç-ilac etkileşimine neden olabilecek bazı ilaç metabolize sitokrom P450 enzimlerini inhibe etmektedir (Ueng ve diğerleri 1999). Farklı dozlarda uygulanan naringinin karaciğer hasarını azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir (Bülbül ve diğerleri, 2018). Naringinin anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, farklı dozlarda (25, 50 ve 100 mg/kg) uygulanması böbrek fonksiyonlarındaki bozulmaya karşı koruma sağlamış, antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüşü ortadan kaldırmıştır (Chtourou, Aouey, Aroui, Kebieche ve Fetoui, 2016). Tablo 2.4'de çeşitli hastalıklara naringinin terapötik etkisi açıklanmaktadır.

Tablo 2.4. Naringinin tedavi edici etkileri (Shilpa ve diğerleri, 2023)

Hastalık	Naringinin tedavi edici etkileri	Referans
Diyabet	Geliştirilmiş insülin duyarlılığı, arttırılmış glukoz alımı, β -glukozidaz enziminin inhibisyonu, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikler	Ahmed ve diğerleri, 2012
Kardiyovasküler Hastalıklar	Kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, LDL oksidasyonunun önlenmesi, anti-enflamatuar etkiler, endotel fonksiyonunun iyileştirilmesi	Yadav ve diğerleri, 2020
Kanser	Antikanser özellikleri, tümör büyümesinin inhibisyonu, apoptozun indüklenmesi, antioksidan ve antiinflamatuar etkiler	Higashi, 2023
Nörodejeneratif Hastalıklar	Nöroprotektif etkiler, oksidatif stres ve enflamasyonun azaltılması, potansiyel bilişsel fonksiyonun iyileştirilmesi	Kopustinskiene ve diğerleri, 2020
Karaciğer Hastalıkları	Karaciğer hasarına karşı koruma, karaciğer fibrozisinin azaltılması, antioksidan etkiler, karaciğer enzim seviyelerinin iyileştirilmesi.	Franzoni ve diğerleri, 2021
Obezite	Adipogenezin baskılanması, vücut ağırlığı artışının azaltılması, metabolik parametrelerin iyileştirilmesi	Jakab ve diğerleri, 2021
Psikolojik Rahatsızlıklar	Antioksidan savunma sisteminin yükseltilmesi, kolinerjik iletim ve lipid peroksidasyon inhibisyonu	Ben-Azu ve diğerleri, 2019

Naringinin gıda paketlenmesinde film olarak kullanıldığı çalışmada, saf kitosan filmlerine kıyasla UV bölgesinde artan bir absorbans göstererek gıda maddelerinde UV ışığının neden olduğu lipid oksidasyonunu azaltma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Iturriaga, Olabarrieta, Castellan, Gardrat ve Coma, 2014). Gan ve diğerleri, (2023) naringinin, çeşitli sinyal yollarına aracılık etme kabiliyeti nedeniyle kemik ve kıkırdak bozuklukları için bir ilaç olarak faydalı olabileceğini belirlemişlerdir.

2.4. Naringinin Ekstraksiyonu, İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yapılan çalışmalarda, atık olarak değerlendirilen kabuk kısmının meyvelerin yenilen kısımlarından daha fazla miktarlarda biyoaktif bileşikler içermesi sebebiyle (Belitz ve Grosch 1999), fenolik bileşikler, karotenoidler, uçucu yağlar (Casquete ve diğerleri, 2015), katkı maddeleri ve renklendiriciler (Sharma ve diğerleri, 2017) gibi biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon ve izolasyon işlemlerinde greyfurt kabuklarının kullanılmasının önemi bildirilmiştir. Lu, Zhang, Bucheli, ve Wei, 2006 tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli narenciye meyvelerinin flavonoid profili incelenmiş ve *Citrus paradisi* kabuğunun en iyi naringin kaynağı (%3,25) olduğu bulunmuştur.

Naringin meyvelerinden fenolik bileşiklerin elde edilmesi ekstraksiyon, ayırma ve saflaştırma olmak üzere üç ana adımdan oluşmaktadır (Zhao, Kim, Son, Son, Min ve Woo, 2015). Narenciye meyvelerinde yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yönteminin geleneksel solvent ekstraksiyonu olduğu belirtilmiştir (Sharma, Mahato, ve Lee, 2019). Geleneksel olmayan teknikler arasında yüksek hidrostatik basınç, ultrason destekli, mikrodalga destekli, subkritik ve süperkritik ekstraksiyon bulunmaktadır (Grassino ve diğerleri, 2020; Victor ve diğerleri, 2018; Chávez-González ve diğerleri 2020; Cigeroğlu ve diğerleri 2021; Cheigh ve diğerleri, 2012). Naringin, bitkinin meyve, çekirdek vb. gibi kısımlarından ekstrakte edilebilmekle birlikte özellikle greyfurtun albedo kısmında baskın olması sebebiyle greyfurttan elde edilmektedir. Naringin soxhlet, maserasyon, su infüzyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, ultrason ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, oto-hidroliz ve katı mikro-faz ekstraksiyonu gibi teknikler kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Saflaştırılan veya ekstrakte edilen örnekler kromatografi teknikleri kullanılarak kantifikasyon ve kalitifikasyonu yapılmaktadır (Shilpa ve diğerleri, 2023).

Flavonoidlerin geri kazanımında önemli ölçüde daha yüksek verim elde edilmesi nedeniyle, etanol ve metanol flavonoid ekstraksiyonu için en yaygın olarak kullanılan çözücülerdir. Naringin ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan iki geleneksel yöntem karıştırmalı maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonudur. Geleneksel yöntemler kolay ve ucuz olmalarına rağmen önemli dezavantajlara sahiptir. Yaygın olarak kullanılan organik çözücüler yanıcı, toksik ve çevre için zararlı olma eğilimindedir. Bu nedenle, tehlikeli maddelerin veya kirleticilerin kullanılmasını önleyen daha yeni yöntemler geliştirilmektedir. Son zamanlarda, derin ötektik çözücüler (DES'ler) çevre dostu özellikleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. DES'ler, kolin-klorür gibi hidrojen bağı alıcıları ile organik iyonlar, amino asitler, karboksilik asitler gibi hidrojen bağı vericilerinin karışımlarıdır. DES'in naringin gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin ekstraksiyonunda da başarılı olduğu belirtilmiştir. El Kantar ve diğerleri, (2019) yaptıkları çalışmada DES'in naringin veriminin su ile kıyaslandığında yaklaşık üç kat artış olduğunu belirtmişlerdir. Brønsted asidik iyonik sıvıların mikrodalga destekli ekstraksiyon ile birleştirildiği çalışmada, kullanılan çözücü ($[\text{HO}_3\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{mim}]\text{HSO}_4$), referans çözücü olarak kullanılan hidroklorik asit çözeltisi (4.83 mg/g), su (4.99 mg/g) ve sodyum-sülfattan (4.32 mg/g) daha yüksek ekstraksiyon verimliliği (8.38 mg/g naringin) göstermiştir (Liu ve diğerleri, 2017).

Solvent ekstraksiyonu, sıvı bir matristen ekstraksiyon gerektiren durumlarda kullanılmaktadır. Solvent ekstraksiyonunun kullanıldığı çalışmada, greylift kabuklarına dimetilformamid ve amonyum oksalat çözücü karışımıyla birlikte filtrasyonla sıkıştırılması sonucu oluşan çözünmüş veya dağılmış maddelerin sıvı bir karışımı olan greylift pres liköründen naringin ekstrakte edilmiştir (Zarate-Vilet, Wisniewski, Gué ve Delalonde, 2020).

Geleneksel olmayan yöntemler arasında en yaygın kullanılanlardan biri ultrason destekli ekstraksiyondur (Ana ve diğerleri 2018; Nishad, Saha ve Kaur, 2019). Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olma potansiyeline sahip, gelişmekte olan bir teknolojidir. Daha düşük ekstraksiyon süresi, daha düşük enerji girdisi, daha düşük sıcaklık gereksinimleri, daha az

solvent tüketimi, ekstraksiyon oranlarında genel bir artış, kalitede genel iyileştirmeler dahil olmak üzere geleneksel yöntemlere göre çeşitli avantajlara sahip olmakla birlikte çok daha basit olduğu belirtilmektedir. Geleneksel çözücülere kıyasla ultrasound destekli ekstraksiyonun (UDE) sulu iki fazlı sistemle birlikte kullanılmasının naringin veriminde önemli iyileşme göstererek naringini saflaştırabildiği rapor edilmiştir. Sulu iki fazlı sistemlerin ekstraksiyon için kullanımına olan ilgi, yöntemin biyoyumlu, çevre dostu ve küçük moleküllere karşı seçici olması nedeniyle son yıllarda artmaktadır (Yan, Zhou, Wu, Feng, Han, Chen ve Li, 2021).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), naringin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Pomelo meyvesinden UDE ve MDE 'nin birlikte kullanılarak ekstraksiyonun yapıldığı çalışmada UDE ve MDE'nin ayrı ayrı ekstraksiyonuna kıyasla yaklaşık 2 katı daha yüksek verimlilikte (%68,2) olduğu belirtilmiştir (Wang ve diğerleri, 2019).

Süperkritik CO₂, diğer sıvılarınkinden 10-100 kat daha yüksek çözünürlük ve difüzivite sağlayan yüksek yoğunluğa sahip olması sebebiyle kütle transferini iyileştirerek ekstraksiyon sürelerini azaltmaktadır. Ekstraksiyonun seçiciliği, sıcaklık, basınç ayarlanarak etkilenebilir ve sıvının yoğunluğu ve diğer özellikleri farklı bileşenlerin çözünürlüğüne uyum sağlamak için değiştirilebilmektedir (Moret, Purcaro, Conte, Moret ve Conte, 2014). Süperkritik CO₂ ile ekstraksiyon, çevreyi kirleten çözücüler veya reaktiflerin aksine CO₂ kullanımının arıtma işlemi gerektirmemesi, ekstraktlarda bulunan biyoaktif bileşiklerin varlığına zarar vermemesi sebebiyle tercih sebebidir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SCE) yüksek kurulum maliyetlerine sahiptir fakat basınç, sıcaklık, numunenin partikül boyutu ve CO₂'nin yüzeysel hızının optimizasyonu yoluyla proses maliyetlerini en aza indirmek mümkündür (Pereira ve Meireles 2007). Ioannou, M'hiri, Chaaban, Boudhrioua ve Ghoul (2018), naringin verimi açısından birkaç farklı ekstraksiyon yöntemini karşılaştırarak optimize etmişler, SCE sırasında sıcaklığın basınçtan daha önemli bir rol oynadığını gözlemlemişler ve verim olarak değerlendirildiğinde, ekstraksiyon süresine bağlı olarak 30 dakika ile sınırlandırıldığında SCE ekstraksiyonunun, kontrol olarak kullandıkları geleneksel çözücü ekstraksiyonundan daha etkili olduğunu bulmuşlardır. *Citrus* kabuklarından süperkritik ekstraksiyonla birlikte yardımcı

Çözgen olarak %20 etanol kullanılan çalışma sonucunda etanolün naringin verimini yaklaşık olarak 3 kat arttırdığı gözlenmiştir (Romano ve diğeri, 2022). Portakal kabuğundan basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemiyle fenolik bileşiklerin geri kazanımını amaçlayan çalışmada, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile analitin çözünürlüğünü arttırabilmek için ekstraksiyon hücresi içinde hiberbarik ortam sağlanmış ve naringinin termal bozunması önlenerek hızlı bir şekilde yüksek verimde sonuçlar alınmıştır (Barrales ve diğeri, 2018).

Son yıllarda, naringin ekstraksiyonunda darbeli elektrik alanlarının uygulanması (PEF) araştırılmaktadır. Ekstraksiyon teknolojisindeki son gelişmeler, PEF ekstraksiyonunun geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu da göstermiştir. Bu teknikteki amaç, meyvenin hücrelerini elektroporasyona maruz bırakarak içlerinde bulunan biyoaktif bileşikleri serbest bırakmak ve bunları ekstraksiyon için kullanılabilir hale getirmektir. Ayrıca, bu yöntemle naringin veriminin büyük ölçüde arttığı belirtilmiştir. Pomelo kabuğu tozu %40 etanol ile karıştırılmış ve farklı elektriksel alan yoğunluğu ve darbe sayısı kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır. Kabuk tozuna PEF uygulanmasının, PEF işlemi uygulanmayan etanolik ekstraksiyona kıyasla ekstraksiyon verimini %20 oranında, antioksidan aktiviteyi ise %70 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemin naringin moleküllerinin radikal süpürme aktivitesi üzerinde çeşitli etkilere sahip olmuş ve onları bozmadan konformasyonlarını değıştirebildiği rapor edilmiştir (Niu, Ren, Li, Zeng ve Li, 2021).

Solventsiz ekstraksiyon yöntemlerine ilişkin araştırmalar da son yıllarda gittikçe önem kazanmaktadır. Guneser ve Yilmaz (2017), limon çekirdeklerinden yağ çıkarmak için soğuk pres yöntemi kullanmış ve bunu ekstraksiyon çözücüsü olarak hekzan kullanan bir referans yöntemle karşılaştırmıştır. Solventsiz yöntemde daha yüksek naringin içeren bir ekstrakt üretilirken, yağ miktarının daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Ekstraktları saflaştırmak veya tanımlamak için sıvı-sıvı ayırma (Aznar, Rodríguez-Pérez ve Rai, 2022), yüksek hızlı ters faz kromatografisi (Liu, Han, ve Ni, 2017; Zhang ve diğerleri, 2012; Li ve diğerleri, 2022), afinite kromatografisi (Wang ve diğerleri 2014) veya çeşitli katı faz ekstraksiyon formları gibi farklı teknikler kullanılmaktadır (Mencherini ve diğerleri 2013). Qu ve diğerleri (2016), naringini acı portakal özütlerinde bulunan diğer bileşiklerden seçici olarak ayırmak için bir immünoafinite kromatografisi yöntemi geliştirerek başarılı bir şekilde ayırabilmiş ve naringinin geometrik izomerlere karşı bile oldukça seçici olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Luo ve diğerleri (2019), naringini diğer benzer bileşenlerden ayırabilen bir kolon oluşturmak için moleküler baskılanmış polimerler kullanmıştır. Çalışma sonucunda etkili bir ayırım sağlanarak, baskılanmamış polimerlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir kapasite faktörüne sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Son zamanlarda yapılan önemli çalışmalar, narenciye ekstraktındaki flavanoidlerin, insan sağlığına olumlu etkilerini göstermekte ve flavanoidlerin saflaştırılmasına dikkat çekmektedir. Naringin tıbbi bitkilerin ve bazı ilgili geleneksel Çin tıbbi ürünlerinin kimyasal değerlendirmesi veya kalite standardizasyonu için bir 'işaret edilen bileşik' olarak seçilmiştir. Naringin, olgunlaşmamış ve olgunlaşmamış pomelo meyvelerinde toplam flavanon glikozitlerin sırasıyla %99,8 ve %96,0'ını oluşturmaktadır (Ortuño ve diğerleri 1995). Kanseri önleme, antimikrobiyal etki ve birçok enzimin aktivitesini inhibe etme, antioksidan, kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürme ve kanın normal kılcak geçirgenliğini koruma gibi oldukça faydalı olmasından dolayı naringinin saflaştırılmasını gündeme getirmiştir.

Yapılan çalışmada, naringin ve neohesperidin bakımından zengin olan Huyou (*Citrus changshanensis*)'nun farklı kısımlarının naringin ve neohesperidin içeriği karşılaştırılmış ve albedo kısmında, naringin ve neohesperidin için sırasıyla 27, 00 ve 19,09 mg/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Huyou'nun albedo kısmından naringin ve neohesperidin etkin eş zamanlı saflaştırılması, makrogözenekli D101 reçine kromatografisi ve ters faz kromatografisi kombinasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış naringin ve neohesperidin hem HPLC hem

de LC-MS ile tanımlanmış ve HepG2 hücrelerinde glikoz tüketimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve Huyou'dan elde edilen naringin ve neohesperidinin, glikoz metabolizmasının düzenlenmesi yoluyla potansiyel hipoglisemik ajanlar olarak hareket edebileceği belirtilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2012). Naringinin pomelo kabuklarından ultrasonik destekli ekstraksiyon ve makrogözenekli reçine saflaştırma teknolojisi kullanılarak ayrıştırıldığı çalışmada, saflaştırma işleminin çeşitli parametreleri optimize edilmiş ve pomelo kabuklarındaki naringin içeriğinin %2,20 ve optimum saflaştırma koşulları altında naringin saflaştırma oranının %77,26 olduğu belirtilmiştir (Tang, Zhu, Zhong ve Zhou, 2011). Farklı ekstraksiyon ve hidroliz yöntemleri kullanarak taze greyfurt meyvelerinin çeşitli kısımlarından (flavedo, albedo ve segmental) naringin veriminin araştırıldığı çalışmada, ekstraktlar ısı geri akış ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve ultrasonik banyo destekli ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmiştir. En yüksek naringin verimi (17,45 mg/g) albedo kısmından ultrason destekli ekstraksiyon kullanılarak elde edilmiş ve termal hidroliz yapılarak 25,05 mg/g olarak saptanmıştır (Stabrauskiene, Marksa, Ivanauskas ve Bernatoniene 2022).

Greyfurtun albedo kısmından naringinin saflaştırıldığı bir başka çalışmada, üç farklı koşul altında (kurutulmuş albedo ile soxlet ekstraksiyonu-kurutulmamış albedo ile soxlet ekstraksiyonu- kurutulmuş albedo ile soğuk ekstraksiyon) gerçekleştirilerek naringin elde etmek amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, sırasıyla naringin verimi 18, 19,75 ve 11 (mg/g) bulunarak en yüksek naringin verimi kurutulmamış albedo ile yapılan soxlet ekstraksiyonunda elde edilmiştir (Sant, Ahmad ve Bhatia, 2022). Naringini saflaştırmak için DM101 makrogözenekli adsorpsiyon reçinesi kullanılan çalışmada, yükleme konsantrasyonu, yükleme akış hızı ve numune pH'ının naringinin adsorpsiyon hızı üzerindeki etkileri ve etanol konsantrasyonunun naringinin desorpsiyon hızı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Makrogözenekli reçineler kullanılarak naringin saflaştırması için optimum koşullar belirlenmiş ve naringin verimini %77,56 olarak bulunmuştur. Ayrıca naringinin lipid düşürücü aktivitesinin *in vitro* tayini de yapılmış, naringinin kan lipid seviyelerini düşürmek için fonksiyonel bir gıda

olarak önemli potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Yu ve diğerleri, 2023). Yapılan başka bir çalışmada, limonoid ve naringin gibi flavonoid glukozitlerin karışımlarının kısmi saflaştırılması için ters fazlı bir flaş kromatografik yöntem geliştirilmiş ve flaş kartuş sisteminin kullanımını araştırılmıştır. Ekstraktta bulunan glukozitlerin hepsi polar yapıda olduğundan, mobil fazın polaritesi, ayırma işleminde karar verici bir faktör olmuştur. Çalışma sonucunda, naringin, narirutin ve diğer limonoid glukozitler gibi flavanon glukozitler ile zenginleştirilmiş glukozit karışımının kısmi saflaştırılması yapılarak %93 saflık düzeyine ulaşılmıştır (Raman, Cho, Brodbelt ve Patil, 2005). Ters faz kromatografisi (High-speed countercurrent chromatography) (HSCCC) kullanılarak saflaştırma yapılan çalışmada, *Citrus grandis* 50 mg ham ekstraktından 28,8 mg naringin %97,1 saflıkta elde edilmiştir. (Liang, Huang, Chen, Zhang ve Ito, 2007).

Citrus grandis Osbeck kabuğundan yüksek verimde naringin elde edilen çalışmada, metanol ekstraksiyonu ve ardından %14-15 (v/v) diklorometan ilavesiyle kristalizasyon sağlanmış ve diklorometan ilavesiz aynı yöntemle kıyasla dört kat daha yüksek verim ve geleneksel doğrudan sıcak su ekstraksiyonuna kıyasla beş kat daha yüksek verim vermiştir. Bu işlem sayesinde, dört pomelo çeşidi olan Khao Taeng-gwa, Khao Yai, Khao Nam Pheung ve Tong Dee'den elde edilen albedo kabuklarında naringin sırasıyla 24, 22, 20 ve 16 mg/g olarak bulunmuştur. Elde edilen naringinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve nükleer manyetik rezonans analizinde saflık %98 olarak belirlenmiştir (Sudto, Pornpakakul ve Wanichwecharungruang, 2009). Hakim, Loka ve Prastiwi (2019) yaptıkları çalışmada, *Citrus maxima*'dan naringin bileşiğini izole etmek için uygun izolasyon yöntemini bulmayı amaçlamışlar ve maserasyon yöntemiyle metanol ekstraksiyonu yapmışlardır. Çalışma sonucu izole edilen bileşiğin fonksiyonel gruplarının naringin fonksiyonel grubuna benzer olduğunu, MS, NMR ve UV-Vis gibi diğer spektrofotometre testleri ile tanımlanması konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.

2.5. Nano-Enkapsülasyon Yöntemleri

Naringinin farmasötik alanda ve gıda endüstrisindeki uygulamaları sudaki çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının düşük olması, geçirgenliğinin zayıf olması ve yapısal kararsızlığı nedeniyle dolayı sınırlı olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, naringinin klinik kullanımı, zayıf çözünürlüğü, gastrointestinal sistemdeki kararsızlığı, oksidasyona duyarlılığı ve kan dolaşımındaki kısa ömrü (2,6 saat) nedeniyle engellendiği, biyoyararlanımının < %8'e düştüğü bildirilmiştir (Ravetti ve diğerleri, 2023). Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre naringin, çözünürlüğü düşük ve düşük etkili ilaçlar olan sınıf IV'e aittir (Bonamici 2009). Son on yılda, polifenollerin stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmak ve/veya tatsız tatlarını maskeleyerek için çeşitli mikro ve nanoenkapsülasyon stratejileri geliştirilmiştir. Bu stratejiler arasında nanosüspansiyonlar, lipozomlar ve modifiye veziküller, nanoemülsiyonlar, elektrospun nanofiberler, nanotüpler, katı dispersiyon, mikroenkapsülasyon ve benzeri yapıların kullanımı yer almaktadır (Deshmukh, Prajapati ve Harwansh, 2023; Emerald, Pushpadass, Joseph ve Jaya, 2020). Oral uygulamadan sonra naringinin emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını değerlendirmek için hayvan modellerinde (sıçanlar, fareler) veya insanlarda farmakokinetik çalışmalar yaparak naringinin biyoyararlanımını iyileştirmek için en etkili formülasyon araştırmaları devam etmektedir (Liu ve diğerleri, 2023); Lu ve diğerleri, 2023). Naringinin serum veya biyolojik sıvılardaki dinamik biyotransformasyonunun uygun yöntemler kullanılarak araştırılması, potansiyel terapötik uygulamalarını ilerletmek ve vücuttaki farmakokinetik durumunu anlamak için büyük önem taşımaktadır (Pande, Patel, Beladiya, Kher ve Dholakia 2024; Cheng, Zhang, Qi, Zhang, ve Zhou, 2023). Önceki çalışmalar, nanoenkapsüle naringinin serbest formundan daha az toksik etki yarattığını göstermiştir ve bu durumu nanoenkapsülasyonun daha yüksek biyoyararlanımı ve etkinliği ile açıklamak mümkündür (Budell ve diğerleri, 2020; Yen, Wu, Lin, Cham, ve Lin, 2009). Nanopartiküller, antibiyotik direnci sorununun çözümüne yardımcı olabilecek seçiciliğe ve gelişmiş biyoyararlanıma sahip olduğu, ek olarak mevcut ilaçların etkinliğini artırarak bakteriyel enfeksiyon tedavisinde dikkate değer potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Singh ve diğerleri

2020). Nanokapsül süspansiyonları yüzey aktif madde ve polimerlerden oluşan karmaşık matrislerdir. Bu nedenle, bu tür sistemlerde ilaç testinin analizi ve yöntemi, uygunluklarını göstermek için büyük bir dikkatle geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır (Fontana, Bastos ve Beck, 2010; Dalcin 2015). Nanokapsüller, mikrokapsüllere kıyasla daha fazla yüzey alanı sağlaması, yüksek enkapsülasyon etkinliği-verimi, çözünebilirliği artırması, biyoyararlılığı ve kontrollü salımı geliştirme açısından potansiyeli yüksektir. Kontrollü salımda genel olarak, gecikmeli ve sürekli olmak üzere iki adet mekanizma bulunmaktadır. Gecikmeli salımda, gastrointestinal sistemde istenilen yer ve zamana kadar salımı geciktirilmekte olup örneğin bu mekanizma, biyoaktif bileşeni mide koşullarda koruyarak bağırsaklarda salımını sağlamaktayken, sürekli salım ise hedef noktada (mide veya bağırsak) biyoaktif bileşenin sabit konsantrasyonda serbest kalması şeklinde tanımlanmaktadır (Fathi, Mozafari ve Mohebbi, 2012).

Ayrıca, lipozomlar, niozomlar, transferozomlar, farmakozomlar ve prosiküler sistemler (prolipozomlar ve proniozomlar) dahil olmak üzere çeşitli veziküler ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmiştir (Dhadwal, Sharma, Pandit, Ashawat ve Kumar, 2020). Veziküler sistemin biyolojik membran yoluyla ilaç dağıtımını açısından biyouyumluluk, toksik olmama, hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları birleştirme yeteneği, ilacı dağıtım hızı ve kapsamı, sürekli ilaç salımı, bir depo görevi görme yeteneği gibi birçok avantajı bulunmaktadır. İlaç dağıtımını iyileştirmeye yönelik bir teknik olarak yüzey aktif madde keselerinin geliştirilmesi, son yıllarda ilaç dağıtım sistemleri alanında çalışan bilim insanlarının ilgisini çekmiştir (Marianecce ve diğerleri, 2012; Shilakari, Singh ve Asthana, 2013).

Naringinin enkapsulasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde, epilepsi ilacı olarak kullanılan pregabalinin (PRG) doğal ilaç naringin (NRG) ile birlikte lipozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, naringinin PRG toksisitesini azaltarak ve farklı bir etki mekanizması yoluyla tedavi etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir (Mangla ve Kohli, 2018). PRG ve NRG kombinasyonunun, terapötik potansiyelleri nedeniyle nöropatik ağrı, anksiyete ve epilepsiye karşı etkili olduğu ve bu iki ilacın kombinasyonel şekilde kullanılmasının sağlık alanında

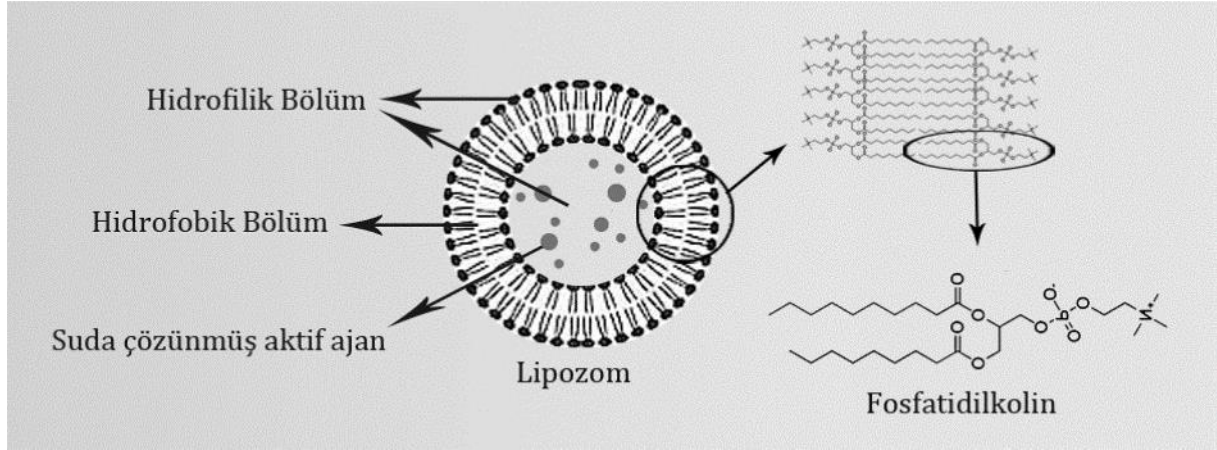
olumlu etkiler yaratabileceği bildirilmiştir (Gupta, Adin, Aqil, Mujeeb ve Akhtar, 2023). Naringin yüklü transnizosomların (NRN-TN) hazırlandığı çalışmada, NRN-TN, ince film hidrasyon tekniği ile oluşturularak optimize edilmiş ve NRN-TN'nin fiziko-kimyasal karakterizasyonu *in vitro* NRN salımı açısından analiz edilmiştir. Biyokimyasal ve histolojik araştırmalar sonucunda, NRN-TN'nin üstün anti-epileptik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca toksisite çalışmaları ise NRN-TN formülasyonunun güvenli olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, oluşturulan TN vezikül formülasyonunun, epilepsi tedavisinde NRN'nin intranazal uygulanması için değerli bir taşıyıcı olduğunu doğrulamıştır (Gupta, Adin, Aqil ve Mujeeb, 2024). Naringinin biyoyararlanımını artırmak amacıyla amilaz, -linoleik asit ve -laktoglobulinden oluşan nanopartikül materyalinin kapsülleme etkinliği %78,73 olarak bulunmuş, Ayrıca, nanopartikül-naringin simüle gastrik sıvı (SGF) ve simüle intestinal sıvı (SIF) ortamında, kontrollü bir salım göstermiş ve oluşturulan nanopartikülün naringinin biyoyararlanımını etkili bir şekilde geliştirebileceği belirtilmiştir (Feng ve diğerleri, 2017). Naringinin zein/kazein biyopolimerlerinin biyolojik olarak parçalanabilir proteinleri içinde kapsüllendiği çalışmada, kapsüllenen naringinin hücre içi lipid birikimini azaltarak kapsüllenmemiş moleküle göre daha yüksek anti-adipojenik aktivite gösterdiği, Caco-2 hücrelerindeki toksisite çalışmalarında nanopartiküllerin herhangi bir yan etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Naringin kapsüllü koloidal formülasyonun, fonksiyonel gıdalarda umut verici bir dağıtım sistemi olabileceği rapor edilmiştir (Nallamuthu, Ponnusamy, Smruthi ve Khanum, 2021). Dirençli maltodekstrinin (RMD) naringini sprey kurutma kullanarak kapsülleme potansiyelinin değerlendirildiği çalışmada, elde edilen tozların partikül boyutu, morfolojisi, termal özellikleri ve nem sorpsiyonu incelenmiş, ek olarak naringinin sudaki çözünürlüğüne bakılmıştır. %60-80 oranında enkapsülasyon verimliliği elde edilmiş ve bu dispersiyonların termal ve nem sorpsiyonu davranışlarının RMD kaynaklandığı belirtilmiştir. Lif-naringin oranı ve püskürtmeli kurutma sıcaklıkları değiştirilerek, naringin RMD matrisinde amorf formda dağılabilmiş ve bu da suda çözünürlükte %20-55 artışa yol açmıştır. Çözünürlük artışının, naringin oranı ve püskürtmeli kurutma sıcaklığı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.

Sprey kurutma temelinde lif-polifenol çift bileşenli nutrasötik bir enkapsülasyon teknolojisi başarıyla geliştirilmiştir (Pai, Vangala, Ng, Ng, ve Tan, 2015). Naringinin niozomal enkapsülasyonun geliştirilmesini amaçlayan çalışmada, enkapsülasyonun naringinin çözünürlüğünü ve stabilitesini iyileşmekle kalmayıp aynı zamanda kontrollü salım özellikleri de sunduğu belirtilmiştir. Fizikokimyasal karakterizasyon yapılarak naringinin niozomal yapı içinde başarılı bir şekilde kapsüllendiği doğrulanmış, naringinin gelişmiş stabilite ve sürekli salım özellikleri ile sonuçlandığı belirtilmiştir. *In vitro* salım çalışmaları, naringinin uzun süreli salımını göstererek, terapötik etkileri için potansiyelini ortaya koymuştur. Hazırlanan naringin yüklü formülasyonun, antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS testleri ile değerlendirilmiş ve naringine kıyasla serbest radikallerin daha iyi temizlendiği ortaya konmuştur. Naringinin antioksidan potansiyeli ve yara iyileştirme özellikleri gibi önemli faktörlere sahip olması, yenilikçi naringin niozom preparatının, farmasötik endüstrisinde değerli bir kaynak olarak umut vaat ettiğini ve potansiyel olarak emülsiyon stabilizatörleri, bağlayıcı maddeler, koyulaştırıcılar olarak rol oynadığını güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır. Çalışmadan çıkan bir başka sonuç ise niozom ve naringin biyokompozitinin yalnızca gelişmiş besin değeri sunmakla kalmayıp aynı zamanda yara iyileştirme özelliklerine sahip doğal tıbbi içerik olarak da önemli bir potansiyel olarak rapor edilmesi olmuştur (Krithika, Leelarani, Ravilla, Perumal ve Padmini 2023). Benzer şekilde Kandhare, Alam, Patil, Sinha ve Bodhankar, (2016), naringin yüklü bir merhemde sıçanlarda yara iyileşmesi sağladığını belirtmişlerdir. Naringin yüklü propozomların (propilen glikol tabanlı lipid veziküller) ise naringin solüsyonuna göre daha iyi açık yara iyileştirme kabiliyeti sergilediği belirtilmiştir (Kumari ve diğerleri 2022). Naringinin niozomal yolla enkapsüle edilerek antifungal etkisinin incelendiği çalışmada, naringin *T. mentagrophytes*'e karşı 50 µg/mL MIC ile güçlü antifungal aktivite sergilemiştir. Optimize edilen niozomal jel formülasyonu %75,88 hapsetme etkinliği, kontrollü ilaç salımı ve mantar suşuna karşı önemli *in-vitro* antifungal aktivite sergilemiş, niozomal jelin herhangi bir cilt tahrişine neden olmadığı ve topikal uygulama için güvenli olduğu rapor edilmiştir. Standart terbinafin jeli (mantar hastalıklarında kullanılan ilaç) ile karşılaştırıldığında, naringin yüklü

niozomal jelin antifungal bir ajan olarak üstün etkinliği vurgulanmış, mantar enfeksiyonlarının tedavisinde umut verici bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Jain, Patel ve Navale, 2024). Naringin yüklenen pektin/aljinat hidrojel nanopartiküllerinin karakterizasyonunun araştırıldığı çalışmada, serbest naringine kıyasla mitokondriyal membran potansiyelinde daha fazla iyileşme görüldüğü ve daha yüksek glutatyon içeriği saptandığı belirtilmiştir ve bu sonuçların naringin kapsüllenmesi için bir taşıyıcı sağlayarak gıda olarak veya fonksiyonel gıdalarda kullanılmasını mümkün kıldığı rapor edilmiştir (Zheng, Zhang ve Lu, 2024). Kitosan, sodyum alijinat kullanılarak naringin yüklü nanopartiküllerin optimize edildiği çalışmada, naringin nanopartikülleri (NN-NPo) X-ışını kırınımı, *in-vitro* salım, *ex-vivo* permeasyon ve *in-vivo* farmakokinetik ve farmakodinamik olarak değerlendirilmiştir. *In-vitro* salım çalışması sonuçları, saf NN'ye (24 saatte $96,10 \pm 3,6$) kıyasla sürekli bir ilaç salım profili (24 saatte $91,60 \pm 3,4$) sergilediğini, permeasyon çalışması sonuçları ise saf NN dispersiyonuna ($19,38 \pm 2,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$) kıyasla ($58,43 \pm 3,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$) önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca, enkapsüle edilmeyen naringine göre 3,1'lik bir artış oranıyla önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksek bir görünür geçirgenlik katsayısı sergilemiştir. Farmakokinetik çalışma sonuçları, saf NN-dispersiyonundan önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksek bir emilim profili (AUC₀₋₂₄) ve antidiyabetik aktivite ortaya koymuştur. Biyokimyasal profilde ise değişen biyokimyasal parametrelerde kayda değer bir iyileşme gösterildiği rapor edilmiştir (Zafar ve diğerleri 2023). Lipid, kitosan ve D-tokoferil polietilen glikol süksinat kullanılarak hibrit naringin moleküllerinin (NG-HN'ler) incelendiği çalışmada, hibrit nanopartiküllerin *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisi olduğu, test edilen kanser hücreleri hattında daha iyi aktivite sergilediği ve naringinin kanser için alternatif tedavi olabileceği belirtilmiştir (Imam ve diğerleri 2022).

Nano-taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, hidrofobik-hidrofilik kısımlardan oluşan çift katmanlı polar lipid keselerdir (Şekil 2.5). Polar lipidlerin su gibi polar bir ortamda dispers edilmeleri sonucunda oluşurlar (Taylor, Gaysinsky, Davidson, Bruce ve Weiss, 2007; Gibis, Thellmann, Thongkaew ve Weiss 2014). Polar lipid olarak lesitinlerden, çoğunlukla da yumurta

lesitininden yararlanılmaktadır. Lipozomlar, özellikle lipofilik bileşiklerin enkapsülasyonunda önemli bir potansiyele sahiptirler (Toniazzi ve diğerleri, 2014). Ancak yüksek maliyeti ve kimyasal stabilitesinin düşük olması, lipozomların ana dezavantajlarıdır (Marianecce ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.5. Lipozomun yapısı (Kırtıl ve Öztop 2014)

Farklı konsantrasyonlarda (3, 6 ve 9 mg/mL) lipozomlanan naringinin antienflamatuvar özelliğinin incelendiği çalışmada, konsantrasyona bakılmaksızın boyutlar küçük (~ 100 nm), ve boyutların dağılımları iyi denilebilecek (Polidispersite indeksi (PDI) < 0.30) ölçümlerde olduğu belirtilmiştir. Formülasyonların enkapsülasyon verimliliği yüksek bulunmuş ($\sim 88\%$) ve lipozomlar oldukça negatif bir zeta potansiyeli (yaklaşık -30 mV) göstermiştir. Seçilen formülasyonlar, 3T3 fibroblastların kullanıldığı *in vitro* çalışmalarla da belirtildiği gibi biyolojik olarak yüksek derecede uyumlu bulunmuştur. *In vitro* analiz, epidermiste biriken naringinin miktarlarının (10%) lipozomların anti-inflamatuvar özelliklerini açıklayabildiğini göstermiştir. *In vivo* çalışmalar, lipozomların, farelerde deri iltihabının azaltılmasında naringinin önemini göstermiştir. Genel olarak, naringinin lipozomların, cilt inflamatuvar hastalıklarının tedavisi için umut verici bir formülasyon olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır (Pleguezuelos-Villa ve diğerleri, 2018).

Lipozomlar biyoaktif bileşeni enzim, reaktif kimyasal, yüksek sıcaklık, pH ve iyon konsantrasyonu gibi çevresel koşullara karşı koruyarak dayanımını arttırabilmekte ve aynı zamanda lipofilik bileşenlerin sulu sistemlerde çözünürlüklerini de arttırmaktadır. Lipozomların kompozisyonu, fonksiyonel özellikleri, boyutları eklenen gıdaya ve/veya çevresel etmenlere bağlıdır. Lipozomların boyutları, 20-200 nm'den 1-3 µm'ye kadar değişen boyutlarda olabilmektedir (Taylor ve diğerleri, 2007). Enkapsüle edilmiş materyalin uygun yer ve zamana kadar saklanabilmeleri ve salım oranının kontrol edilebilir olması önemli avantajlarından (Fang ve Bhandari, 2010). Lipozomlar, hücre membranına yapısal benzerlik göstermesiyle kanla taşınımı sonucunda hücreler arasına girebilmekte ve bu sayede, enkapsüle edilen biyoaktif bileşenlerin kontrollü ve hedefe yönelik salımını sağlamaktadır (Kırtıl ve Öztop, 2014).

Lipozomlar yapısal olarak hem sulu hem de lipid fazlara sahip olduklarından, hidrofilik bileşenler ve biyoaktif maddeler, kapsülleme ve kontrollü salım vermek için kullanılabilirler. Lipozomlar, antimikrobiyal bileşiklerin nanoenkapsülasyonu için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde biyoaktif maddelerin, enzimlerin ve vitaminlerin kapsüllemesi için kullanılırlar, böylece hedeflenen dağıtım ve salım elde edilebilmektedir. Bu bileşiklerin lipozomlar olarak kapsüllemesi genellikle ince film hidrasyon tekniği ile gerçekleştirilir. Örneğin nisin, gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılmak üzere genellikle nanometrik lipozomlarda tutulmaktadır (Schmidt, Holub, Sturino, ve Matthew Taylor, 2009). Süte nisin yüklü lipozomlar eklenerek ve *L. monocytogenes*'in gecikme fazının önemli ölçüde arttığı belirlenmiş, benzer şekilde, *L. monocytogenes*'in inhibisyonu, 7 ve 30 ° C'de inkübe edilen sıvı sütte nisin yüklü lipozomlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (da Silva Malheiros, Daroit, da Silveira ve Brandelli, 2010).

Meyve sularının oksidasyonunu önlemek için askorbik asitin lipozom olarak kapsüllemesi meyve suyunun zenginleştirildiği çalışma sonucunda, kapsüllemiş askorbik asidin oksidasyon oranının, saf formunkinden 300 kat daha az olduğu tespit edilmiştir (Wechtersbach, Ulrih ve

Cigic, 2012). Yeşil ay ekstraktlarının kapsüllenmesi amacıyla lipozomların kullanıldığı çalışmada, nanokapsüller, saklama sırasında kalitelerinin korunabilmesi için portakal ve nar sularına dahil edimi ve her iki meyve suyundaki askorbik asit bozunma oranının, yeşil çay ekstraktıyla yüklü lipozomların eklenmesinden sonra azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde, yeşil çay ekstraktı içeren nar suyunun antosiyanin içeriğini de uzun süre korunduğu belirtilmiştir (Naghavi, Peighambardoust, Azadmard-Damirchi, ve Khiabani, 2016).

Lipozomlar arası itici kuvvetler (elektrostatik veya sterik) artırılarak çökme ve birleşmeye karşı dayanım da arttırılmaktadır. Lipozom retiminde kullanılan fosfolipitlerin negatif yüklü olmasıyla dayanımı artırmak için kullanılacak olan kaplama materyalinin elektrostatik adsorbsiyon yöntemine göre pozitif yüklü olması gerekmektedir (Tan ve diğerleri, 2013). Lipozomların hidroliz, oksidasyon, çökme ve birleşmeye karşı sınırlı düzeyde olan fiziksel ve kimyasal dayanımı polimerlerle birlikte yüzey aktif maddeler ve antioksidanlar eklenerek arttırılmaktadır. Ancak, gıda işlenmesi sırasındaki ortam koşullarına karşı sadece fosfolipitlerden üretilen lipozomların yeterince dirençli olmaması, üretildiği fosfolipitlerin saflatırılmı (metalik iyonlardan ve diğer lipidlerden ayrıtırılmı) olması nedeniyle nispeten yüksek maliyeti, lipozomların gıda içindeki diğer bileşenlerle etkileşiminin fazlaca bilinmemesi, kapsüllenen maddenin salım hızının kontrol edilememesi, termodinamik açıdan stabil olmayışı, lipozom olusumu için gerekli olan hammadde ve prosedürün nispeten yüksek maliyetli olması lipozomun gıda endüstrisinde kullanımını olumsuz yönde etkilemesinin nedenleri olarak düşünülmektedir (Chun, Choi, Min ve Weiss, 2013; Barenholz 2001; Panya ve diğerleri, 2010).

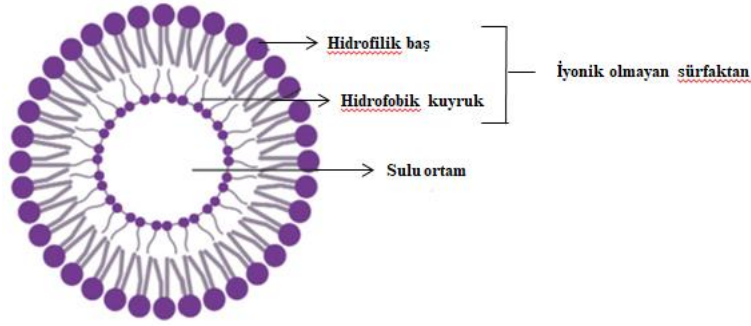
2.6. Proniozomal ve Niozomal Nano-Taşıyıcı Sistemler

Nano-taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar birçok avantajları olmasına rağmen fosfolipitler yüzünden düşük kimyasal stabiliteye sahiptirler ve yapısında bulunan lipidlerin taşıdığı ester bağları kolayca hidroliz olabilmektedirler. Lipozomlara alternatif olarak geliştirilen niozomlar, düşük maliyet, daha iyi stabilite ve sürekli salım gibi nedenlerden dolayı lipozomlara göre daha

avantajlı olan bir diğer veziküler taşıyıcı sistemlerdir. Niozomlar çoğunlukla ince film hidrasyon tekniği ile üretilmektedirler. Biyoaktif bileşik, yüzey aktif madde ve stabilizatör, vakum altında buharlaştırılan uygun bir organik çözücü içinde çözülür. Çözücü buharlaştıkça, niozomlar elde etmek için hidratlanabilen ve homojenleştirilebilen/sonike edilebilen ince bir film oluşur. İyonik olmayan yüzey aktif cisimlerinin sulu ortamda kendiliğinden birleşmesiyle oluşan kapalı iki tabakalı veziküller meydana gelir. Niozomlar (NS), çapları 10 ila 1000 nm arasında değişen mikroskobik katmanlı yapılardır. (Kaur ve Kumar 2018). Niozomlar vezikül boyutuna göre küçük tek katmanlı veziküller ($\sim 0,025-0,05 \mu\text{m}$), küçük çok katmanlı veziküller ($\geq 0,05 \mu\text{m}$) ve büyük tek katmanlı kesecikler ($\geq 0,10 \mu\text{m}$) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır (Kazi ve diğerleri, 2010).

Niozomlar, hem hidrofobik hem de hidrofilik biyoaktif bileşikler hapsedecek yüksek arayüzey aktivitesine sahip hem polar olmayan hem de polar segmentlerden oluşmaktadır. Hidrofilik kısım sulu kısma tutunurken, hidrofobik moleküller, çift tabakalarda bölünerek hapsedilirler. Niozomlara iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluştuklarından dolayı ‘niozom’ denilmektedir. İyonik olmayan yüzey aktif maddelere ek olarak, kolesterol veya türevlerini ve yüklü molekülleri de içerebilmektedirler. Kolesterol yüzey aktif maddelerin hidrofilik kısımlarıyla hidrojen bağı oluşturarak yapıya sertlik kazandırır ve hapsedilen molekülün stabil şekilde tutulabilmesini sağlayarak, niozomun yapısını ve çevresel etmenlere karşı fiziksel özelliklerini (enkapsülasyon etkinliği, uzun süreli dayanım ve kontrollü salım) geliştirmektedir (Kazi ve diğerleri, 2010; Bhardwaj, Tripathi, Gupta ve Pandey, 2020). İyonik olmayan yüzey aktif ajanlar kendi kendilerine bir araya gelerek niozom oluşumunu sağlamaktadırlar (Mahale, Thakkar, Mali, Walunj ve Chaudhari, 2012; Marianecchi ve diğerleri, 2014; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

Niozomlarda, hidrofilik moleküller merkezi sulu ortamda veya iki tabakalı yüzeyde adsorbe edilebilirken, hidrofobik kısım bunun içine bölünerek iki tabakalı yapıya girmektedir. Niozomun çift katmanlı yapısı Şekil 2.6’ da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Niozomun yapısı (Izhar, Hafeez, Kushwaha ve Simrah, 2023)

Niozomlar, lipozomlara kıyasla daha fazla kimyasal stabilite, ozmotik aktivite ve daha uzun raf ömrü sağlamaktadır. Niozomlar, fiziksel ve biyolojik stabiliteyi artırarak aktif nutrasotik bileşenin biyoyararlanımını artırabilmektedir (Kaur ve Kumar 2018; Sanklecha ve diğerleri, 2018).

Niozomların, toksik anti-kanser, anti-enfektif, anti-AIDS, anti-inflamatuar, anti-viral ilaçları vb. kapsülleyerek bu ilaçların daha iyi biyoyararlanım ve hedefleme özellikleri sağlamasına ek olarak toksisitesini ve yan etkilerini azalttığı rapor edilmiştir. Niozomun, enfekte edici organizmanın tedavisinde kullanılabileceği, niozomal preparatın ilacın karaciğerdeki emilimini artırarak ilacın diğer organlar üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabileceği belirtilmiştir. *In vitro* testler, selenyumla yüklenen niozomların güçlü anti-leishmanial aktiviteye sahip olduğunu ve potansiyel öldürücü aktiviteyi iyileştirdiğini ortaya çıkarmıştır (Mahale ve diğerleri, 2012; Mostafavi ve diğerleri, 2019).

Niozomların hazırlanmasında literatürde en çok kullanılan yöntemlerse ince film hidrasyon yöntemi, çözücü enjeksiyon yöntemi ve modifiye eter enjeksiyon yöntemleridir. Her yöntem farklı boyutlarda ve boyut dağılımlarında niozomların oluşmasına neden olabilmektedir.

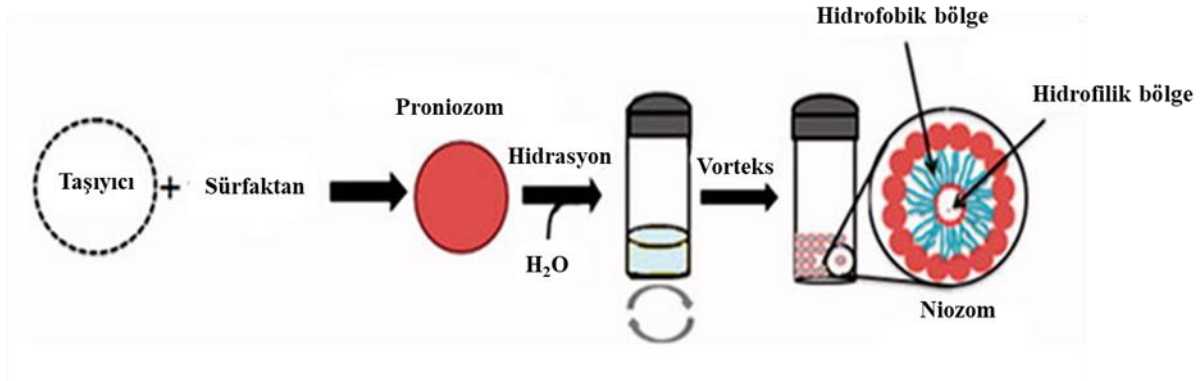
İnce film hidrasyon yöntemi, membran oluşturan bileşenlerin bir şişedeki organik bir çözücü içinde çözülmesini gerektiren basit bir prosedürdür. Organik çözücünün vakumlu

buharlaştırmayla uzaklaştırılması sonrasında şişenin içinde kurumuş ince bir film tabakası oluşur. İlaç sulu bir çözelti (su veya tampon) içinde çözülür ve daha sonra hidratlanması için kuru filme uygulanır ve niozom üretmek için yüzey aktif maddenin geçiş sıcaklığının üzerindeki bir su banyosunda inkübe edilir (Ge ve diğerleri, 2019). Bu süreç kullanılarak geliştirilen nefopamın niozomu %80'lik bir yakalama etkinliğine ve <550 nm'lik bir parçacık boyutuna sahip olduğu bildirilmiştir (Abou-Taleb, Khallaf ve Abdel-Aleem, 2018). *Çözgen enjeksiyon yöntemi*'nde, lipidlerin ve ilaçların suyla karışabilen bir çözgen (metanol, etanol, izopropanol veya aseton gibi) içinde çözülmesini sağlayarak sulu fazı oluşturmak hedeflenmektedir ve bir emülgatör veya bir emülgatör karışımı genellikle su veya bir tampon çözeltisine eklenmektedir. Organik faz, sürekli olarak mekanik olarak çalkalanırken bir iğne ile hızlı bir şekilde sulu faza enjekte edilmektedir. Çözücü, enjeksiyondan sonra sulu faza difüze olur ve damlacık bölünmesine ve boyutun azalmasına, ayrıca lipid konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır (Duong, Nguyen ve Maeng, 2020). Çözgen enjeksiyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Gatifloxacin niozomu 213 nm parçacık boyutunda %65'lik bir verimle üretilmiştir (Zubairu, Negi, Iqbal ve Talegaonkar, 2015). *Modifiye eter enjeksiyon* yönteminde ise, kolesterol ve yüzey aktif madde kloroform içinde çözülür ve sulu faz olarak ilacı içeren hidratlı bir fosfat tamponu çözeltisine bir iğne aracılığıyla yavaşça enjekte edilir; bu çözelti, sıcaklık korunurken manyetik bir karıştırıcı üzerinde çalkalanmaktadır. Niozomal yapının oluşumunun ardındaki mekanizma, çözücünün buharlaşma yoluyla yavaş yavaş uzaklaştırılmasıdır. Niozomun iki katmanlı yapısı, sulu-susuz ara yüze doğru eter gradyanı ile oluşturulmaktadır. Bu tekniğin dezavantajı, niozomal süspansiyonda çıkarılması sorunlu olan küçük bir eter yüzdesinin mevcut olmasıdır (Nagalakshmi, Nivathra ve Shanmuganathan, 2020).

Trans-membran pH gradyanı yönteminde de, ilaçlar pH gradyanına dayalı olarak bir araya getirildikten sonra niozomlara yüklenmektedir. Yüzey aktif madde ve kolesterol kloroform içinde çözülmekte ve ince bir lipid film oluşturmak için düşük basınç altında

buharlaştırılmaktadır. Film, vorteks karıştırma yoluyla bir asidik bileşik çözeltisi (genellikle sitrik asit, pH 4) ile hidratlanarak niozom oluşturmak için dondurulup çözülür ve ilacın sulu çözeltisi niozomal süspansiyona eklenmektedir. Çözeltinin pH değerini 7-7.2'ye yükseltmek için bir fosfat tamponu eklenir, böylece niozomların iç ortamı dış ortamdan daha asidik hale getirilmiş olur. Bu, ilacın birleşmiş formunun niozomal çift tabakadan geçmesine izin vererek ilacın niozomlara girdiğinde, asidik ortamda iyonize olmasını ve böylece yüksek verimlilikte kapsüllenmenin gerçekleşmesini sağlar. Bu yöntem, iyonize olabilen ilaçlarla sınırlı olmasına rağmen verimliliği yüksek kapsülleme sağlamaktadır (Thabet, Elsabahy ve Eissa, 2022).

Niozomlar, lipozomlara göre birçok avantaj sunmasına rağmen, agregasyon, füzyon, hapsedilmiş ilacın sızması ve kapsüllenmiş ilaçların hidrolizinde ortaya çıkan ve dispersiyonun raf ömrünü sınırlayacak bazı stabilite sınırlamalarına sahiptirler. Bu sorunların giderilmesi ve ulaşımında ilave kolaylık sağlanması amacıyla, dağıtım, depolama ve dozajlama için proniozomlar geliştirilmiştir. Proniozomlar taşıyıcı tipine ve hazırlama yöntemine göre kuru granüler proniozomlar ve sıvı kristal proniozomlar (pronozomal jel) olmak üzere iki formda bulunan iyonik olmayan bazlı yüzey aktif madde kesecikleridir. Kullanımdan önce sulu ortamda rehidrasyon yoluyla niozomal dispersiyona dönüştürülebilmektedirler. Proniozomların rehidrasyonundan sonra elde edilen niozomlar, daha düzgün boyut dağılımına sahip olmasına rağmen geleneksel niozomlara çok benzemektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Proniozomların niozomlara hidrasyonu ve niozomların hidrofilik, hidrofobik kısımları (Khatoon ve diğerleri, 2017)

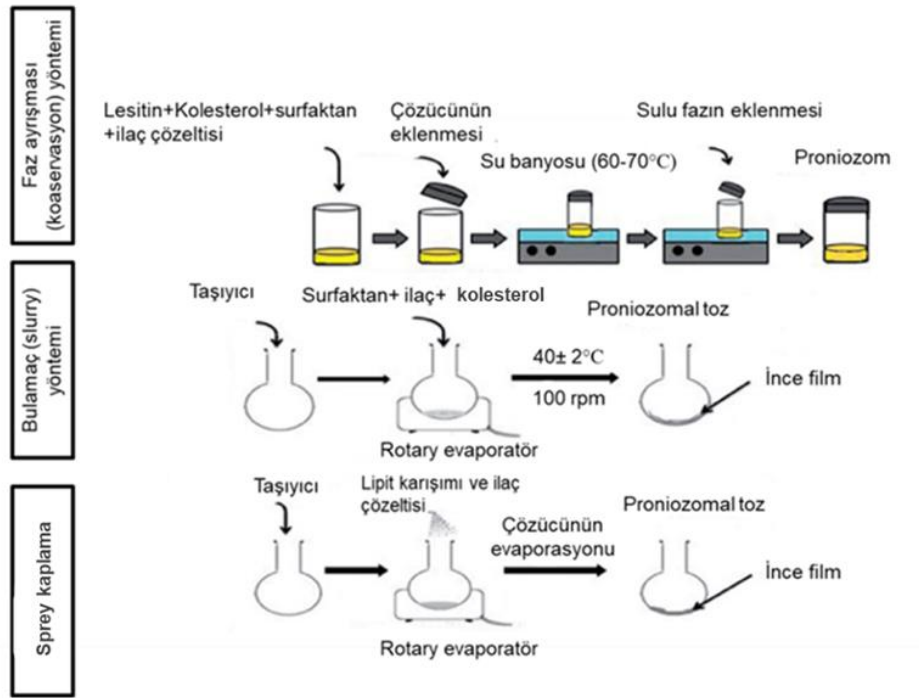
Proniozomların veziküler yapıda kapsüllenmesi, aktif maddelerin stabilitesini uzatması, geliştirilmiş penetrasyonu ve uygulamadan sonra toksisitenin azaltılmasını sağlayabilmektedir. Proniozomların kuru granüler formu, proniozomal yapıyı depolama ve sterilizasyon sırasında daha stabil hale getirmekte ve proniozomların transferini, dağıtılmasını ve ulaşılabilirliğini arttırmaktadır (Morakul ve Junyaprasert 2020). Proniozomlarda membran stabilizatörü olarak iyonik olmayan yüzey aktif madde ve kolesterol ile maltodekstrin, laktoz, sorbitol vb. gibi suda çözünen farklı taşıyıcılar kullanılmaktadır (Shruthi, Pushpadass, Magdaline Eljeeva Emerald, Surendra Nath, ve Laxmana Naik, 2021). Proniozom hazırlanmasında iyonik olmayan sümfaktanların suda az çözünen etken maddelerin biyoyararlanımını arttırdığı bilinmekte ve iyonik olmayan sümfaktanlar, yüzey aktif maddenin hidrofilik lipofilik denge (HLB) değerini, kritik faz sıcaklığını (T_c), zincir uzunluğunu, hidrofilik grubun boyutunu ve etken madde tutma verimini belirlemektedir (Tablo 2.5). Kamboj, Saini ve Bala (2014), yaptıkları çalışmada vezikül formu için HLB değeri 4-8 arasında, maksimum tutma verimi için HLB değeri 8.6 olan surfaktanların en uygun olduğunu rapor etmişlerdir. HLB değeri 6'dan düşük surfaktanlara kolesterol ilave edilerek enkapsülasyon etkinliği ve vezikül stabilitesi artırılabilir. Kolesterolün doğal hidrofobik özelliği agregasyonu modüle etmekte ve çift katmanlı lipid yapısı ile mükemmel stabilite sağlamaktadır. Bu yüzden kolesterol: sümfaktan oranı enkapsülasyon

etkinliği açısından oldukça önemlidir (Kaoud, Heikal ve Hammady, 2022). Yüzey aktif maddenin HLB değeri alkil zincirinin uzunluğundan etkilenmekte ve HLB değeri ne kadar düşükse, enkapsülasyon etkinliği de o kadar düşük olmaktadır. Tween 20 ve Span 60'ın en yüksek enkapsülasyon verimliliği gösterdiği belirtilmiştir (Kazi ve diğerleri, 2010).

Tablo 2.5. Sürfaktanların HLB ve geçiş sıcaklığı değerleri (Ajrın ve Anjum, 2022)

Sürfaktan	HLB değerı	Geçiş sıcaklığı
Sorbiatan monolaurat (Span 20)	8.6	16°C
Sorbiatan monopalmitat (Span 40)	6.7	42°C
Sorbiatan monostearat (Span 60)	4.7	53°C
Sorbitan monooleat (Span 80)	4.3	-12°C
(Polioksietilen sorbitan monolaurat) (Tween 20)	16.7	-
(Polioksietilen sorbitan monostearat) (Tween 60)	14.9	-
(Polioksietilen sorbitan monooleat) (Tween 80)	15.0	-

Proniozomlar, bulamaç yöntemi, yavaş spre y kaplama yöntemi ve koaservasyon faz ayırma yöntemi olarak üç hazırlanma metodlarına göre üretilmektedir (şekil 2.8).



Şekil 2.8. Proniozom hazırlama yöntemleri (Khatoon ve diğerleri, 2017)

Proniozomlarla kapsüllenen bileşenlerin gıdalarda ve nutrasötik uygulamalarda kullanılabilirliğini araştıran çalışmalar incelendiğinde, gıda ve ilaç uygulamalarında kullanılan ve antimikrobiyal bir ajan olan nisin in etkinliğini artırmak için kullanılan etilendiamintetraasetik asit (EDTA) niozomlara yüklenmiş ve *Staphylococcus aureus*'u inhibe etmede serbest formlarından daha stabil ve daha uzun süreli bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Kopermsub, Mayen, ve Warin, 2011).

Niozomal enkapsülasyonun, antimikrobiyal maddenin aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, siprofloksasin (antibiyotik) yüklü niozomların antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiş ve siprofloksasin yüklü niozomların, analiz edilen izolatların çoğunda minimum biyofilm inhibitör konsantrasyonunu azalttığı ve dirençli *S. aureus* izolatlarına karşı siprofloksasin aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (Kashef, Saleh, Assar ve Ramadan, 2020). Aflatoksin kontaminasyonunu önlemek amacıyla farklı aromatik bitki

esansiyel yağlarının niozomal enkapsülasyonu yapılarak *in vitro* ortamda antifungal ve antitoksijenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, mısır depolama sırasında kapsüllenen esansiyel yağların, *A. Flavus* gelişimini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (García-Díaz, Patiño, Vázquez ve Gil-Serna, 2019). Çeşitli yüzey aktif maddeler kullanılarak üretilen niozomlar, Fe^{2+} yi enkapsüle etmek için kullanılmış ve yoğurda uygulanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda yoğurdun özelliklerinin, demir yüklü niozomların eklenmesinden etkilenmediği, ayrıca, yoğurttaki peynir altı suyu proteinleri ile eklenen niozomlar arasında etkileşime dair kanıt olmadığı belirtilmiştir (Gutiérrez, Matos, Barrero, Pando Iglesias ve Pazos, 2016). Yine bir başka çalışmada, resveratrol yüklü niozomların yoğurda dahil edilmesinin doğal nitelikleri üzerinde olumsuzluğa neden olmadığı ve niozomların sütlü içeceklere dahil edilmek için uygun bir araç olduğu sonucuna varılmıştır (Pando, Beltrán, Gerone, Matos ve Pazos, 2015). Benzer şekilde, lor ve süt, resveratrol ve kuersetin yüklü niozomlarla zenginleştirildiği ve fizikokimyasal özelliklerin bu zenginleştirilmeden etkilenmediği belirtilmiştir (Sravani, 2018).

β -karotenin niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, β -karotenin güneş ışığı, yüksek sıcaklık ve oksidatif koşullara oldukça dirençli olduğu, ayrıca niozomların suda çözünür oldukları da belirtilmiştir (Palozza, Muzzalupo, Trombino Valdannini ve Picci, 2006). Gouranton ve diğerleri 2008, likopenin yağ hücrelerinde çözünürlüğünü artırmak için Palozza ve diğerleri, (2006)'nın kullandığı enkapsülasyon yöntemini uygulamışlar, ancak hücrelerde likopenin çözünürlüğünün çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun niozom ile kaplama sırasında uygulanan işlemlerin, likopenin parçalanmasına sebep olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Portakal suyunu zenginleştirmek amacıyla kuersetin yüklü niozomların üretildiği çalışmada fitosterol ile stabilize edilen niozomun polietilen glikol 400 e göre daha yüksek miktarda antioksidan özellik gösterdiği ayrıca fitosterol ile stabilize edilen örneğin 30 günlük saklama

süresi boyunca ve pastörizasyon işleminden sonra daha iyi enkapsülasyon stabilitesi kazandığı belirtilmiştir (Elmi ve diğerleri, 2021). Optimal bir niozomal sistem geliştirerek oral yoldan alınan Ginkgo biloba ekstraktının (GbE), ginkgo biloba tabletlerine göre biyoyararlanımının artırılmasının hedeflendiği çalışmada, *in vitro* ortamda GbE niozomlarının fosfat tamponlu çözeltide (pH 6.8) flavonoid glikozitlerin salımını 48 saate kadar uzatabileceği belirtilmiş, *In vivo* ortamda ise dağılımına bakılarak GbE niozom taşıyıcı sistemi ile tedavi edilen sıçanların kalp, akciğer, böbrek, beyin ve kanındaki flavonoid glikozit içeriğinin, oral GbE tableti ile tedavi edilen sıçanlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Oral GbE tabletleri verilen sıçanların beyin dokusunda flavonoid glikozit tespit edilmemiş, ancak GbE niozomları verilen sıçanların beyin dokusunda tespit edildiği belirtilmiştir (Jin ve diğerleri, 2013). Yapılan başka bir çalışmada, yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan fakat ışık gibi çevresel koşullardan önemli ölçüde etkilenmesi nedeniyle niozom ile enkapsüle edilen resveratrolün, toplam antioksidan kapasiteyi ve *trans*-resveratrol yapısını ~%85 koruyabildiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar, bu sistemleri farklı uygulamalara, özellikle de ışığa duyarlı bileşiklere uygun hale getirmektedir (Machado, Gutiérrez, Matos ve Fernández, 2021). Başka bir çalışmada ise punicalagini korumak amacıyla farklı miktarlarda noniyonik yüzey aktif madde kullanılarak niozomların optimizasyonu yapılmıştır (Priya ve Singh 2012). Propolis ekstraktının niozomla enkapsüle edildiği çalışmada, niozomal propolis ekstraktının akciğer epitel hücrelerinde mantar kolonizasyonunu önlemek ve biyofilm üretimini inhibe etmek üzere bir anti-virulans ajanı olduğu rapor edilmiştir (Kietrungruang ve diğerleri, 2023). *Pistacia atlantica* meyvesinin antikanser ve antibakteriyel etkilerinin incelendiği çalışmada, niozomal ekstraktın, tek ekstrakta göre önemli derecede antikanser ve antibakteriyel etki gösterdiği, niozomal formülasyonun mikrobiyal enfeksiyonlara karşı önemli terapötik potansiyeli olabileceği belirtilmiştir (Al-Enazi, Alsamhary, Ameen ve Nobre, 2023). Başka bir çalışmada ise, kurkumin yüklü proniozomal formülün tahriş edici ve toksik olmadığı, ancak pazarlanan indometasin (anti-enflamatuar ilaç) ürünlerine göre daha düşük anti-enflamatuar ve anti-artritik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Kumar ve Ria 2012). Suda az çözünen apigenin biyoaktif

bileşiminin niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, niozomun apigeninin penetrasyonunu ve terapötik etkinliğini arttırmak amacıyla etkili bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu rapor edilmiştir (Alsaidan ve diğerleri, 2023). Antikanser ajan olarak kullanılan letrozolün bulamaç bazlı bir proniozom teknolojisi kullanılarak üretildiği çalışmada, letrozol yüklü niozomların bir ay boyunca yüksek düzeyde stabil kaldığı ve kontrollü iki fazlı salım sağladığı belirtilmiştir (Khudair ve diğerleri, 2020). *Gymnema sylvestre* ekstraktı ile yüklenen niozom formülasyonlarının, ana ekstraktla karşılaştırıldığında kan şekeri seviyesinde önemli bir azalma ve antihiperglisemik aktivitede artış gösterdiği belirtilmiştir (Kamble ve diğerleri, 2013). Karaciğer ve safra kesesi bozukluklarının tedavisinde kullanılan silimarinin (süt devedikeni *Silybum marianum*'un tohumlarından izole edilen saflaştırılmış bir ekstrakt) niozomal formülasyonlarının, uygulanan silimarin süspansiyonu ile karşılaştırıldığında hepatoprotektif aktivite gösterdiği, bu sonucun histopatolojik olarak da kanıtlandığı rapor edilmiştir (El-Ridy, Badawi, Safar ve Mohsen, 2012). Yapılan başka çalışmada ise ellagik asit yüklü niozomların, ellagik asidin insan epidermisi ve dermisi yoluyla iletilmesinde ellagik asite göre daha etkili olduğu kanıtlamıştır (Junyaprasert Singhsa ve Jintapattanakit, 2013). Kozmetik ürünlerde cildi besleyen ve yumuşatıcı bir bileşen olarak kullanılan amonyum glisirhizinatin, farklı oran ve niozomal formülasyonlarda hazırlandığı çalışmada, insanlarda antienflamatuar etkiyi iyileştirdiği ve toksisite göstermediği belirtilmiştir (Marianecchi ve diğerleri, 2012). Antienflamatuar, antiviral, antioksidan ve antitümör gibi farklı farmakolojik etkiler için kullanılan ursolik asit, oral biyoyararlanımının zayıf olması sebebiyle, niozomal jel olarak elde edilmiş ve çeşitli kas-iskelet sistemi bozuklukları için güvenli ve etkili bir tedavi sunarak geleneksel tedaviye umut verici bir seçenek olabileceği rapor edilmiştir (Jamal ve diğerleri, 2015). Nar kabuğu ekstraktının stabilitesini artırmak amacıyla proniozomunun üretildiği çalışmada, depolama süresi boyunca uygun fiziksel stabilite gösterdiği ve uygulanan proniozomal formülasyonların, 3T3 fibroblast hücrelerine karşı toksik olmadığını ve ayrıca niozomların iyi bir serbest radikal tutucu olduğu belirlenmiştir (Shaghayegh Alavi ve diğerleri, 2021). Düşük biyoyararlanımı nedeniyle psikiyatrik ilaç olan klozapinin proniozomal jel ile

enkapsüle edildiği çalışma sonucunda, proniozomlar %90 gibi yüksek bir verimlilikle başarılı bir şekilde enkapsüle edilmiştir. Klozapin yüklü proniozomal jelin *in vitro* ve *ex vivo* geçirgenlik çalışmaları, kontrol olarak doymuş ilaç çözeltisine kıyasla anlamlı bir fark ifade etmiştir ($p<0.05$) ve klozapinin proniozomal jel olarak deri yoluyla etkili bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir (Tareen ve diğerleri, 2020). Bir başka çalışmada ise, kalp yetmezliği, yüksek tansiyon hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan ramiprilin niozomla enkapsüle edilmesi sonucunda enkapsülasyon verimliliği %62,41, ortalama boyut 348,7 nm ve PDI 0,581 olarak bulunmuştur. Optimize edilmiş niozomal formülasyonun, uzun süreli *in vitro* ilaç salım özellikleri gösterdiği rapor edilmiştir (Dahiya, Rao ve Nanda, 2011). *Annona squamosa* metanolik ekstraktının ve ekstrakt yüklü niozomunun antikanser ve biyo-marker özelliklerinin incelendiği çalışmada, yüklü ekstraktın daha iyi koruyucu etkisinin olduğu ve tedavi edilen tüm gruplarda pozitif kontrole kıyasla daha düşük tümör hacmi belirlenmiştir (Abd-Elghany ve diğerleri, 2022).

Antikanser özelliğiyle bilinen önemli biyoaktif bileşiklerden kurkuminin, niozomla enkapsüllendiği çalışmada, test edilen tüm dozlarda serbest kurkuminden çok daha yüksek hücre öldürme oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir (Xu ve diğerleri, 2016). Yapılan başka çalışmada, suda çözünmeyen morusin flavanoidinin meme kanser hücrelerini öldürdüğü belirtilmiştir (Agarwal ve diğerleri, 2018). Benzer şekilde Jadid, Jafari-Gharabaghlo, Bahrami, Bonabi ve Zarghami (2023) yaptıkları çalışmada, kolorektal kanser hücre hattına karşı anti-kanser ajanı olarak *Saccharomyces cerevisiae*'nin ısı ile öldürülmüş bir formu ile birlikte kurkumin yüklü niozomal formülasyonların üretimini yapmışlar ve kurkumin yüklü niozomal formülasyonların kolon kanserinin tedavi etkinliğini önemli ölçüde arttırabileceğini belirtmişlerdir. Bal arısı zehirinde bulunan bir peptit olan melittinin, antikanser özelliği bulunmaktadır. Melittin yüklü niozomun, serbest melittin'den daha fazla anti-kanser aktiviteye ve daha iyi bir stabiliteye sahip olduğu bildirilmiştir (Misra, Ye, Kim ve Pan, 2015). Yeşil çay ekstraktı yüklü niozomal formülasyonların kanser hücrelerine karşı etkisinin incelendiği

Çalışmada, formülasyonlarla tedavi edildiğinde normal hücre hattının canlılık yüzdesi, kanser hücrelerine göre daha yüksek bulunmuştur (Baranei ve diğerkleri, 2021). Başka bir çalışmada ise ozonlanmış zeytinyağı yüklü niozomal veziküler zeytinyağının sudaki çözünürlüğünü, cilt geçirgenliğini ve antikanser aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Fahmy ve diğerkleri, 2022). Bir diğerk çalışmada ise, *Artemisia turcomanica* ekstraktı yüklü niozomların meme kanseri hücrelerine karşı anti-kanser özellikleri serbest *Artemisia turcomanica*'dan önemli lde daha yüksek bulunmuştur. (Keshtmand, Naimi, Piran, Jafroodi ve Yarakı, 2023). Kateşin yüklü proniozomlarla zenginleştirilmiş süt ve yoğurt örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinde önemli bir değışiklik olmaksızın kabul edilebilir bir organoleptik kaliteye sahip olduğı ve proniozomların *in vitro* koşullar altında antioksidan aktiviteyi koruduğı saptanmıştır (Shruthi ve diğerkleri, 2021). Schlich ve diğerkleri (2020), resveratrol yüklü proniozomların, resveratrol stabilitesini ve biyoyararlanımını geliştirerek fonksiyonel gıda için umut verici bir nano-taşıyıcı olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Örneklerin Temin Edilmesi

Yapılan ön çalışmalarda naringin saflaştırılması araştırılarak kristalizasyon oluşumu ve miktarı bakımından en iyi sonuçlar greyfurtlarda elde edilmiştir. Çalışmada, 2020,2021 ve 2022 yıllarında Adana bölgesinde yetişen *Citrus paradisi* türü kullanılmıştır. Greyfurtlar yıkanıp kurutulduktan sonra el ile soyularak albedo kısmı çıkarılmış ve etüvde 40 °C’de 1 gün (UF110, Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach, Germany) kurutulmuştur (Şekil 3.1). Kurutulan albedolar buzdolabı poşetine konularak ekstraksiyon işlemine kadar -18°C’de muhafaza edilmiştir. Fakir marka öğütücü kullanılarak albedo öğütülmüştür.



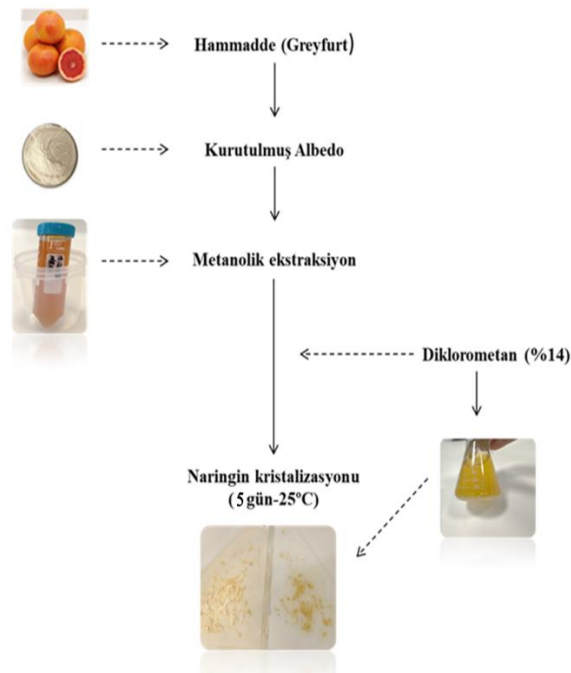
Şekil 3.1. Kurutulmuş albedo örnekleri

3.2. Kimyasallar

Metanol (HPLC grade), diklorometan (CH_2Cl_2), ABTS (2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Troloks ((+/-)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asid) gallik asit, potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Sorbitan monostearat (Span 60, kolesterol), dodekanol, maltodekstrin, hidrojen peroksit (H_2O_2), naringin, folin-ciocalteu, sodyum bikarbonat, TAE tamponu (Tris asetat- EDTA), bromofenol mavisi, sakkaroz, GelRed Nükleik asit boyası, etidyum bromür, potasyum klorür (KCl) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis. ABD) firmasından temin edilmiştir. Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) Isolab GmbH (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.3. Naringin Bileşiğinin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu

Sudto ve diğerleri (2009)'nin çalışmasında birtakım modifikasyonlar yapılarak referans alınmış ve greyluft atığından, dikkate değer biçimde naringin kristalleri elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Naringin ekstraksiyon ve kristalizasyon aşaması

3.4. Naringin Bileşiminin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu

Çalışmada, farklı ekstraksiyon koşullarında greyfurt kabuğu atıklarından naringin saflaştırılarak, oluşan kristal miktarı ve kristaldaki naringin miktarının optimizasyonu yapılarak en yüksek miktarda sonuç veren parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon çalışması Design-Expert (versiyon 7.0, Statease Inc., Minneapolis, MN, USA) programı kullanılarak Yanıt Yüzey Yönteminin Box Behnken tasarım modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda bağımsız değişkenler çözücü (metanol/su) konsantrasyonu, (%60-80 v/v), ekstraksiyon süresi (72-120 saat), örnek miktarı olarak(g), bağımlı değişkenler ise oluşan kristal miktarı ve kristaldaki naringin miktarı olarak belirlenmiştir. Greyfurt kabuğundan elde edilen kristal yapı ve kristal yapıdaki naringin miktarı optimize edilerek Tablo 3.1’de dizayn edilen deneme planına göre uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Box Behnken Dizayn tasarımı ile optimize edilen greyfurt kabuğu ekstraksiyonunun proses değişken kodları

Bağımsız değişkenler	Değişken seviye kodları			
	Kod	-1	0	+1
Çözücü konsantrasyonu (%)	A	60	70	80
Örnek miktarı (g)	B	20	30	40
Zaman (saat)	C	72	96	120

3.5. Naringinin Karakterizasyonu

Oluşan naringin kristallerinin karakterizasyonu HPLC (Shimadzu Prominence-i LC-2030C) ile yapılmıştır. Naringin miktarlarının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda standart çözelti hazırlanmış ve HPLC’ye enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve naringinin karakterizasyonu ve kantifikasyonu yapılmıştır (Kelebek, 2010). Analizler, diyot array dedektörü (DAD), ikili pompa, gaz giderici ve otomatik örnekleyici ile donatılmış Windows tabanlı yazılım sistemi tarafından işletilen bir HPLC sisteminde (Shimadzu,

Prominence-i LC-2030C Kyoto, Japan, Palo Alto CA-USA) gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan HPLC koşulları ve elüsyon sistemi aşağıdaki gibidir:

Kolon: Phenomenex Luna reversed-phase C-18 kolon (4,6 mm×250 mm, 5 µm)

Enjeksiyon miktarı: 15 µL

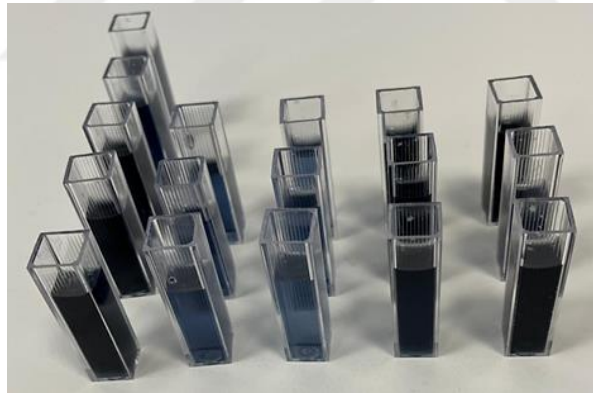
Taşıyıcı faz: A=Su/formik asit (99:1, h/h), B= Asetonitril/ Formik asit (99/1, h/h)

Akış hızı: 0,6 mL/dak Dalga boyu: 280, 320 ve 360 nm

Dedektör tipi: Diyot array dedektör

3.6. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik madde içeriğini belirlemek için Folin-Ciocalteu reaktif yöntemi kullanılmıştır (Singleton, 1966) (Şekil 3.3). 200 µL ekstrakt/standart çözeltiye 1,5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi (1:10) eklenmiştir. Beş dakika sonra %6 oranında Na₂CO₃ eklenmiş ve oda sıcaklığında 90 dakika bekletilmiştir. Cary 60 UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ABD) ile 765 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 6,25-200 ppm arasında farklı gallik asit konsantrasyonları kullanılarak oluşturulmuş, sonuçlar mg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.3. Folin-Ciocalteu reaktif yöntemi ile toplam fenolik madde tayini

3.7. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Antioksidan kapasite 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) testleri olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir (Kelebek ve diğerleri 2017; Brand-Williams, Cuvelier, ve Berset, 1995). Seyreltilen örnekler 3,9 mL DPPH çözeltisi eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbansı daha sonra Cary 60 UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ABD) ile 515 nm'de ölçülmüştür. ABTS yönteminde ise seyreltilen örnekler 3,9 mL ABTS radikal çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika beklenerek 734 nm'de absorbans ölçülmüştür (Re ve diğerleri 1999). Her iki analizde de antioksidan aktivite $\mu\text{mol Trolox/g}$ cinsinden ifade edilmiştir.

3.8. Mikrobiyolojik Analizler

3.8.1. Antimikrobiyal aktive tayini

Naringin ve naringin yüklü proniozom örneklerinin, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 29213, *Bacillus subtilis* (B. Subtilis) ATCC 1177, *Klebsiella pneumoniae* (K.pneumoniae) ATCC 13883, *Escherichia coli* (E.coli) ATCC 25922, ve *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) ATCC 27853 bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Han ve diğerleri, 2021). S. aureus ATCC 29213, B. subtilis ATCC 1177, K.pneumoniae ATCC 13883, E.coli ATCC 25922 ve P. aeruginosa ATCC 27853 bakterileri triptik soy agar kullanılarak 24 saat süreyle anaerobik ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. Aktifleşen bakteri kültürlerinden belirli miktarlarda alınarak %0,45 NaCl çözeltisi içine aktarılıp, McFarland 0.5 (108 kob/mL)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. Her bir bakteri kültürü 100 μL olacak şekilde, steril Muller-Hinton agar üzerine inoküle edilerek yayılmıştır. Daha sonra, önceden besiyeri üzerinde açılan 7-8 mm çapındaki kuyucuklara 20-50 μL örneklerden eklenmiştir. Tüm denemeler iki paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlamada kullanılan steril çözücü

negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.

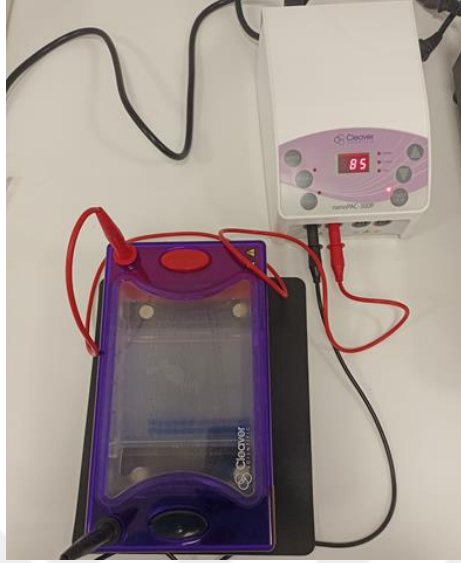
3.8.2. Minumum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Örneklerin minumum inhibisyon konsantrasyonları (MİK), Dey, Parai, Banerjee, Hossain ve Mukherjee (2020)’in çalışmasına göre bazı modifikasyonlar uygulanarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Örnekler, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853 bakterilerine karşı 15-0,23 mg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir. 24 saatlik bir bakteri hücresi süspansiyonun 13 µl’si (108 kob/mL), 15-0,23 mg/mL arasında değişen örnek konsantrasyonlarda 200 µL MH broth içeren steril 96 kuyulu mikropalakaya eklenmiştir. Pozitif kontrol aynı oranda inokulum ve MHB (Muller Hinton Broth) içerirken, negatif kontrol steril besiyeri (MHB) olarak ortama eklenmiştir. Mikroplaka 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve optik yoğunluk (OD) mikroplaka okuyucu (SPECTROstar Nano-Mikroplaka, BMG Labtechnologies, Offenburg, Almanya) kullanılarak 600 nm’de ölçülmüştür. Görünür bir büyüme göstermeyen, bakteriyel popülasyon büyümesini engelleyen en düşük test bileşiği konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.8.3. DNA koruyucu etkinin belirlenmesi

DNA hasarı inhibisyon potansiyeli, agaroz jel elektroforezi ile süper sarmal pBR322 plazmid DNA varlığında H₂O₂’nin UV radyasyonu ile fotolizlenmesi ile gerçekleştirilmiştir (Russo ve diğerleri 2016; Verma, Shrivastava ve Kumar, 2015) (Şekil 3.4). Deneyler, 3 µL pBR322 plazmid DNA, 5 µL ekstrakt ve 1 µL %30 H₂O₂ içeren bir mikrosantrifüj tüpünde yapılmıştır. Tüm tüpler UV transillüminatör (Vilber, TCP-26mcv1) (320 nm) kullanılarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle UV ışınına tabi tutulmuştur. Işınlamadan sonra 2 µL yükleme boyası (%0,05 bromofenol mavisi, %40 süktroz, 0,1M EDTA (pH 8,0) ve %0,5 SDS) eklenmiştir. Tüm

örnekler TAE tamponunda (pH: 8) etidyum bromür içeren %0,8 agaroz jel üzerinde jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.4. Jel elektroforez yöntemi

3.9. *In vitro* Sindirim

Naringin ve naringin yüklü proniozom örneklerinin, *in vitro* sindirim yöntemi Brodkorb ve diğerleri 2019, tarafından tanımlanan yönteme göre yapılmıştır. Yöntem, insan sindirim sürecini laboratuvar ortamında simüle etmek için birkaç adımdan oluşmaktadır. İlk olarak, simüle edilmiş bir tükürük sıvısı (SSF) hazırlanmış ve bir numune SSF (1:1, w/w) ile karıştırılmıştır. Ardından, tükürük amilazı (75 U/mL) eklenmiş ve oral fazdaki koşulları taklit etmek için 37 °C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, hidroklorik asit (HCl) kullanılarak bir tampon çözeltinin pH'ı 2,0'a ayarlanarak simüle edilmiş bir mide sıvısı (SGF) hazırlanmıştır ve örnekler SGF ile karıştırılmış ve mide koşullarını oluşturabilmek için 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerden belirli miktarlarda alınarak sindirim durdurulmuş kalan örneklerle, tampon çözeltinin pH'ı 7,5'e ayarlanarak simüle edilmiş bir bağırsak sıvısıyla (SIF) hazırlanmıştır ve ince bağırsaktaki koşulları simüle etmek için 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sindirim işlemi sırasında, mide ve ince bağırsaktaki enzimatik aktiviteyi taklit etmek için SGF ve SIF'ye sırasıyla pepsin (2.000 U/mL) ve pankreatin

(tripsin aktivitesi 100 U/mL) gibi enzimler ile safra sıvısı eklenmiştir. Bu enzimlerin konsantrasyonları insan sindirim sisteminde bulunan fizyolojik seviyelere göre belirlenmiştir.

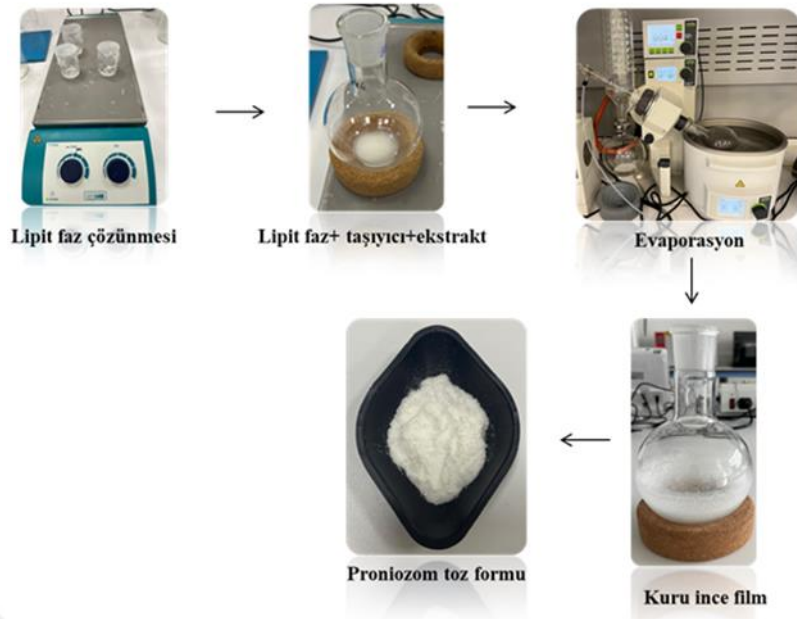
3.10. Proniozomların Hazırlanması ve Formülasyonunun Belirlenmesi

Optimal ekstraksiyon koşulu ile elde edilen naringin kristalleri proniozomal formülasyona eklenirken 1 ml etanol ile çözülmüştür. Proniozomların hazırlanmasında bulamaç yöntemi kullanılmıştır (Khatoon ve diğerleri, 2017; Sammour, Taher, Chatterjee, Shahiwala, ve Mahmood, 2019; Naggar, El Gamal ve Allam 2012) (Şekil 3.5). Çeşitli oranlardaki yüzey aktif madde (Span 60) /kolesterol ve dodekanol ile ekstraktan oluşan karışım, etanol içinde çözüldükten sonra yuvarlak tabanlı balona aktararak maltodekstrin (taşıyıcı) ilave edilmiştir. Çözücü evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra, kuru granüler yapıdaki proniozomlar elde edilmiştir. Bu metot ile 3 (20, 40 ve 50 mg) farklı örnek miktarı ve 2 farklı(kolesterol/dodekanol) lipid fazlarına sahip maltodekstrin bazlı proniozom üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen proniozom tozunun tamamen kuruması için 1 gece boyunca karanlıkta ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Her deneme ekstrakt içermeyen kontrol üretimi ile kontrol edilmiştir. Ayrıca çalışmada 200 mg naringinin pellet oluşturması nedeniyle daha düşük konsantrasyonlarda naringin miktarları denenmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Kolesterol ve dodekanol lipid fazlı proniozom toz formülasyonlarının bileşimi

Örnek no	Kolesterol (g)	Dodekanol (g)	Span 60 (g)	Maltodekstrin (g)	Etanol (ml)	Ekstrakt (mg)
PNRG1	0,1	-	0,1	1,23	10	20
PNRG2	0,1	-	0,1	1,23	10	40
PNRG3	0,1	-	0,1	1,23	10	50
PNRG4	-	0,1	0,1	1,23	10	20
PNRG5	-	0,1	0,1	1,23	10	40
PNRG6	-	0,1	0,1	1,23	10	50
Kontrol	0,1	-	0,1	1,23	10	-

PNRG: Naringin yüklü proniozom, **Kontrol:** Örnek içermeyen boş proniozom



Şekil 3.5. Bulamaç yöntemi ile proniozomların hazırlanması

3.11. Proniozomların Karakterizasyonu

3.11.1. Partikül boyutu ve polidispersite indeks (PDI)

Partikül boyutu ölçümleri için proniozom tozlarından 100 mg alınarak 1 mL ultra saf su (60°C) ile çözündürülmüştür. Elde edilen niozomlar 2 dk vorteksledikten sonra 50 µL alınıp 4 mL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler Whatmann 42 no'lu filtre kağıdı ile filtre edilerek niozomal formülasyonların partikül boyutunu belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılmıştır. Sonuçlar Malvern Nano ZS90 (United Kingdom) cihazı (Şekil 3.6) kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.6. Partikül boyutu ve PDI değerinin belirlenmesi.

3.11.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Naringin ve naringin yüklü proniozom örneğinden 5 mg alınarak elmas numune kabına yerleştirilmiştir. Spektral veriler (Jasco, FTIR/6700) JASCO Spectra Manager II yazılımı ile elde edilmiştir. Örneklerin analizinde 4 cm^{-1} çözünürlükte $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ aralığında tarama yapılmıştır (Krithika ve diğerleri 2023).

3.11.3. Nem tayini

0.5 g ağırlığındaki örnekler Ohaus MB45 (Şekil 3.7) cihazına entegre terazi ile tartılarak halojen bir radyatör yardımıyla 10 dk kurutulmuştur. Toplam ağırlık kaybı % nem olarak belirlenmiştir (Yılmaz, Aydeniz Guneser ve Ok, 2019).



Şekil 3.7. Nem tayini

3.11.4. Enkapsülasyon etkinliği

Niozomlara yüklenen naringin miktar analizi Kelebek ve diğerleri (2017)'nin yöntemine göre HPLC (Shimadzu Prominence-i LC-2030C) kullanılarak yapılmıştır. Proniozomlardan niozom elde edilmesi amacıyla 0,5 g proniozom 5 ml 60°C ultra saf su içerisinde 2 dk vortekslenmiştir. Hidratasyon sonucu elde edilen dispersiyon, niozomlara yüklenemeyen etkin maddeyi ayırmak amacıyla 4°C 20 000 rpm'de 10 dk ultrasantrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım enjeksiyon için 0,45'lik membran filtrelerden geçirilmiştir. Naringin bileşiminin kalitifikasyonu ve kantifikasyonu naringin standardı ile yapılmıştır. Üretilen niozomların enkapsülasyon etkinliği hesaplanmasında indirekt santrifüj metodu modifiye edilerek kullanılmıştır (Natarajan, Krithica, Madhan, ve Sehgal, 2011). Veziküllerin enkapsülasyon etkinliği formülasyon aşamasında kullanılan ekstrakta yer alan toplam etkin madde miktarından süpernatantta tayin edilen serbest etkin madde miktarının çıkarılması ile belirlenmiştir. Kullanılan formül aşağıda verilmiştir:

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (EE \%)} = \frac{\text{Toplam naringin miktarı} - \text{Serbest naringin miktarı}}{\text{Toplam naringin miktarı}} \times 100$$

3.11.5. Stabilite çalışması

Naringin yüklü proniozom ve kontrol örnekleri 4°C ve 25°C koşullarında 28 gün depolanarak 0, 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde partikül boyutu, PDI ve enkapsülasyon etkinliği değerlerine bakılmıştır.

3.12. İstatiksel Analiz

Çalışmada SPSS istatistik programı (versiyon:22, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak tek yönlü ANOVA analizi uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki farklar Duncan'ın karşılaştırma testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Optimizasyon çalışması Design-Expert (versiyon 7.0, Statease Inc., Minneapolis, MN, USA) programı kullanılarak Yanıt Yüzey Yönteminin Box Behnken tasarım modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Naringin Bileşiğinin Ekstraksiyon ve Kristalizasyonunun Optimizasyonu

Optimizasyon çalışması Design-Expert (versiyon 7.0, Statease Inc., Minneapolis, MN, USA) programı kullanılarak Yanıt Yüzey Yönteminin Box Behnken tasarım modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda bağımsız değişkenler olarak çözücü (metanol/su) konsantrasyonu, (% 60-80 v/v), ekstraksiyon süresi (72-120 saat), örnek miktarı ve bağımlı değişkenler olarak ise oluşan kristal miktarı ve kristaldaki naringin miktarı değerlendirilmiştir. Greyfurt kabuğundan oluşan kristal yapı ve kristal yapıdaki naringin içeriğinin optimizasyon koşullarına bağlı değişimi Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Box Behnken dizayn tasarımı ile optimize edilen greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı miktarının ve kristal yapıdaki naringin içeriği

Deney numarası	Çözücü konsantrasyonu (%) (A)	Örnek miktarı (g) (B)	Ekstraksiyon süresi (saat) (C)	Oluşan kristal miktarı (g)	Kristaldeki naringin miktarı (g)
1	60	30	72	1,41	1,22±0,01
2	70	30	96	2,72	1,84±0,01
3	60	40	96	2,26	1,94±0,04
4	70	20	72	1,44	1,23±0,03
5	60	30	120	2,44	1,99±0,06
6	60	20	96	1,09	0,95±0,01
7	70	30	96	1,76	1,59±0,1
8	80	30	120	1,31	1,12±0,01
9	70	40	120	2,54	2,31±0,04
10	70	30	96	2,45	2,11±0,00
11	70	40	72	2,56	1,96±0,05
12	80	40	96	1,35	1,19±0,00
13	70	20	120	1,43	1,24±0,02
14	80	20	96	0,78	0,65±0,01
15	70	30	96	2,29	2,21±0,01
16	80	30	72	1,15	0,69±0,01

Deneysel veriler ile modelin birbirleriyle uyum içerisinde olup olmadığı ANOVA (varyans analizi) ile belirlenmiştir. ANOVA analizinde önemli olan yanıtlar üzerine etkili olan terimler *F*-istatistiği kullanılarak belirlenmiştir. Beklenen yanıt için; belirlenen modelin uygun olup olmadığı lack of fit değeri ile tahmin edilmiştir. Buna göre lack of fit değerinden kaynaklanan hatanın önemsiz (not significant), regresyon sonucu ortaya çıkan varyasyonun %95 güven aralığında önemli (significant) durumda görülmesi ile modelin uygunluğu sağlanmış olmaktadır. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı miktarı için elde edilen ardışık model kareler toplamı Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Greyfurt kabuğundan farklı ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişen kristal yapı miktarları sonucu elde edilen ardışık model kareler toplamı

Kaynak	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	<i>F</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	
<u>Ortalama vs toplam</u>	54,06	1	54,06			
Linear vs Ortalama	2,98	3	0,9934	3,72	0,0422	
2FI vs Linear	0,2730	3	0,0910	0,2796	0,8389	
Quadratic vs 2FI	2,54	3	0,8475	13,14	0,0048	önerilen
Cubic vs Qadratic	0,2196	3	0,0732	1,31	0,4143	
Kalıntı	0,1673	3	0,0558			
Toplam	60,24	16	3,77			

Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı miktarı için her bağımsız değişkenin yanıt üzerindeki lineer ve interaksiyon etkilerinin değerlendirilmesinde istatistiksel olarak model açısından önemliliği ifade eden F ve p -değerleri incelenmiştir. Bu değerlendirmeye ait varyans analizi (ANOVA) sonuç tablosu, Tablo 4.3'te verilmiştir. Model uygunsuzluğu (lack of fit) önemsiz olarak belirlenirken ($p>0.05$), model de %95 güven aralığında önemli olarak bulunmuştur ($p<0,0056$). Greyfurt kabuğundan elde edilen kristal yapının miktarında, zaman (C) ve belirtilen interaksiyonların (AB, AC, BC) etkili olmadığı görülürken, çözücü konsantrasyonu ve örnek miktarının (A, B) etkili olduğu görülmektedir. Çözücü konsantrasyonu, örnek miktarına göre cevap üzerinde daha fazla etkili olmuştur.

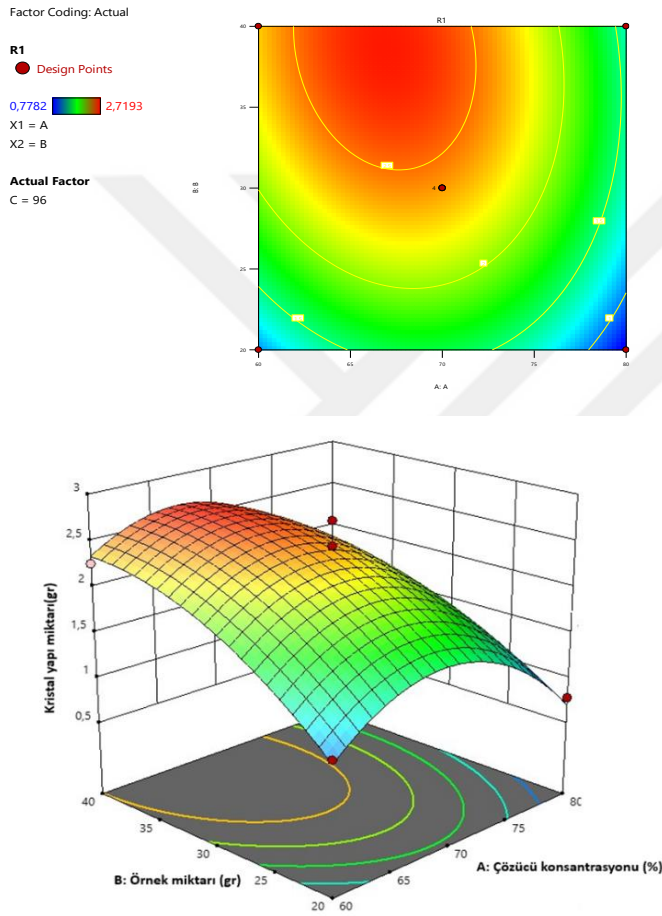


Tablo 4.3. Greyfurt kabuğundan oluşturulan kristal yapı miktarı için model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerine etkisi ile ilgili varyans analizi (ANOVA)

Kaynak	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri	
Model	5,80	9	0,6440	9,99	0,0056	önemli
A-A	0,8516	1	0,8516	13,21	0,0109	
B-B	1,96	1	1,96	30,42	0,0015	
C-C	0,1669	1	0,1669	2,59	0,1588	
AB	0,0880	1	0,0880	1,36	0,2871	
AC	0,1850	1	0,1850	2,87	0,1413	
BC	0,0000	1	0,0000	0,0004	0,9855	
A ²	2,12	1	2,12	32,80	0,0012	
B ²	0,3857	1	0,3857	5,98	0,0501	
C ²	0,0414	1	0,0414	0,6426	0,4533	
Kalıntı	0,3869	6	0,0645			
Model uyumsuzluğu	0,2196	3	0,0732	1,31	0,4143	önemsiz
Saf hata	0,1673	3	0,0558			
Toplam	6,18	15				

A: Çözücü konsantrasyonu (%); **B:** Örnek miktarı (g); **C:** Ekstraksiyon süresi (saat)

Greyfurt kabuklarından saflaştırılan kristal yapı miktarının optimum noktasının daha anlaşılır olmasını sağlayan yanıt yüzey eğrileri de çizilmiştir. Bu grafikler, faktörlerden birinin deneysel dizaynının merkez noktasında (0) sabit tutulup, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını göstermektedir Şekil 4.1’de gösterildiği gibi, örnek miktarı arttıkça ve çözücü konsantrasyonu azaldıkça R1 (kristal miktarı) de artış görülmüştür ve çözücü konsantrasyonu örnek miktarına kıyasla daha önemli bulunmuştur.



Şekil 4.1. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapının miktarındaki değişim için cevap-yüzey grafiği

Deneysel veriler ile modelin birbirleriyle uyum içerisinde olup olmadığı ANOVA (varyans analizi) ile belirlenmiştir. ANOVA analizinde önemli olan yanıtlar üzerine etkili olan terimler F -istatistiği kullanılarak belirlenmiştir. Beklenen yanıt için; belirlenen modelin uygun olup olmadığı lack of fit değeri ile tahmin edilmiştir. Buna göre lack of fit değerinden kaynaklanan hatanın önemsiz (not significant), regresyon sonucu ortaya çıkan varyasyonun %95 güven aralığında önemli (significant) durumda görülmesi ile modelin uygunluğu sağlanmış olmaktadır. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarı için elde edilen ardışık model kareler toplamı Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Greyfurt kabuğunun farklı ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişen naringin miktarları sonucu elde edilen ardışık model kareler toplamı

Kaynak	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F - değeri	p -değeri	
<u>Ortalama vs toplam</u>	37,62	1	37,62			
Linear vs Ortalama	2,44	3	0,8138	4,61	0,0228	
2FI vs Linear	0,1058	3	0,0353	0,1578	0,9220	
Quadratic vs 2FI	1,80	3	0,6015	17,41	0,0023	önerilen
Cubic vs Quadratic	0,1141	3	0,0380	1,22	0,4357	
Kalıntı	0,0932	3	0,0311			
Toplam	42,18	16	2,64			

Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarı için her bağımsız değişkenin yanıt üzerindeki lineer ve interaksiyon etkilerinin değerlendirilmesinde istatistiksel olarak model açısından önemliliği ifade eden F ve p -değerleri incelenmiştir. Bu değerlendirmeye ait varyans analizi

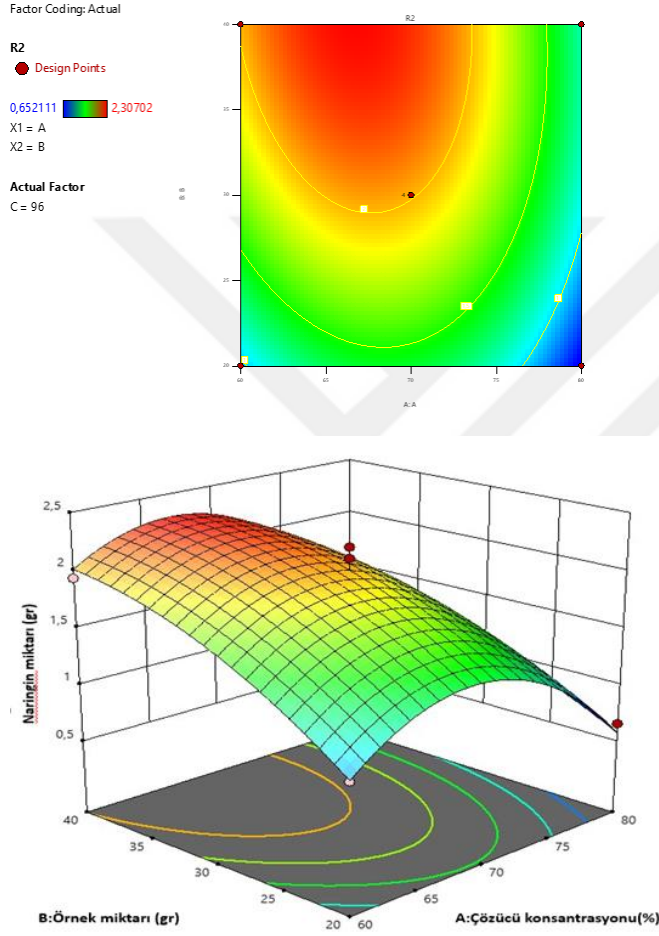
(ANOVA) sonuç tablosu, Tablo 4.5'te verilmiştir. Model uygunsuzluğu (lack of fit) önemsiz olarak belirlenirken ($p>0.05$), model de %95 güven aralığında önemli olarak bulunmuştur ($p<0,0022$). p değerine bakılarak, greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin bileşiği üzerine en önemli etkinin çözücü konsantrasyonunun yaptığı, daha az etkili olmakla birlikte örnek miktarının takip ettiği çıkarımı yapılabilmektedir. Zaman (C) ve belirtilen interaksiyonların (AB, AC, BC) etkili olmadığı görülmektedir. F değerlerine göre seçilen parametrelerin ikili etkileşimlerinin tekli parametreler kadar etkin olmadığı görülmektedir.

Tablo 4.5. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarı için model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerine etkisi ile ilgili varyans analizi (ANOVA)

Kaynak	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri	
Model	4,35	9	0,4835	14,00		önemli
A-A	0,7508	1	0,7508	21,73	0,0035	
B-B	1,39	1	1,39	40,22	0,0007	
C-C	0,3012	1	0,3012	8,72	0,0255	
AB	0,0503	1	0,0503	1,46	0,2728	
AC	0,0282	1	0,0282	0,8153	0,4013	
BC	0,0273	1	0,0273	0,7896	0,4084	
A²	1,58	1	1,58	45,81	0,0005	
B²	0,1565	1	0,1565	4,53	0,0774	
C²	0,0655	1	0,0655	1,90	0,2177	
Kalıntı	0,2073	6	0,0345			
Model uyumsuzluğu	0,1141	3	0,0380	1,22	0,4357	önemsiz
Saf hata	0,0932	3	0,0311			
Toplam	4,56	15				

A: Çözücü konsantrasyonu (%); **B:** Örnek miktarı (g); **C:** Ekstraksiyon süresi (saat)

Greyfurt kabuklarından saflaştırılan naringin miktarının optimum noktasının daha anlaşılır olmasını sağlayan yanıt yüzey eğrileri de çizilmiştir. Bu grafikler, faktörlerden birinin deneysel dizaynının merkez noktasında (0) sabit tutulup, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını göstermektedir Şekil 4.2’de gösterildiği gibi, çözücü konsantrasyonu arttıkça R2 (naringin miktarı) de artış görülmüştür fakat %70 lik çözücü konsantrasyondan sonra naringin miktarının azaldığı saptanmıştır.

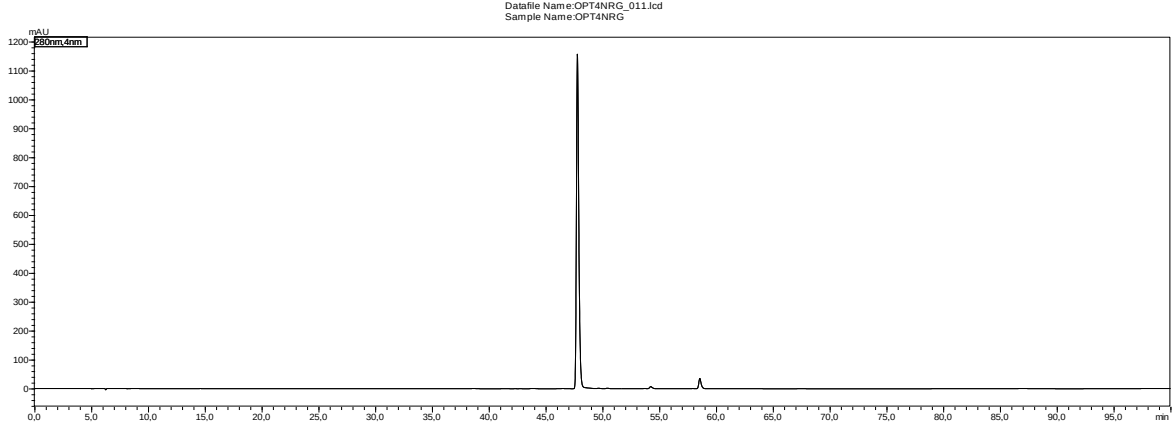


Şekil 4.2. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan naringin miktarındaki değişim için cevap-yüzey grafiği

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapının maksimum miktarı ve maksimum naringin miktarı için % 67,16 metanol konsantrasyonu, 38 g örnek miktarı ve 119 saat ekstraksiyon süresi optimum koşullar olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6). Optimum koşulun doğruluğunun tespiti için belirlenen optimum noktada deneysel sonuçlar elde edilerek, sonucun sistem tarafından belirlenen %95 güven aralığı içerisinde olup olmadığı kontrol edilmiştir. Belirlenen koşullardaki optimizasyonda istenilebilirlik (desirability) değeri ise 1,00 olarak elde edilmiştir. Optimum koşullarda yapılan tekrarlı ekstraksiyon işlemi sonucunda oluşan kristal miktarı 2,78 g ve kristal yapıdaki naringin miktarı $2,73 \pm 0,02$ g (%98,27 saflıkta) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Greyfurt kabuğundan saflaştırılan kristal yapı ve kristal yapıdaki naringin miktarının yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulan Box Behnken deney tasarımındaki optimum ekstraksiyon koşulları

Deney numarası	Çözücü konsantrasyonu (%)	Örnek miktarı (g)	Ekstraksiyon süresi (saat)	Oluşan kristal miktarı (g)	Kristaldeki naringin miktarı (g)	İstenirlik değeri (Desirability)	
1	67,162	38,069	119,196	2,775	2,436	1	Seçilen
2	66,626	38,675	106,232	2,748	2,390	1	
3	68,667	37,778	114,667	2,723	2,389	1	
4	64,488	36,328	117,483	2,760	2,371	1	
5	66,086	37,889	104,148	2,733	2,359	1	
6	63,654	39,317	111,012	2,736	2,387	1	
7	65,902	34,867	111,912	2,725	2,331	1	
8	66,677	35,353	108,131	2,721	2,331	1	
9	67,032	37,998	105,693	2,740	2,374	1	
10	67,343	36,864	105,564	2,727	2,349	1	



Şekil 4.3. Optimum koşullarda üretilen naringine ait kromatogram

Metanol konsantrasyonu artış gösterdiğinde naringin miktarının azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Çözücü konsantrasyonunun bitki özütlerinin fenolik bileşikler üzerindeki etkisi, artan metanol miktarının ekstraktı seyrelteceği ve bunun da naringinin metanoldeki çözünürlüğünü etkileyeceği şeklinde yorumlanmıştır (Messaoudene, Lovillo, Hazzit ve Djebbar, 2018). Tez çalışmasına paralel olarak, pomelo meyvesi kabuğundan elde edilen naringin kristallerinin ekstraksiyonu üzerinde farklı parametrelerin etkisinin incelendiği çalışmada, etanol konsantrasyonu %40'dan %80'ne yükseldiğinde, naringin miktarında azalma gözlenmiştir (Son, Thi, Hau, Khang ve Cang, 2021). Ekstraksiyon süresi 72 saatten 120 saate çıkarıldığında oluşan kristal miktarının arttığı görülmektedir. Öte yandan, uzun ekstraksiyon süresinin, kimyasal bileşiklerin ayrışmasına neden olabileceğini ve greylift kabuğundaki naringin içeriğini azaltabileceğini düşündürmektedir (Chew ve diğerleri 2011). Shilei, Hongfei ve Jiexiong (2006), naringini pomelo kabuğundan tamamen elde etmek için daha yüksek etanol konsantrasyonunun (%50) ve daha az ekstraksiyon süresinin (90 dakika) gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Son ve diğerleri (2021), 1-4 saat arasında ekstraksiyon süresinde, naringin içeriğinin %40 etanol konsantrasyonu ve 4 saatlik ekstraksiyon süresinde en yüksek değere ulaştığını belirlemişlerdir. Ayrıca, 1/12 (g/mL) hammadde /çözücü oranında en yüksek naringin miktarı elde edilmiştir. Bu tez kapsamında ise en yüksek naringin miktarı 1/13 (g/mL)

hammadde/       oranında belirlenmiştir. Yüksek  rnek/        oranı gradyan konsantrasyonunu artırarak örnekten       ye difüzyon hızının artmasına neden olabilmekte ve dengeye ulaşmak için gereken süreyi artırmaktadır (Predescu ve diğ rleri, 2016). Sıcaklık, hammadde/       oranı ve ekstraksiyon süresinin naringinin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, *C. grandis* tomentosa'dan naringinin ekstraksiyon verimi, sıcaklığın 30 C'den 50 C'ye çıkmasıyla %57,43'ten %82,2'e önemli ölçüde artmış, sıcaklık 60 C'ye ulaştığında *C. grandis* tomentosa'dan naringinin verimi %83,55'e yükseltilmiştir. Bitkinin aktif bileşenlerini korumak için, deneysel sıcaklık çok yüksek tutulmamıştır.       /hammadde oranını 5:1'den 15:1'e çıkarıldığında *C. grandis* tomentosa'dan elde edilen naringinin ekstraksiyon veriminin %70,59'dan %82,34'e önemli ölçüde arttığı,       /hammadde oranı 15:1'e ulaştığında verimin %83,37'ye yükseldiği bildirilmiştir. Ekstraksiyon süresinde ise 20 dakikadan 40 dakikaya çıkarıldığında ekstraksiyon veriminin %40,77'den %82,38'e önemli ölçüde arttığı, ekstraksiyon süresinin 50 ve 60 dakikaya çıkarıldığında ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilemediği belirtilmiştir (Kong, Bi, Yan ve Zeng, 2013). *Citrus paradisi*'nin albedo kısmından ultrasonik su banyosu, ısı ekstraksiyonu ve ultrasonik homojenizatör kullanılarak ultrason destekli ekstraksiyon ile naringin ekstraksiyonun yapıldığı başka bir çalışmada ise naringin (       olarak %50 etanol v/v, sonikasyon süresi 50 2 C'de 30 dakika) 17,45 mg/g olarak ultrasonik su banyosu ile yapılan ekstraksiyonda bulunmuştur (Stabrauskiene, Marksa Ivanauskas ve Bernatoniene, 2022). Sudto, Pornpakakul ve Wanichwecharungruang (2009), pomelo kabuğundan maserasyon ekstraksiyon yöntemiyle 1 kg kurutulmuş kabuktan 20 g >%98 saflıkta naringin elde etmişlerdir.

Greyfurt atıklarından geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonu ve ultrases destekli ekstraksiyonu ile naringinin miktarı sırasıyla 18-28 ve 24-36 mg/g arasında bulunmuştur (Garcia-Castello ve diğ rleri 2015). Pomelo kabuğundan naringini saflaştırmak için DM101 makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinin kullanıldığı çalışmada naringin verimi 36,25 mg/g olarak saptanmış

(Yu ve diğeri, 2023) ve yine pomelo kabuğundan naringin ekstraksiyonunun yapıldığı çalışmada naringin miktarı 10,57 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu tez kapsamında ise bu miktar 982,65 mg/g olarak hesaplanmıştır. Bu farkın, naringinin greyfurtta baskın bileşik olarak bulunması, meyvelerin yetiştirilme koşulu ve ortamından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.2. Proniozomların Hazırlanması ve Proniozomal Formülasyonun Belirlenmesi

4.2.1. Zeta, PDI, Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçlarının Değerlendirilmesi

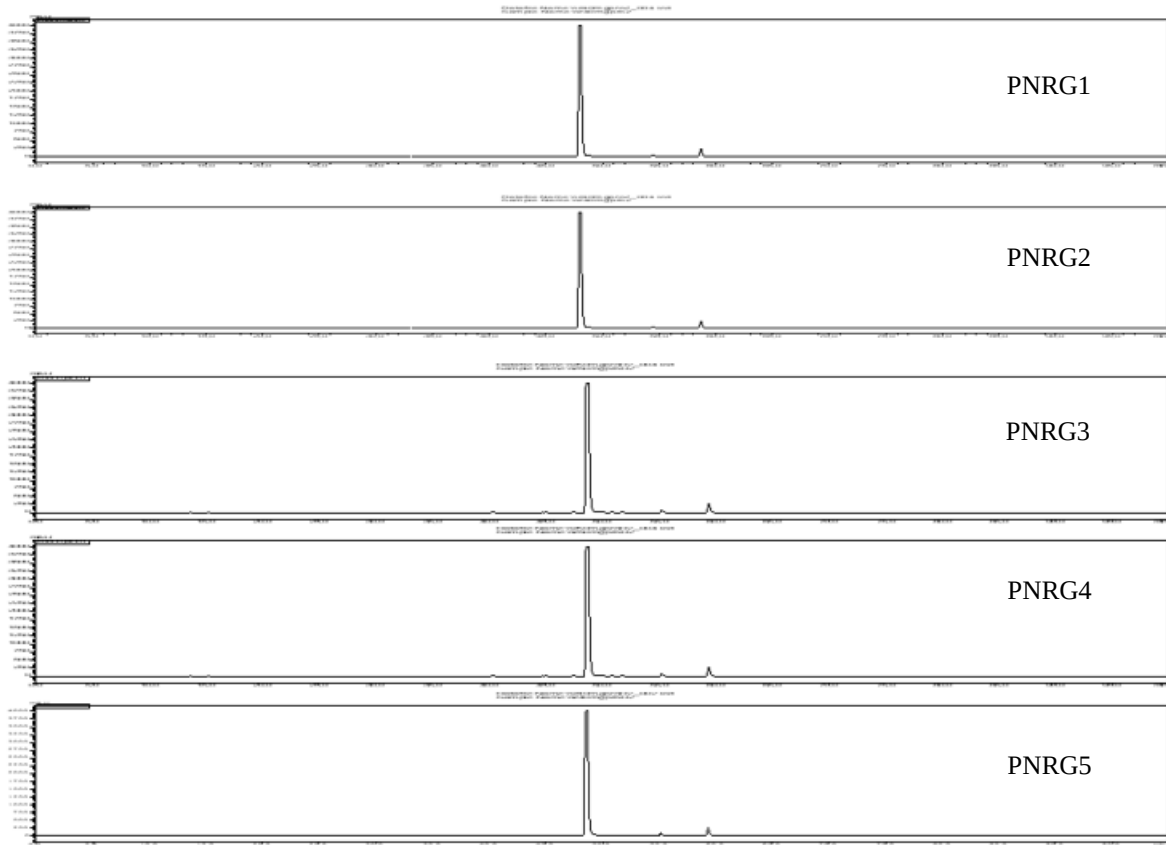
Proniozomların hazırlanmasında bulamaç yöntemi kullanılmıştır (Khatoon ve diğeri, 2017; Sammour, Taher, Chatterjee, Shahiwala, ve Mahmood, 2019; Naggar, El Gamal ve Allam 2012). Çeşitli oranlardaki yüzey aktif madde/stabilizatör ile naringinden oluşan karışım, etanol içinde çözüldükten sonra yuvarlak tabanlı balona aktararak maltodekstrin (taşıyıcı) ilave edilmiştir. Çözücü vakum altında evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra, kuru granüler yapıdaki proniozomlar elde edilmiştir. Bu metot ile 6 farklı formülasyon bileşimine sahip maltodekstrin bazlı proniozom üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Her deneme örnek (naringin) içermeyen kontrol üretimi ile kontrol edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, proniozomun karakterizasyonunun belirlenmesinde önemli rol oynayan partikül boyutu (nm), polidispersite indeks (PDI), Zeta potansiyeli (mV), % enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilerek en iyi formülasyon belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Proniozomlara ait karakterizasyon sonuçları

Formülasyonlar	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
PNRG1	238±3,70	0,33±0,03	-39±1,91	50±0,20
PNRG2	220±7,45	0,31±0,02	-40±0,42	64±0,13
PNRG3	180±8,24	0,24±0,02	-48±1,90	70±0,10
PNRG4	148±5,06	0,40±0,05	-40±1,55	44 ±0,97
PNRG5	202±1,61	0,36±0,01	-39±1,65	62±0,21
PNRG6	181±3,82	0,46±0,02	-38±0,58	70±1,64
KONTROL	221±1,59	0,22±0,00	-	-

PNRG1: 20 mg naringin yüklü kolesterol, **PNRG2:** 40 mg yüklü kolesterol, **PNRG3:** 50 mg yüklü kolesterol, **PNRG4:** 20 mg yüklü dodekanol, **PNRG5:** 40 mg yüklü dodekanol, **PNRG6:** 50 mg yüklü dodekanol

Proniozomların hidrasyonu ile üretilen niozomların küçük boyutlu (< 300 nm) ve homojen dağılmış ($PDI \leq 0.3$) olması istenmektedir. Polidispersite indeksi (PDI) numunelerin boyut dağılımlarının bir ölçüsüdür. Sonuçlar incelendiğinde, PNRG3, en düşük PDI değerine sahip olup, bu formülasyonun en homojen dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Enkapsülasyon etkinliği en yüksek PNRG3 (50 mg örnek sabilizörü kolesterol) örneğinde % 70; en düşük PNRG4 (20 mg örnek stabilizör dodekanol) numaralı örnekte % 44 olarak bulunmuştur. Genel olarak, Tablo 4.7’de gösterildiği gibi yüklenen naringin miktarı arttıkça enkapsülasyon veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, niozomal formülasyonların değerlendirilmesinde önemli bir parametredir ve HPLC kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Farklı denemelerden elde edilen niozomların HPLC kromatogramı

Dodekanol örneklerinde tam çözünme olmamış ve sonuçlara da yansımıştır. PNRG6 (50 mg örnek stabilizörü dodekanol) örneğinde PDI 0,46 diğer dodekanol kullanılan örneklerde de 0,3 ten yüksek olduğu ve homojen dağılmadığı görülmektedir. Enkapsülasyon etkinliği bakımından önemli fark görünmese de stabilite çalışmalarında ve diğer analizlerde çözünme problemi yaratacağından analizlerde PNRG3 (50 mg örnek stabilizör kolesterol) kullanılmıştır. Niozomal çalışmalarda stabilizör olarak kolesterol tercih edilmektedir. Kullanılan stabilizör çeşidi hem partikül boyutunu hem de PDI yı etkilemektedir. Kolesterol kullanılan formülasyonda PDI'nın daha düşük olması yüzey aktif maddenin çift katmanları arasına girerek sert çift katmanlara yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (Tareen ve diğerleri, 2020). Kolesterolün öneminin vurgulandığı çalışmada, kolesterol konsantrasyonunun 80 mg'dan 120 mg'a çıkmasıyla PDI'da

0,115'ten 0,392'ye bir artış gözlemlendiği, buna ek olarak kolesterol ve sonikasyon süresinin artırılmasının ve span 20 değerinin azaltılmasının, PDI'yı doğrudan iyileştirdiği bildirilmiştir (Tareen ve diğerleri, 2020). Ayrıca başka bir çalışmada, hidrofobik örneğin enkapsülasyon etkinliğini artırdığı da rapor edilmiştir (Bernsdorff, Wolf, Winter ve Gratton, 1997). Ek olarak, lipid çift tabakası arasında dağıtılan kolesterolün membran stabilize edici etkisi ve örnek penetrasyonunun önlenmesi nedeniyle verimi arttırabileceği belirtilmiştir (Chen, Hanning, Falconer, Locke ve Wen, 2019).

Proniozomlar esas olarak iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluştuğundan, HLB değerleri vezikül oluşturma kabiliyetini ve enkapsülasyon verimliliğini belirlemede oldukça önemlidir. (Morakul ve Junyaprasert, 2020). İyonik olmayan yüzey aktif maddeler sınıfına ait olan Span 60, biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi avantajlı özellikleri nedeniyle ilaç ve gıda uygulamalarında kullanım alanı bulmaktadır (Tavano ve diğerleri, 2013).

Bu tez kapsamında partikül boyutlarının 238 ile 147 (nm) arasında olduğu görülmektedir (Tablo 4.7). Elmi ve diğerleri (2021), niozom formülasyonlarının partiküller üzerinde etkili olduğunu ve stabilizatör kullanımının partükül boyutunu artırdığını bildirmişlerdir. Pando ve diğerleri (2015), niozomlara uygulanan homojenizasyon işleminin hızı ile niozomun partükül boyutu arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Fonksiyonel gıdalar için uygun bir nano bileşen olarak maltodekstrin ve laktoz kullanılarak bulamaç yöntemiyle hazırlanan resveratrol yüklü proniozomların partikül boyutlarının 180 ila 282 nm arasında değiştiği belirlenmiştir (Schlich ve diğerleri, 2019). Ayrıca, Schlich ve diğerleri (2019), laktoz ve maltodekstrinin moleküler ağırlıklarının ve kimyasal yapılarının lipid nanopartiküllerin özellikleri üzerinde bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Shruthi ve diğerleri (2021), kateşin yüklü proniozomların taşıyıcı malzeme olarak maltodekstrin, laktoz monohidrat ve pullulan kullanmış ve maltodekstrin (262 nm) ve laktoz (243 nm) bazlı proniozomlar benzer partikül boyutu göstermiştir.

Zeta potansiyeli niozomların kararlılığıyla ilişkilidir. Zeta potansiyeli, dağılmış nanopartiküller arasındaki itici kuvvetlerin derecesinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Mutlak değerin 30 mV'den büyük olması dispersiyon sisteminin stabil olduğunu göstermektedir (Junyaprasert ve diğerleri, 2008). -30 mV ile +30 mV aralığının dışındaki bir zeta potansiyeli değerinin fiziksel kolloidal kararlılığı iyileştirmek için yeterli itici güce sahip olduğu belirtilmiştir (Joseph ve Singhvi, 2019). Bu tez kapsamında genel olarak, niozomların yük yoğunluğu açısından zeta potansiyelinin -30 mV'den az olduğu, -38 ile -48 arasında değiştiği görülmektedir. PNRG3 en yüksek zeta potansiyeli (-48 mV) nedeniyle en kararlı formülasyon olarak bulunmuştur.

Naringinin ince film hidrasyon tekniği kullanılarak niozomal jel ile enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu 114,3 nm enkapsülasyon etkinliği ise %75,88 olarak bulunmuştur (Jain, Patel ve Navale, 2024). Apigenin fenolik bileşiğinin niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu $272,56 \pm 12,49$ nm, PDI 0,249 ve zeta potansiyeli -38.7 mV olarak bulunmuştur (Alsaidan ve diğerleri 2023). *Solanum ksantokarpum* niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu 253,6 nm, PDI 0,108 ve enkapsülasyon verimliliği %62,4 olarak bulunmuştur (Tyagi ve diğerleri, 2023). Naringinin hidroksipropil-p-siklodekstrin kompleks oluşturularak pektin/aljinat hidrojel nanoparçacıkları ile enkapsüle edildiği çalışmada, kapsülleme verimliliği % 79,23, PDI 0.237 ve zeta potansiyeli - 33.5 mV olarak bulunmuştur (Zheng ve diğerleri 2024). Naringinin ethosomal formülasyon ile enkapsüle edildiği çalışmada, vezikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve örnek kapsülleme verimliliği sırasıyla 142,5 nm, 0,199, -72,5mV ve %33,79 olarak bildirilmiştir (Gollavilli ve diğerleri 2020). Niozomal naringinin üretildiği başka bir çalışmada, ortalama parçacık boyutu $119,7 \pm 9,3$ nm, polidispersite indeksi $0,219 \pm 0,006$ ve zeta potansiyeli $-45,7 \pm 1,2$ mV olarak bulunmuştur (Krithika ve diğerleri 2023). Naringinin propozomal yolu ile enkapsüle edildiği çalışmada, naringin yüklü propozomların partikül boyutu 440,50 ile 980,16 nm arasında, PDI ise 0,362-0,896, zeta potansiyeli ise -97,30 ile -79,46 mV, enkapsülasyon verimi ise %95,05-%98,72 aralığında saptanmıştır (Kumari ve diğerleri 2022). Naringinin lipid, kitosan ve D- α -tokoferil

polietilen glikol süksinat hibrit nanopartiküllerle enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu 246 nm, enkapsülasyon etkinliği %83,5 ve polidispersibilite indeksi (PDI) 0,23, zeta potansiyeli ise +18,1 mV olarak bulunmuştur (Imam ve diğerleri, 2022). Propolis yüklü niozomların etanolik ekstraktının karakterize edildiği çalışmada, partikül boyutu 270 nm, zeta potansiyeli -10.54 mV ve enkapsülasyon etkinliği % 88,13 olarak belirlenmiştir (Kietrungruang ve diğerleri 2023). Punicalagin niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu 259,5 nm, PDI 0,226, zeta potansiyeli -27,2 mV ve enkapsülasyon etkinliği ise % 65,93 olarak bulunmuştur (Priya ve Singh 2012). Kateşin yüklü proniozomun karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada, partikül boyutu 193,57–262,52 nm, PDI 0,24–0,25, zeta potansiyeli -15,8 ila -24,73 arasında saptanmıştır (Shruthi ve diğerleri 2021). Yapılan bir başka çalışmada, kandesartan sileksetil (hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaç) yüklü proniozomlardan oluşan niozomların partikül boyutu 204 nm, PDI 0,307 ve enkapsülasyon etkinliği %99,09, zeta potansiyeli ise -43,65 mV olarak bulunmuştur (Yuksel, Bayindir, Aksakal ve Ozcelikay, 2016). *Pistacia atlantica* bitkisel ekstraktının niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, enkapsülasyon etkinliği %90, partikül boyutu 103 nm ve zeta potansiyeli -30 ± 2.3 mV olarak tespit edilmiştir (Al-Enazi, Alsamhary, Ameen ve Nobre, 2023). Naringinin lipozomla enkapsüle edildiği çalışmada, nanoveziküllerin kullanılan naringin konsantrasyonundan bağımsız olarak küçük boyutta (~ 100 nm), PDI $< 0,30$, yaklaşık -30 mV zeta potansiyeli ve tüm formülasyonların yüksek enkapsülasyon verimliliğine ($\sim \%88$) sahip olduğu belirtilmiştir (Pleguezuelos-Villa ve diğerleri, 2018). Naringinin kitosan ve sodyum aljinat kullanılarak nanopartikül oluşturulduğu çalışmada, partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 163,4 nm, 0,24, 38,3 mV ve %93,2 olarak bulunmuştur (Zafar ve diğerleri, 2023). Zein/Kazeinat ile naringinin kapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu 234 nm, zeta potansiyeli -28,2 mV ve enkapsülasyon etkinliği %71 olarak bulunmuştur (Nallamuthu, Ponnusamy, Smruthi, ve Khanum, 2021). Siproflaksin ve naringinin polielektrolit kompleksiyle enkapsüle edildiği çalışmada, partikül boyutu $237 \pm 3,5$ nm zeta potansiyeli -23 mV ve naringinin enkapsülasyon etkinliği % 76,2 olarak belirlenmiştir (Mohamed ve diğerleri, 2024).

4.3. Stabilit e  alışması

Stabilit e  alışmaları için PNRG3 proniozomal formülasyonu seçilmiştir. Naringin yüklü proniozom ve kontrol örnekleri 4 C ve 25 C koşullarında 28 gün depolanarak 0, 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde partikül boyutu, PDI ve enkapsülasyon etkinliği değerlerine bakılmıştır (Tablo 4.8).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, 4 C’de PNRG3 partükül boyutu 0. günde 214 nm’den 28. günde 252 nm’ye kadar artış gösterdiği, PDI (Polidispersite İndeksi)’nın 0. günde 0,23 iken, 28. günde 0,25’e yükseldiği ve bu artışın zamana bağlı olarak partiküllerin homojenliğinde bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Enkapsülasyon etkinliğinde ise 0. günde %77 iken, 28. günde bu oran %73’e düşmüştür. 4 C’de KONTROL örneğini incelediğimizde ise partükül boyutunun 0. günde 191 nm’den 28. günde 249 nm’ye artış gösterdiği, PNRG3’e göre daha düşük başlama değerine sahipken zamanla artış gösterdiği belirlenmiştir. 25 C sıcaklıkta ise, PNRG3 partükül boyutu 0. günde 209 nm iken, 28. günde 262 nm’ye yükseldiği ve 4 C’deki artıştan daha belirgin bir artış gösterdiği görülmektedir. PDI ise 0. günde 0,23 iken, 28. günde 0,26’ya çıktığı, partikül boyutu gibi 4 C’ye kıyasla daha büyük bir artış gözlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinde ise 0. günde %77 iken bu oran 28. günde %72’e düşmüştür. Kontrol örneğinin partikül boyutu ise 0. günde 200 nm iken, 28. günde 241 nm’ye artış göstermiş, PDI ise 0,22’den 0,27’e yükselmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak enkapsülasyon etkinliğinin ve homojenliğin azaldığı, dolayısıyla sıcaklıktaki artışın olumsuz etkiye neden olduğu yorumu yapılabilmektedir.

Tablo 4.8. KONTROL ve PNRG3 örneklerinin 28 gün boyunca boyut, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri

PNRG3 4°C	Boyut (nm±SS)	PDI (nm±SS)	Enkapsülasyon etkinliği (%±SS)
0. gün	214±5,13	0,23±0,00	77±0,15
1. gün	203±6,66	0,22±0,01	76±0,25
7. gün	216±7,47	0,23±0,00	75±0,27
14.gün	239±3,99	0,24±0,00	73±0,11
21. gün	224±2,02	0,24±0,00	76±0,23
28. gün	253±6,78	0,25±0,00	73±0,00
KONTROL 4°C			
0. gün	191±3,40	0,22±0,01	-
1. gün	188±2,69	0,23±0,01	-
7.gün	202±5,53	0,24±0,00	-
14.gün	213±2,05	0,24±0,00	-
21. gün	239±3,40	0,25±0,00	-
28. gün	250±6,55	0,25±0,00	-
PNRG3 25°C			
0. gün	209 ±5,35	0,23±0,00	77±0,24
1. gün	224±4,59	0,24±0,00	76±0,10
7. gün	234±6,80	0,24±0,01	75±0,32
14.gün	250±5,47	0,25±0,00	74±0,01
21. gün	256±3,87	0,25±0,00	75±0,22
28. gün	262±1,78	0,26±0,01	72±0,28
KONTROL 25°C			
0. gün	200±5,04	0,22±0,00	-
1. gün	201±4,54	0,23±0,01	-
7. gün	222±5,19	0,24±0,00	-
14.gün	228±2,76	0,24±0,00	-
21. gün	240±3,54	0,26±0,00	-
28.gün	241±3,45	0,27±0,01	-

PNRG3: Proniozomal Naringin, **KONTROL:** Naringin yüklenmemiş niozom

Alavi ve diğerleri (2021), proniozomal yol ile nar kabuğu ekstraktını enkapsüle etmişler ve stabilitesini ortalama boyut ve boyut dağılımının değişimi (PDI) değerleri açısından 4°C’de 28 günlük bir süre boyunca izlemişlerdir. Örnek yüklenmemiş niozomların 28 günlük depolama süresince boyutları sabitken, örnek yüklenen niozomların iki hafta sonra boyutlarının arttığını ve homojenliklerini kısmen kaybettiklerini belirlemişlerdir.

Bir başka çalışmada, siklosporin A (Romatoid artrit, sedef hastalığı tedavisinde kullanılır), yüklü niozomların stabilitesi farklı saklama koşullarında incelenmiş ve niozomların boyutundaki değişim 25°C’de 4°C’ye göre nispeten daha fazla belirlenmiştir. Bu durumun, niozomal formülasyonlarda sıcaklık etkisi ve zamana bağlı olarak moleküler hareketler nedeniyle meydana gelen veziküllerin birleşmesinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. 4-8 °C soğutulmuş sıcaklıkta niozomlarda tutulan siklosporin A miktarının 25 °C’den daha fazla miktarda olduğu bildirilmiştir (Rasul ve diğerleri, 2020).

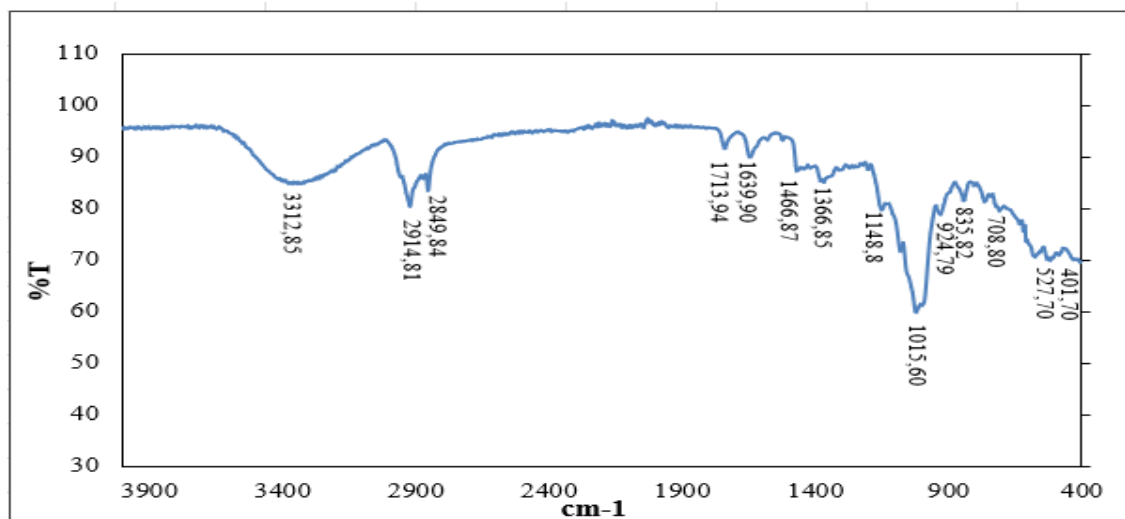
Solanum ksantokarpum ekstraktının niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada, depolama süresi boyunca (2 ay) ve 4°C’de stabilitesi ve niozomda herhangi bir ekstrakt kaybı olup olmadığı değerlendirilmiştir. İlk ayın sonunda, buzdolabı sıcaklığında enkapsülasyon etkinliği % 67,6 ve partikül boyutu 270,33 nm olarak, 2 ay sonra ise enkapsülasyon etkinliği % 61,71 ve partikül boyutu 273 nm olarak bulunmuştur ve ekstrakt yüklü niozomların soğutulmuş koşullar altında stabil olduğu sonucuna varılmıştır (Tyagi ve diğerleri, 2023). Letrozol (meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır) yüklü proniozomların, 4°C ve 25°C’de üç ay depolamaya tabi tutularak letrozol tutunma verimliliği açısından analiz edildiği çalışmada, proniozom tozlarının 4°C’de veya 25°C’de depolanmasının ilaç tutunma verimliliğini etkilediği, 25°C’de 4°C’ye kıyasla daha fazla ilaç sızıntısı olduğu belirtilmiştir (Khudair ve diğerleri, 2020). Ravaghi ve diğerleri (2017), kantaksantin yüklü proniozom tozlarının fiziksel stabilitesini iki farklı sıcaklıkta (4 ve 25 °C) incelemişler ve depolama sıcaklığı arttıkça kantaksantin geri kazanımının önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Propolis yüklü niozamol formülasyonun +4°C’de 1 ay stabilitesi incelenmiş, partikül boyutu PDI, zeta potansiyelin ve enkapsülasyon etkinliğinin önemli değişiklik göstermediği belirtilmiştir (Kietrungruang, ve diğerleri, 2023). Punicalagin niozomal yolla enkapsüle edilerek buzdolabı sıcaklığında stabilitesinin incelendiği çalışmada, punicalagin 2 aylık bir süreden sonra enkapsülasyon etkinliğinin % 65,66’ dan % 49,63’ e düşerek, yaklaşık %25 azaldığı rapor edilmiştir (Priya ve Singh 2012). Örnek yüklenmemiş lipozom ile zeytin yaprağı ekstraktı yüklü lipozomların 4°C’de 28 günlük

depolama süresince fiziksel stabilitesini araştırmak için partikül boyutu ve PDI değerleri değerlendirilmiştir. Depolama sırasında lipozomların 28 günde boyutlarının 101 nm'den 159 nm'ye kademeli şekilde arttığı ve benzer şekilde PDI değerinde de bir artış gözleendiği, bu artışın vezikül çökmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Prevete ve diğerleri, 2024). Başka bir çalışmada ise, *Pistacia atlantica* bitkisel ekstraktı niozomal yolla enkapsüle edimiş ve 4°C ve 25°C'de 90 gün stabilitesine bakılmıştır. 4°C'de, enkapsülleme verimliliği %90'dan %85'e düşerken, 25°C'de %90'dan %74'e düştüğü 4°C'nin stabilite için daha uygun bir sıcaklık olduğu belirtilmiştir (Al-Enazi, Alsamhary, Ameen ve Nobre, 2023).

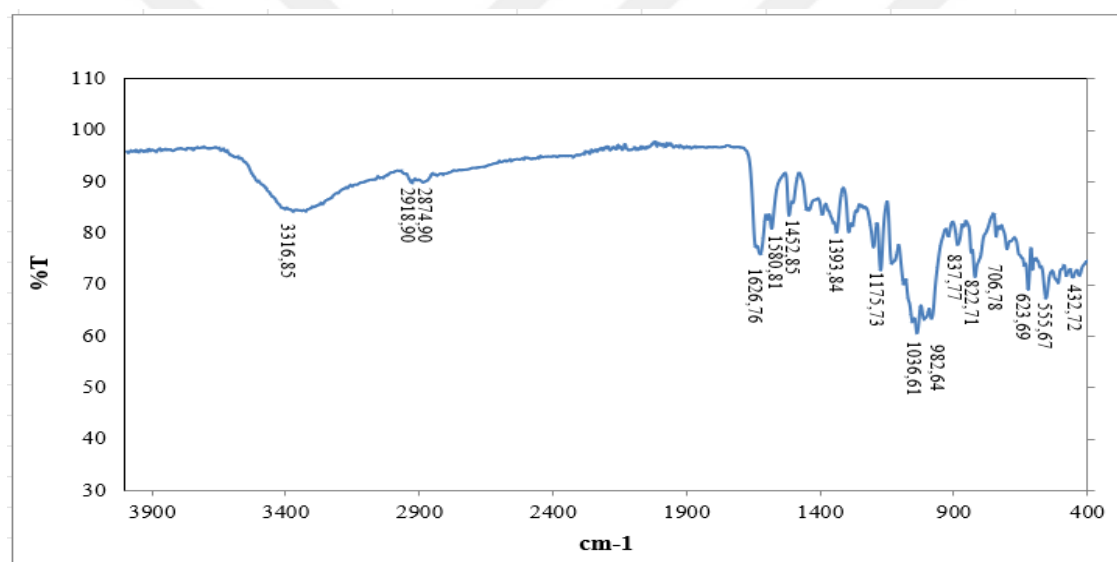
Depolama süresince partikül boyutunun < 300 nm ve PDI değerlerinin $PDI \leq 0.3$ aralığında olması partiküllerin nispeten homojen bir vezikül popölasyonu göstermiştir. Kolesterolün veziküler ilaç taşıyıcıları içindeki yararlı rolü, örneğin çift katmanların stabilitesini artırması ve geçirgenliğini azaltması yönündedir (Gregoriadis ve Davis, 1979; Papahadjopoulos, Jacobson, Nir ve Isac, 1973). Bu nedenle, lipit ile eşmolar oranda kolesterol kullanımının niozomların enkapsülasyon verimliliğini stabilize edebileceği açıkça desteklenmiştir. Ek olarak, çift katmanlardaki bu miktardaki kolesterolün sertleştirici etkisi, ilacın depolandığında sızmasını önleyebilmiştir (Nooprasit, 2000).

4.4. Naringin ve Proniozomal Naringinin FTIR Analizi

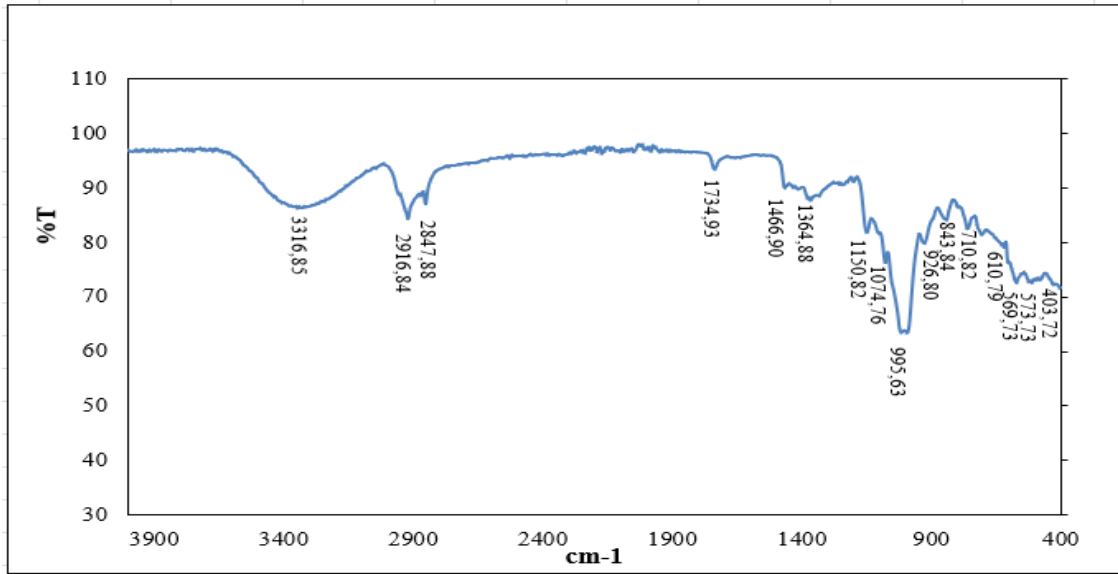
FTIR analizi, moleküllerin fonksiyonel gruplarını belirlemek ve bu gruplar arasındaki kimyasal bağların karakteristik dalga boylarındaki titreşimlerini incelemek için kullanılan bir tekniktir. Bu analiz, moleküler yapıyı ve bileşikler arasındaki kimyasal etkileşimleri anlamak açısından oldukça önemlidir. Proniozomal naringin, naringin ve kontrol örneklerinin FTIR spektral pikleri sırasıyla şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de görölmektedir.



Şekil 4.5. Proniozomal naringinin FTIR spektrumu



Şekil 4.6. Naringinin FTIR spektrumu



Şekil 4.7.Örnek yüklenmemiş proniozomun FTIR spektrumu

Naringin spektrumu incelendiğinde, flavonoid yapısındaki önemli fonksiyonel grupların karakteristik bantları belirgin şekilde görülmektedir. Bunlar genellikle hidroksil grupları için geniş bantlar ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), aromatik C-H gerilmeleri ($\sim 1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) ve C=O gerilmeleri ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) şeklinde görülmektedir. Bu bantlar, naringinin yapısındaki polifenolik halkaların varlığına işaret etmektedir (Hakim, Loka ve Prastiwi, 2019). IR spektrumu, hidroksi grubunun (OH) kayan titreşimi için $3316,85\text{ cm}^{-1}$ dalga numarası bölgesinde emilim bandı göstermiştir. $2914,81\text{ cm}^{-1}$ ve $2874,90\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu bölgesindeki emilim bantları, CH_3 'ün bir C-H grubudur. $1580,81\text{ cm}^{-1}$ dalga numarasındaki emilim bandı aromatik halkanın C=C bağıını gösterirken, $1452,85\text{ cm}^{-1}$ dalga bölgesindeki emilim bandı CH_2 'deki bir C-H bağı, $1393,84\text{ cm}^{-1}$ dalga numarasındaki emilim bandı ise CH_3 'ün C-H bağıdır. $1036,61\text{ cm}^{-1}$ emilim bandı ise eterin C-O-C bağıdır. Bu kızılötesi spektral verilerden, naringinin hidroksi grubu ($-\text{OH}$), aromatik halkalı gruplar (C=C), CH_2 , CH_3 ve eter grupları içerdiği tahmin edilebilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar naringin yapısında da mevcut olduğundan, izole edilen bileşiğin naringin bileşiği olduğuna dair yorum yapabilmek mümkündür. Çalışmada elde edilen pikler Hakim,

Loka ve Prastiwi'nin, (2019), *Citrus maxima*'dan naringin izolasyonu yaptıkları çalışma ile uyumludur. Literatürdeki naringinle ilgili başka çalışmalar incelendiğinde ise bu çalışma ile benzer spektrumlarda olduğu görülmektedir (Oliveira ve diğerleri 2024; Huang ve diğerleri 2024; Zheng ve diğerleri, 2024; Ghosal, Ghosh ve Das, 2018; Hussain, ve diğerleri, 2022; Gupta, Das, Sahu ve Mishra, 2022).

Literatürde, naringin gibi flavonoidlerin FTIR spektrumlarında belirgin OH gerilme bantları, C=O karbonil gerilme bantları ve aromatik halkalara ait bantlar yaygın olarak rapor edilmiştir. Proniozomal formülasyonlarda bu piklerin yer değiştirmesi veya şiddetinde azalma, naringinin kimyasal yapısının nano-taşıyıcı yapıya entegre olduğunu ve etkileşimler sonucu bazı fonksiyonel grupların çevresel koşullara karşı koruma altına alındığını gösterir. FTIR spektrumunda, proniozom içindeki naringinin karakteristik piklerinin bazı değişiklikler göstermesi beklenir. Proniozomların naringinin kimyasal yapısını stabilize etmek için kullanıldığından, naringin moleküllerinin fonksiyonel gruplarındaki bazı pikler proniozomlara entegre olduktan sonra farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklar, tipik olarak karbonil grupları (C=O), hidroksil grupları (OH), ve eter bağları (C-O-C) ile ilgili bantlarda görülmüştür.

Naringin yüklenmeyen proniozomun spektrumu, proniozom yapısındaki bileşenlerin (fosfolipitler, kolesterol gibi) karakteristik piklerini içermektedir. Bu pikler, fosfolipitlerin hidrokarbon zincirlerine ve kolesterolün steroid halkasına bağlı C-H gerilme pikleri şeklinde gözlemlenmiştir.

Proniozomal naringin, naringin ve naringin yüklenmeyen proniozomun FTIR spektral pikleri karşılaştırıldığında, 3312 cm^{-1} civarındaki pik OH gerginliği, sergilemektedir. 2900 cm^{-1} civarındaki pikler C-H gruplarının varlığını, 1650 cm^{-1} 'deki pikler C=O'nun varlığını ve 700 cm^{-1} civarındaki pikler C=C gruplarının varlığını sergilemektedir. 1000 cm^{-1} civarındaki pikler C-O fonksiyonel gruplarının varlığını sergilemektedir. Proniozomal naringin, naringin ve naringin yüklenmeyen proniozomun FTIR spektral verileri, naringinin başarılı şekilde enkapsüle edildiğinin ve veriler arasında önemli bir farklılık olmaması yapının korunduğunun göstergesi

olmakla birlikte formülasyonlarının bileşenleri olan kolesterol ve Span 60 arasında güçlü bir hidrojen bağı olduğunu göstermektedir. Ek olarak, $2914,81\text{ cm}^{-1}$ (asimetrik) ve $2849,84\text{ cm}^{-1}$ 'deki (simetrik) belirgin pikler, kolesterolün varlığına ve niozomlardaki Span 60'ın alifatik CH gerginlik fonksiyonel grubuna karşılık gelmektedir (Nasseri, 2005). Bu tez kapsamında elde edilen pikler, Krithika ve diğerleri'nin, (2023), naringinin karakterizasyonunu belirlemek için yaptıkları FTIR spektrumları ile uyumludur.

Sonuç olarak, FTIR analizleri, proniozomlar içerisindeki naringinin yapısında kimyasal değişiklikler olmadığını, ancak fiziksel formülasyon değişiklikleri ile etkileşimde olduğunu göstermektedir.

4.5. Naringin ve Proniozomal Naringinin Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Naringin (NRG) ve proniozomal naringin (PNRG3) örneklerinin antioksidan kapasitesini değerlendirmek amacıyla 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) testleri olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır (Kelebek ve diğerleri 2017; Brand-Williams, Cuvelier, ve Berset, 1995).

NRG, DPPH ve ABTS antioksidan aktiviteleri sırasıyla, $7806,14 \pm 0,72$, $11741,77 \pm 0,76$ $\mu\text{mol}/100\text{g}$ KM olarak belirlenmiştir. Literatürde, naringinin etkili bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Rajadurai ve Prince, 2007). Naringin molekülünün 1 mM ve 3 mM olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda DPPH analizi ile antioksidan kapasitesinin bakıldığı çalışmada, sırasıyla %60,29 ve %75,32 inhibisyon sağladığı belirlenmiştir (Zochedh, Chandran, Priya, Sultan, Kathiresan, 2023). Yapılan başka bir çalışmada ise naringinin DPPH ve ABTS analizleri ile antioksidan kapasitesi değerlendirilmiş ve sırasıyla 21,14 ve 26,67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IC50 olarak saptanmıştır (Ahmad ve diğerleri, 2024). Pickering emülsiyonu ile enkapsüle edilen naringinin (PP-NG) antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği çalışmada, PP-NG emülsiyonunun farklı naringin konsantrasyonlarındaki DPPH süpürme yeteneğine bakılmıştır. 10 mM naringinde %22,25 dikkate değer bir süpürme oranı saptanmış, konsantrasyona bağlı önemli artışlar

gözenmiştir. Naringinin, tekil hidroksil grubuna ve B halkasındaki bir C2-C3 tek bağına atfedilen doğal reaktivite sınırlamaları belirgin bulunmuş ve DPPH serbest radikallerinin %50'den fazlasının süpürülmesi için 25 mM naringin gibi yüksek konsantrasyonların gerekli olduğu, benzer şekilde ABTS analizinde 5 mmol/L'lik bir naringin konsantrasyonunda %47,96'lık dikkate değer bir süpürme oranı rapor edilmiştir (Huang ve diğerleri, 2024). Naringinin poli(metilmetakrilat) (PMMA) ile enkapsüle edildiği çalışmada, naringinin antioksidan kapasitesinin nanopartikül formlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır (Secerli ve diğerleri 2023). Maqsoodlou, Assadpour, Mohebodini ve Jafari, (2022), nanoenkapsülasyonun bazı flavonoidlerin antioksidan etkinliğinde azalmaya yol açabileceğini, ancak biyoyararlanım ve taşıma kapasitesini artırdığını bildirmişlerdir. Berberin ve berberin nanopartiküllerinin DPPH yöntemi ile antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada, berberinin antioksidan kapasitesinin nanopartikül formlarından daha yüksek olduğu, ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (Stoyanova ve diğerleri, 2020). Naringin ve naringin nanopartiküllerinin DPPH ve trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) yöntemleri kullanılarak antioksidan kapasitesini araştırılan bir çalışmada, naringin ve naringin nanopartiküllerinin artan konsantrasyona bağlı olarak antioksidan kapasitesinin arttığı bildirilmiştir (Liang, Hou, Ni, Cao ve Cai, 2022).

Tablo 4.9. Naringin ve proniozomal naringinin antioksidan kapasite analiz sonuçları

Örnek adı	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{g KM}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{g KM}$)
NRG	7806,14 $\pm$ 0,72	11741,77 $\pm$ 0,76
KONTROL	58,50 $\pm$ 0,03	90,20 $\pm$ 0,07
PNRG3	552,16 $\pm$ 0,29	973,75 $\pm$ 0,40

NRG:Naringin, **PNRG3:**Proniozomal Naringin, **KONTROL:**Naringin yüklenmemiş niozom

Tablo 4.9'da görüldüğü üzere serbest naringinin (NRG) antioksidan aktivitesi 2 yöntemde de PNRG3'ten yüksek bulunmuştur. Bu sonuç proniozomların serbest radikal süpürme kapasitesini kısmen engellediğini ancak PNRG3'ün de antioksidan potansiyeli olduğunu göstermektedir. Azalmadaki sebebin, flavonoidlerin enkapsülasyon sonrası serbest radikallerle

daha az etkileşime girebilmelerinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Enkapsülasyonla birlikte bir azalış olması, kapsülleme nedeniyle niozomların naringine verdiği koruyucu veya kalkanlama etkisine bağlanabilmektedir. Benzer gözlemler Feng, Lin, Wang ve Liu (2017), tarafından da yapılmış olup, dodecyl gemini O-glukozit veziküllerinde kapsüllenmiş (+)-kateşin ve (-)-epigallokateşinlauratın antioksidan kapasitesinin, kapsüllenmeyen örneklerle kıyasla daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Krithika ve diğerleri (2023), niozomal naringinin antioksidan kapasitesini inceledikleri çalışmada ise niozomal naringinin DPPH ve ABTS analiz sonuçlarını sırasıyla, 97,89 µg/mL IC50 ve 50,6 µg/mL IC50 olarak belirtmişlerdir. Bu bulgular, naringinin antioksidan aktivitesinin niozomlar içine kapsüllendikten sonra bile korunduğunu doğrulamaktadır. Başka bir çalışmada ise naringinin IC50 değeri 337,31 µg/mL, naringin yüklü propozomların IC50 değeri ise 201,86 µg/mL olarak belirlenmiş, naringin konsantrasyonunun antioksidan özelliği önemli ölçüde etkilediği rapor edilmiştir (Kumari ve diğerleri, 2022). Ferreira ve diğerleri (2016), ham palmiye yağının DPPH radikal inhibitör yeteneğinin kapsülleme ile önemli derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, Shruthi ve diğerleri (2021), kateşin yüklü maltodekstrin ve laktoz bazlı proniozomların antioksidan aktivitesinde saf kateşinler ile kateşin yüklü proniozomlar arasında önemli bir fark olmamakla birlikte bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Resveratrol'ün Span 60 niozomları ve setil alkol içine kapsüllendikten sonra antioksidan potansiyelini koruduğu, Vankayala ve diğerleri (2018), tarafından yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. *Solanum ksantokarpum* ekstraktının niozomal yolla enkapsüle edildiği çalışmada ise *Solanum ksantokarpum* yüklü niozomun antioksidan kapasitesi %89,46 *Solanum ksantokarpum* ekstraktının antioksidan kapasitesi ise %78,10 olarak bulunmuştur (Tyagi ve diğerleri, 2023). Hesperetin ve hesperetin yüklü propozomların antioksidan kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmada, IC50 değerleriyle sırasıyla, 82,15 µg/mL ve 88,07 µg/mL olarak bulunmuştur (Vaz, Jitta, Verma ve Kumar, 2021). Isnan ve Jufri (2017), niozomal formülasyonla enkapsüle edilen yeşil çay ekstraktının, serbest formuna göre daha düşük antioksidan kapasite gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durumun, metanolde çözündüğünde lipid-ekstrakt komplekslerinin varlığına bağlı olarak

ekstrakttaki serbest aktif madde miktarının azalmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bir başka çalışmada ise *Plumbago zeylanica* özütü yüklü niozomal formülasyonların, serbest *Plumbago zeylanica* özütüne kıyasla güçlü antioksidan aktivite sergilediği belirtilmiştir (Tyagi ve diğerleri, 2023). Antioksidan aktivite analizleri, proniozom türevi niozomların iyi bir serbest radikal tutucular olduğunu göstermiştir.

4.6. Naringin ve Proniozomal Naringinin Toplam Fenolik Madde Yönünden Değerlendirilmesi

NRG ve PNRG3 örnekleri toplam fenolik madde içerikleri bakımından sırasıyla, 26124,82 ve 1663,25 mg/100g KM olarak bulunmuştur. Tablo 4.10'da görüldüğü üzere, proniozomal naringin formülasyonu, saf naringine kıyasla daha düşük bir fenolik madde içeriği göstermektedir. Sonuçlar, antioksidan kapasitedeki azalışa benzer şekilde nanoformülasyonların biyoaktif bileşiklerin stabilitesini ve biyoerişilebilirliğini artırabileceğini, ancak fenolik madde içeriğinde azalmaya neden olabileceğini düşündürmüştür.

Tablo 4.10. Naringin ve proniozomal naringinin toplam fenolik madde analiz sonuçları

Örnek adı	TFM (mg/100g KM)
NRG	26124,82±0,9
KONTROL	50,98±0,00
PNRG3	1663,25±0,07

NRG:Naringin, PNRG3:Proniozomal Naringin, KONTROL:Naringin yüklenmeyen boş proniozom

4.7. Antimikrobiyal Aktivitenin ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK)

Naringin ve naringin yüklü proniozomların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon testi uygulanarak belirlenmiştir. *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Naringin ekstraktı *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* karşı herhangi bir etki göstermezken, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiş ve elde edilen inhibisyon zon çapları sırasıyla, $13,05 \pm 0,46$, $10,73 \pm 0,19$ ve $11,01 \pm 0,24$ mm olarak belirlenmiştir (Tablo 4.11). Naringin yüklü proniozom ve kontrol proniozom (örnek yüklenmeyen), gram pozitif (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*) karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Tablo 4.11. Naringin ve naringin yüklü proniozomun bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapı)

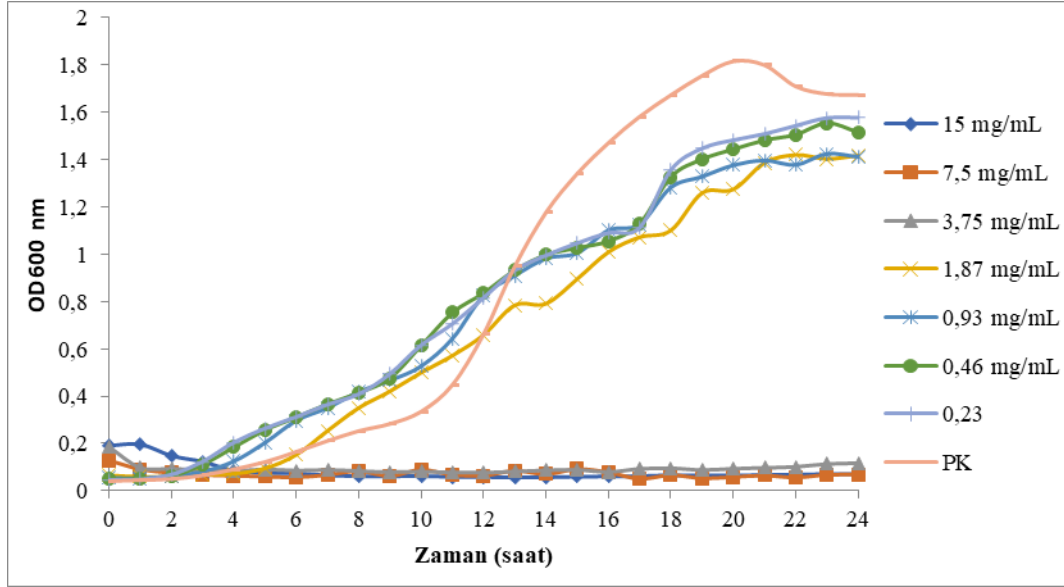
İnhibisyon zon çapı (mm)			
Mikroorganizmalar	NRG	PNRG3	KONTROL
<i>S. aureus</i>	$13,05 \pm 0,46$	İG	İG
<i>E. coli</i>	$10,73 \pm 0,19$	İG	İG
<i>B. subtilis</i>	İG	İG	İG
<i>P. aeruginosa</i>	$11,01 \pm 0,24$	İG	İG
<i>K. pneumoniae</i>	İG	İG	İG

NRG:Naringin, **PNRG3:**Proniozomal Naringin, **KONTROL:**Naringin yüklenmeyen boş proniozom

İG: İnhibisyon gözlemlenmedi.

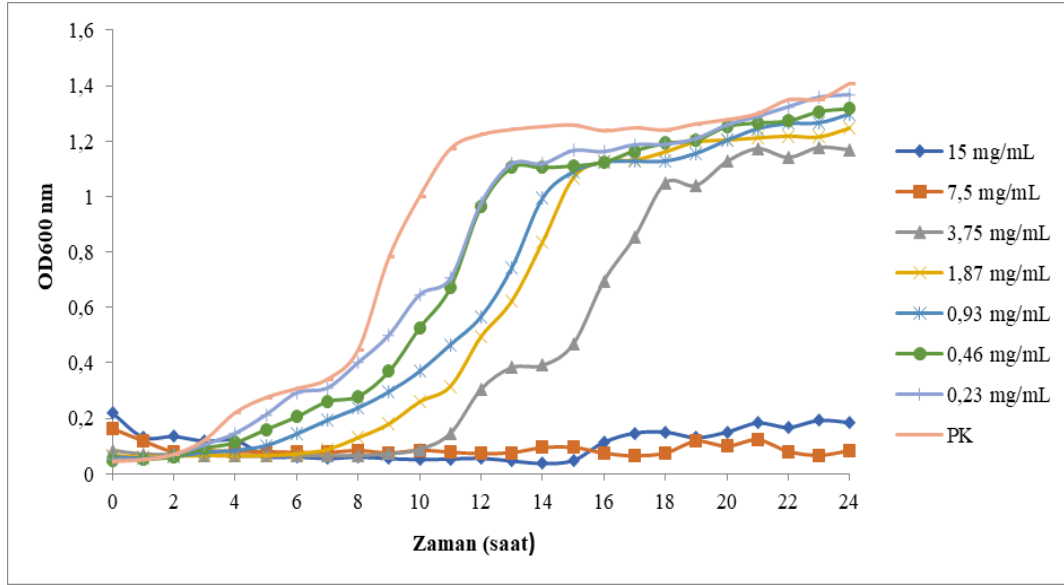
S. aureus, *E. coli*, ve *P. aeruginosa*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösteren naringin örneğinin bakterilerin büyümesini inhibe etmek için gerekli olan en düşük konsantrasyonu için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinden yararlanılmıştır. Örneğin antimikrobiyal etkisi inkübasyon süresince belirli aralıklarla (0- 24 saat) izlenmiş ve MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Analizlerde naringin örneği için için iki katlı dilüsyon halinde hazırlanan $15-0,23$ mg/mL konsantrasyon aralığı çalışılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda naringinin *S. aureus* üzerine olan etkisi Şekil 4.8’de verilmiştir. 15-3,75 mg/mL konsantrasyon aralığındaki naringinin inkübasyon süresince *S. aureus*’un gelişimini engellediği belirlenmiştir. Bu yüzden *S. aureus*’un gelişimini engelleyen en düşük MİK değeri 3,75 mg/mL olarak belirlenmiştir.



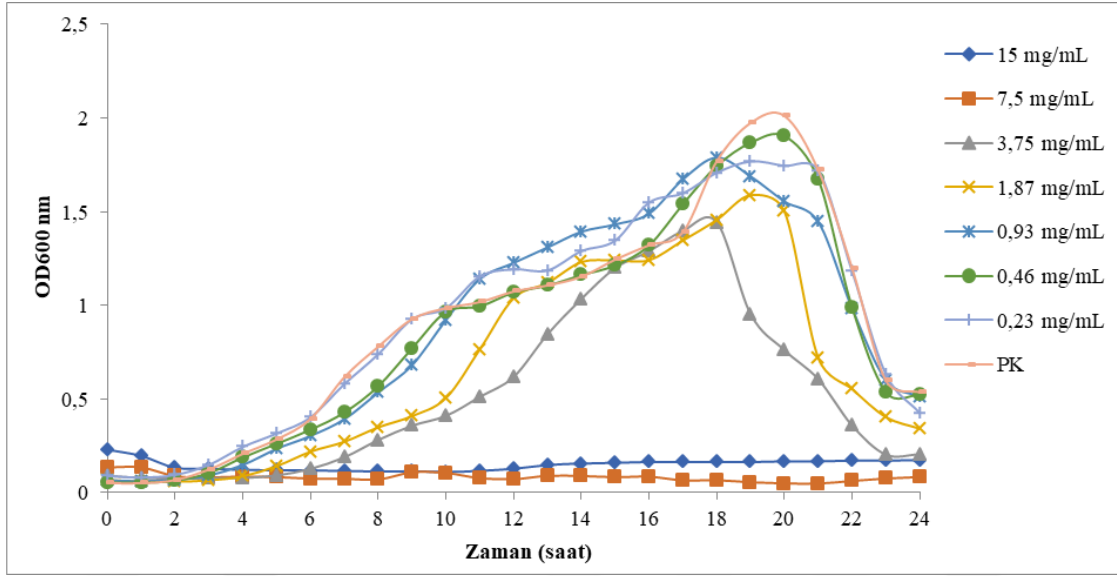
Şekil 4.8. Naringinin *S. aureus*’a karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK).

Naringinin *E. coli* üzerine olan etkisi ise Şekil 4.9’da verilmiştir. Optik yoğunluğa göre belirlenen değerler incelendiğinde 15-7,5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki naringinin inkübasyon süresince *E.coli*’nin gelişimini engellediği belirlenmiştir. 8-20 saat süresince pozitif kontrolün gelişimi ile karşılaştırarak incelendiğinde, daha düşük ekstrakt konsantrasyonlarında bakteri gelişiminin devam ettiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; naringinin *E.coli* üzerine belirlenen MİK değeri 7,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Naringinin *E. coli*'ye karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)

Naringinin farklı konsantrasyonlarının *P. aeruginosa* üzerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.10) 24 saat inkübasyon süresinin sonunda 15 ve 7,5 mg/mL konsantrasyonlarının *P. aeruginosa* gelişimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (3,75- 0,23 mg/mL) ise; bakterinin gelişiminin 6-18 saat inkübasyon süresince, ekstrakt konsantrasyonu azaldıkça devam ettiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; naringinin *P. aeruginosa* üzerine belirlenen MİK değeri 7,5 mg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Naringinin *P. aeruginosa* karşı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK).

Naringin örneğinin test mikroorganizmaları arasında *S. aureus* üzerinde daha yüksek inhibisyon zon çapı ve daha düşük MİK değeri ile daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemine göre belirlenen MİK değerlerine göre; Gram (+) türlerin, Gram (-) türlere göre naringin bileşiğine karşı daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Naringin, farklı bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal etkisinin incelendiği çalışmada, *S. auerus*, *B. subtilis* *M. luteus*, *E. coli*, *S.typhi* ve *K. pneumoniae* mikroorganizmalarına karşı zon çapları sırasıyla 22,2, 20,5, 21,1, 19,3, 18,6 ve 17,2 mm olarak bulunmuş ve çalışmada kullanılan tüm suşlara karşı 6,25 µg/mL'lik MİK gösterdiği rapor edilmiştir. MİK 'in, bakteri hücresinin içine bileşiklerin nüfuz etmesini engelleyen ve dolayısıyla geçirgenlik bariyerleri görevi gören kapsülün varlığı nedeniyle gram negatif bakterilere karşı yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Ahmad ve diğerleri, 2024). Bu tez kapsamında ise, *B. subtilis*, *K. Pneumoniae* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Naringin ve naringin türevlerinin antimikrobiyal etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise, naringinin

antimikrobiyal etkisi gözlenmemiş fakat alkil prunin esterlerinin yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Celiz, Daz ve Audisio, 2011). Bu durumu ise, genel olarak lipofilik gruplar eklendiğinde çeşitli bileşiklerin mikrobiyal aktivitesinde bir iyileşme olduğu, hidrofobik grupların bağışçısı olarak kullanılabilen yağ asitlerinin farklı bakterilere karşı başlı başına inhibitör özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir (Nieman 1954). Sitoplazmik membranın, mekanizmadan bağımsız olarak, yağ asitlerinin inhibisyon üretmek için ilk önce etkileşime girmesi gereken yer olduğu bilinmektedir (Desbois ve Smith, 2010). Gram-negatif bakterilerin dış membranı bir yağ asidi bariyeri gibi davranırken, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yağ asitlerinin iç membrana doğru dolaşımına izin vermektedir (Galbraith ve Miller 1973; Sheu ve Freese 1973). Bu çalışma, gram pozitif patojenik bakterilere karşı önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip naringin türevlerinin elde edilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bu tez kapsamında ise naringinin gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a, gram negatif bakterilerden ise *E. coli*, ve *P. aeruginosa*'e karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir.

Flavonoidlerin dış plağında bulunan mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, naringinin *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Lactobacillus casei*'yi ve mantarlardan *Candida albicans*'ı inhibe ettiği belirtilmiştir (Gutiérrez-Venegas, Gómez-Mora, Meraz-Rodríguez, Flores-Sánchez ve Ortiz-Miranda, 2019).

Naringinin ve lipid, kitosan ve D- α - tokoferil polietilen glikol ile enkapsüle edilen naringinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı MİK değerleri ve antibakteriyel etkisinin incelendiği çalışmada sırasıyla, naringin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MİK değerleri gösterirken, enkapsüle naringin için MİK değerleri 20 ve 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur. MİK değerindeki bu önemli azalmanın nanopartiküllerin boyutundan, salım süresinin uzamasından ve hücre duvarı boyunca artan geçirgenliklerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı zon çapları sırasıyla, naringin 16,8 mm ve 14,2 mm iken, enkapsüle naringin ise 24,1 ve 22,9 mm zon

çapıyla artış göstermiştir. Antibakteriyel çalışma sonuçları, naringinin *E. coli*'nin (Gram-negatif) *S. aureus*'a (Gram-pozitif) kıyasla daha fazla aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Naringinin kitooligosakkarit kompleksiyle enkapsüle edildiği çalışmada ise enkapsüle edilen naringinin, naringine kıyasla daha güçlü antioksidan kapasiteye ve daha güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Cao, Li, Zhou ve Zhao, 2021). Bu tez kapsamında ise proniozomal yolla enkapsüle edilen naringinde antimikrobiyal etki gözlenmezken, naringin kristalinde antimikrobiyal etki gözlenmiş, *S. aureus* (Gram-pozitif), *E. coli*'ye (Gram-negatif) göre daha yüksek bulunmuştur. Bu farkın naringinin konsantrasyonu, enkapsülasyonun çeşidi, partikül boyutu, kullanılan duvar malzemesinin farklılığı gibi birçok unsura bağlı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin nanopartiküllerde kitosanın varlığı da antibakteriyel aktiviteyi destekler. Negatif yüklü bakteri hücre duvarına bağlanarak, zar geçirgenliğini değiştirerek, DNA replikasyonunu engeller ve hücre ölümüne yol açarak etki etmiş olur (Nagy ve diğerleri, 2011). Kitosanın naringin ile kombinasyonunun, test edilen organizmalara karşı sinerjik etki göstererek vezikülleri ideal iletim sistemleri haline getirdiği belirtilmiştir (Imam ve diğerleri, 2022).

Naringinin ve niozomal naringinin antifungal aktivitesinin incelendiği çalışmada, naringinin *T. mentagrophytes*'e karşı 50 µg/mL'lik bir MİK ile güçlü bir antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Çalışma, naringinin mantar metabolizmasında ve virülansında önemli bir rol oynayan (Suliman, Appling ve Robertus, (2007); Scott, ve Amich, 2023), metionin sentazı hedef alan potansiyel bir antifungal ajan olarak keşfini araştırmıştır. Naringinin bu enzimi inhibe ederek, *Candida albicans* (Scott ve diğerleri, 2020; Prasannan, Suliman ve Robertus, 2009; Suliman, Appling ve Robertus, 2007) ve *Aspergillus fumigatus* (Amich ve diğerleri, 2016) gibi mantarlarda hücre enerjisini, büyümesini ve virülansını bozan metabolik bir dengesizliğe yol açtığı, naringinin metiyonin sentaza karşı silico inhibe edici aktivitesinin, bu temel enzimi hedef alarak ve mantarın hayatta kalması ve patojenitesi için kritik olan kükürt asimilasyon yollarını bozmak suretiyle bir antifungal ajan olarak potansiyeli olduğu

bildirilmiştir (Michalik, Bauer, Szklarzewicz ve Kaltenpoth, 2023; Wheatley, Ng ve Kapoor, 2016). Bu bulgu, naringinin yalnızca bir antifungal olarak değil aynı zamanda çeşitli terapötik özelliklere sahip bir ajan olarak farmakolojik potansiyelini vurgulayan diğer araştırmaları desteklemektedir (Özçelik, Kartal ve Orhan, 2011; Kim ve Lee, 2021). Niosomal naringin jelin antifungal aktivitesi incelendiğinde ise, niosomal jelin inhibisyon bölgesinin (4,6 cm) 4 günlük inkübasyondan sonra standart olarak kullanılan terbinafin jelinden (mantar merhemi) (4,3 cm) daha büyük olduğu ve geliştirilen formülasyonun üstün antifungal etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Jain, Patel ve Navale, 2024). Naringinin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin incelendiği çalışmada ise, naringinin gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* ve gram negatif bakteri *Klebsiella oxytoca*'ya karşı sırasıyla 23,9 ve 22,3 mm zon çapları ile inhibitör potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Zochedh ve diğerleri, 2023). Yapılan başka bir çalışmada, naringinin antibakteriyel aktivitesi *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *P.aeruginosa*, *M.catarrhalis* ve *H.influenzae* bakteri suşlarına karşı 6,25–100 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Sonuçlar naringinin test edilen tüm bakterilere karşı orta düzeyde aktivite gösterdiğini ve aktivitesinin örnek konsantrasyonlarındaki azalmaya göre kademeli olarak azaldığını göstermiştir. İnhibisyon bölgelerinin en yüksek test konsantrasyonu olan 100 mM'de 10–15 mm aralığında olduğu, *S.aureus* suşu için ise en büyük inhibisyonun 15 mm olduğu belirlenmiştir. Veriler, naringinin *S.aureus*, *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* suşlarına karşı MIC değerlerinin (6,25 mM), *S.pyogenes*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis* için MİK değerinden (25 mM) çok daha düşük olduğunu göstermiştir ve aynı çalışmada antifungal aktivite de incelenerek naringinin 100 mM konsantrasyonunda tüm test mantarlarına (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*) karşı iyi etki gösterdiği ve inhibisyon bölgelerinin 18-21 mm aralığında olduğu belirtilmiştir (Mai ve diğerleri, 2022). Bakteriler arasındaki farklılığın, membran ve hücre duvarı yapısı arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülmüştür (Andrade-Ochoa ve diğerleri 2021). Bu tez kapsamında da en yüksek zon çapı 13,05 mm ve en düşük MİK değeri 3,75 mg/ml olarak *S.aureus* bakteri suşunda tespit edilmiştir. Başka bir

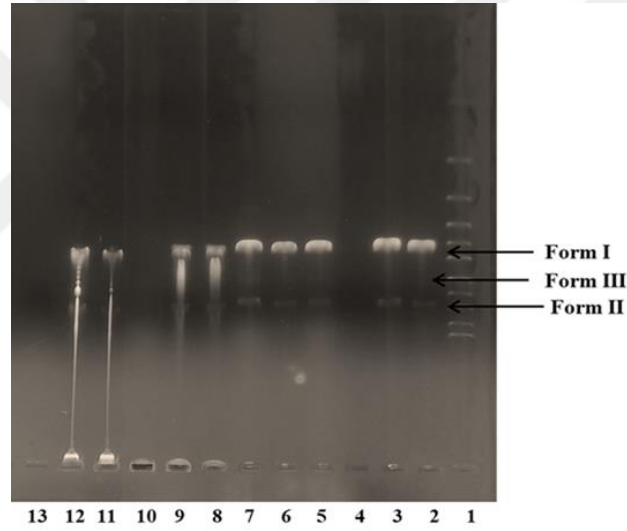
çalışmada ise yüksek konsantrasyonda bile naringinin antibakteriyel etki göstermediği belirtilmiştir (Mohamed ve diğerleri 2024). Öte yandan, naringinin antibiyofilm etkisinin incelendiği çalışmada, *P. aeruginosa*'a karşı MİK değeri 0,9 mg/mL olarak belirlenmiştir (Dey ve diğerleri, 2020). Bu tez kapsamında ise *P. aeruginosa*'a karşı MİK değeri 7,5 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Tsui, Wong ve Rabie (2008), naringinin periodontal (diş eti) patojenlerin *in vitro* büyümesi üzerindeki inhibitör etkilerini araştırdıkları çalışmada, *E.coli*, *S.aureus*, *P. aeruginosa* MİK değerleri sırasıyla, 31,25, 31,25 ve 125 mg/mL olarak bulunmuşken bu çalışmada mikroorganizmaların daha düşük MİK değerlerinde olması (7,5, 3,75 ve 7,5 mg/ml) antimikrobiyal etkiyi daha yüksek bulduğunu göstermektedir.

4.8. DNA Koruyucu Etkinin Belirlenmesi

Bu tez kapsamında naringin (NRG), naringin yüklü proniozom (PNRG3) ve KONTROL proniozomunun (naringin yüklenmemiş boş proniozom) H₂O₂'nin UV fotolizinin neden olduğu pBR322 plazmid DNA' daki hasarına karşı DNA koruyucu etkileri agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Agaroz jel üzerindeki bant görüntülerinden örneklerin DNA hasarı üzerine koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Örneklerin DNA hasarına karşı koruyucu özelliği Şekil 4.11'de gösterilmiştir. pBR322 plazmid DNA'sı orijinal süper sarmal formu (Supercoiled) (Form I), tek zincir kırığı içeren açık dairesel form (open circular) (Form II) ve daha fazla kırıkla doğrusal formdan (linear) (Form III) oluşmaktadır. DNA jel elektroforezinde, Form I jelde diğerlerinden daha hızlı ilerlerken, Form II daha yavaş hareket eder ve Form III, Form I ve Form II arasında hareket etmektedir (Yayintas ve Demir, 2021). pBR322 plazmid DNA'sı DNA, agaroz jel elektroforezinde (kuyucuk 2) iki bant göstermiştir. Tek başına H₂O₂ (kuyucuk 3) DNA'da herhangi bir hasara neden olmamıştır. DNA, H₂O₂ varlığında UV'ye maruz bırakıldığında (kuyucuk 4), DNA'nın yapısının tamamen hasara uğradığı görülmüştür. Bu durum, H₂O₂'nin UV-fotolizinden üretilen OH•'in DNA'nın doğal formunda kırılmalara neden olması şeklinde yorumlanmıştır. UV varlığında H₂O₂'ye maruz kalan DNA'ya NRG'nin eklendiği kuyucuk 7, NRG ilave edilmeyen örnek ile karşılaştırıldığında (kuyucuk 4) plazmid

DNA üzerinde H_2O_2 'nin UV-fotolizinden üretilen $OH^\bullet$ radikalinin hasarına karşı agaroz jel üzerinde gözlemlenen orijinal süper sarmal formu (form II) ve doğrusal formda (form III) koruduğu gözlemlenmiştir. PNRG3 ve KONTROL örneklerinin eklendiği kuyucuk 10 ve kuyucuk 13, örnek eklenmeyen kuyucuk 4 ile karşılaştırıldığında, UV varlığında H_2O_2 'ye maruz kalan DNA'nın süper sarmallı dairesel formunun korunmasında herhangi bir koruyucu etki göstermemişlerdir.

NRG'nin, PNRG3 ve KONTROL proniozomlara göre daha önce belirlenen yüksek antioksidan kapasitesi daha iyi bir koruyucu aktivite göstermesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, proniozom ile enkapsüle edilen naringinin gösteremediği koruyucu etki, enkapsüle edilen naringinin salım hızının yavaş olabileceği ve oksidatif hasar oluştuğunda yeterli konsantrasyona sahip olamarak koruyucu etkinliğinin azalmasına neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 4.11. Örneklerin H_2O_2 'nin fotolizi tarafından üretilen $OH^\bullet$ 'ye karşı plazmid DNA'nın korunması üzerindeki etkilerinin jel görüntüleri. **1:** Marker, **2:** Plazmid DNA, **3:** Plazmid DNA+ H_2O_2 , **4:** Plazmid DNA+ H_2O_2 + UV, **5:** NRG+ Plazmid DNA+ H_2O_2 , **6:** NRG+ Plazmid DNA+ UV, **7:** NRG+ Plazmid DNA+ H_2O_2 + UV, **8:** PNRG3+Plazmid DNA+ H_2O_2 , **9:** PNRG3+Plazmid DNA+ UV, **10:** PNRG3+Plazmid DNA+ UV+ H_2O_2 , **11:** Kontrol+ Plazmid DNA+ H_2O_2 , **12:** Kontrol+ Plazmid DNA+ UV, **13:** Kontrol+ Plazmid DNA+ H_2O_2 + UV.

Naringin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indükleyen polifenolik yapıya sahip bir flavonoiddir. Naringinin polifenol grubu, belirli koşullar altında reaktif oksijen üretimini indükleyerek antibakteriyel aktivite gösterir (Brudzynski ve Maldonado-Alvarez, 2015; Celiz, Daz ve Audisio, 2011). Naringinin antibakteriyel etki mekanizmasının incelendiği çalışmada, naringinin *E.coli*'de ciddi oksidatif strese neden olduğu, ROS oluşturarak glutatyon tükenmesi ve lipid peroksidasyonu yol açtığı belirtilmiştir (Han ve Lee, 2022).

Bazı reaktifler ve ilaçlar (örneğin, H_2O_2 ve lomefloksasin) çözülmediği takdirde genetik mutasyonlara ve/veya genomik instabiliteye yol açabilen DNA hasarına neden olur (Lewinska, Siwak, Rzeszutek ve Wnuk, 2015). V79 hücresi, X-ışını, UV radyasyonu ve oksitleyici ajan kaynaklı DNA hasarı ve DNA onarımı üzerine yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan hücrelerdir. Naringin V79 hücrelerinde antioksidan özelliklere sahiptir ve H_2O_2 kaynaklı kromozom kırılması ve kaybına, DNA hasarına karşı koruma sağlar. Naringin, yalnızca DNA hasarını azaltarak değil, aynı zamanda DNA onarım kapasitesini artırarak da H_2O_2 kaynaklı oksidatif hasarı önleyebilmektedir (Bacanlı, ve diğerleri, 2015).

Naringinin farelerde lomefloksasin kaynaklı genomik instabiliteyi azalttığı ve naringinin kemik iliğinde hücre çoğalmasını, kromozomal sapmaları ve mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde azalttığı, mitoz bölünmeyi arttırdığı belirtilmiştir (Attia 2008). Erkek Wistar sıçanlarında naringinin oksidatif araçların üretimini düzenlediği ve enflamatuvar bağırsak hastalığının semptomlarını hafifletmek için DNA hasarını azalttığı belirtilmiştir (Kumar ve diğerleri 2014). Diyabetik sıçanlarda naringinin 4 hafta boyunca uygulanması DNA iplik kopma oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Naringinin anti-genotoksik etkisi hiperglisemi kaynaklı serbest radikal oluşumunun inhibisyonu ile sağlanmaktadır (Bakheet ve Attia 2011). Naringin, oksidatif mediatörlerin ekspresyonunu ve serbest radikallerin oluşumunu düzenleyerek anti-genotoksik aktiviteler göstererek DNA hasarını azaltmaktadır (Chen, Qi, Wang ve Li, 2016).

Naringin ve naringin kapsüllü poli(metilmetakrilat) nanopartiküllerinin NIH/3 T3 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki genotoksik etkilerini incelemek için alkali Comet (Tek jel elektroforezi) testinin kullanıldığı çalışmada, negatif kontrole kıyasla naringin ve enkapsüle naringinin düşük dozlarda NIH/3 T3 ve Caco-2 hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığı, naringin konsantrasyonlarının artmasıyla DNA hasarının gerçekleştiği bildirilmiştir (Secerli ve diğerleri 2023).

4.9. *In Vitro* Sindirim

Fenolik bileşiklerin, doğal bileşiklerin en büyük gruplarından biri olduğu ve yapısal çeşitlilikleriyle ilgili olarak çok çeşitli biyolojik aktivitelere (antioksidatif, anti-enflamatuar, anti-alerjenik, antiviral, antikanser, antimikrobiyal, antimutajenik ve kardiyoprotektif, vb.) sahip olduğu bilinmektedir (Bucić-Kojić ve diğerleri, 2020). Son yıllarda yapılan araştırmalar öncelikli olarak çeşitli bitki materyallerinden fenolik bileşik profilinin belirlenmesine, biyolojik aktiviteleri için yapılan çalışmalara, fenolik bileşikler için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesine odaklanmıştır. (Acero, Gradillas, Beltran, García, ve Mingarro, 2019; Araujo ve diğerleri, 2020). Fenolik bileşiklerdeki potansiyelin bu denli güçlü olması insan vücudunda nasıl metabolize edildiği ve biyoyararlanımının nasıl sağlandığı konularını gündeme getirmiştir.

Biyoyararlanım, biyoerişilebilirlik ve biyoaktivite sıklıkla karıştırılmakla birlikte farklı anlamlara sahip terimlerdir. Genel anlamda biyoyararlanım, biyoerişilebilirlik ve biyoaktiviteyi (sindirim, emilim, metabolizma, dokuya dağılım, potansiyel biyotransformasyon ve insan vücudunun fizyolojik tepkisi) kapsayan bir terimdir. Gıdadan kaynaklanan aktif maddelerin biyoyararlanımı, aktif maddenin epitel hücreleri aracılığıyla emilim oranı ve derecesi olarak tanımlanabilmektedir. Ancak, gıda ürünlerindeki fenolik bileşikler gibi belirli biyoaktif maddelerin gerçek biyoyararlanım tayini, pratik olmaması ve araştırmalardaki etik sorunlar nedeniyle karmaşıktır. Bu nedenle, bu alandaki araştırmaların çoğu, gıdadan sindirim sistemine salınan ve potansiyel olarak emilebilen veya biyoyararlanılabilen aktif bileşiğin içeriği olarak

tanımlanan biyoerişilebilirliğe odaklanmıştır (Carbonell Capella, Buniowska, Barba, Esteve, ve Frígola, 2014; Quirós-Sauceda ve diğerleri, 2014). Biyoerişilebilirlik, farklı formülasyonların fenolik bileşiklerinin biyoaktivitesinin bağlı olduğu temel faktördür. Biyoerişilebilirlik en yaygın olarak *in vitro* sistemde simüle edilmiş gastrointestinal sistemde sindirim süreçleri yoluyla değerlendirilmektedir (Carbonell Capella, Buniowska, Barba, Esteve ve Frígola, 2014). Fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliği bileşiğin kimyasal yapısına, glikozilasyon, asilasyon, diğer fenolik bileşiklerle konjugasyon derecesine, polimerizasyon derecesine ve çözünürlüğe bağlıdır (Quirós-Sauceda ve diğerleri, 2014).

In vitro koşullar aracılığıyla belirlenen fenolik bileşiklerin biyoaktivitesi, *in vivo* koşullar tarafından belirlenen biyoaktiviteden önemli ölçüde farklı olabilmekte ve bu, sindirim sistemindeki belirli fenolik bileşiklerin daha düşük biyoerişilebilirliği olduğu şeklinde yorumlanabilmektedir (Carbonell Capella, Buniowska, Barba, Esteve, ve Frígola, 2014).

Naringin, proniozomal naringin ve kontrol örnekleri *in vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modeli ile biyoerişilebilirlik analizi Brodkorb ve diğerlerinin (2019), çalışmasında birtakım modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. *In vitro* sindirim sonucunda örnekler toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite açısından analiz edilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, simüle edilmiş *in vitro* sindirim sonrasında TFM, ABTS ve DPPH sonuçlarında artış gözlenmiştir (Tablo 4.12). Naringinin (NRG), ağız, mide ve bağırsak aşamaları toplam fenolik madde miktarı ağıza kıyasla midede yaklaşık 1,4 kat, bağırsakta 1,24 kat artış olarak kendini göstermiştir. ABTS analizinde ise, midedeki simüle sindirim sistemi ağıza göre yaklaşık 2 kat, bağırsakta ise 1,23 kat bir artış olduğu görülmektedir. DPPH analizinde de benzer şekilde ağıza kıyasla midede yaklaşık 2,59, bağırsakta ise ağıza kıyasla 1,6 lık artış olarak saptanmıştır. Sindirim öncesine kıyasla tüm analizlerde önemli derecede azalış gözlenmiştir ancak; ağıza göre bağırsaktaki biyoerişilebilirlik yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Qin ve diğerleri (2018), fenoliklerin ve flavonoidlerin bağırsak fazında yüksek oranda salındığını ve fenoliklerin bağırsakta emildiğini belirlemişlerdir. Gastrointestinal

sindirim fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliği ve fermente aloe vera sularının antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada, elde edilen sonuçlar, fenoliklerin konsantrasyonunun gastrik sindirimden sonra arttığını, bunun da bileşiklerin biyoerişilebilirliğini desteklediğini belirtmişlerdir (Cuvas-Limon ve diğerleri 2022). Ayrıca, naringenin antioksidan aktivitesinin mide fazında arttığı görülmektedir. Chen ve diğerleri (2016)'nin, meyve çekirdeklerinde ve Correa-Betanzo ve diğerleri (2014)'nin ise, yaban mersini özütleri için yaptıkları çalışmada, bu tez çalışmasında yapılan antioksidan kapasite metodu olan DPPH analizinde gözlemlenen etkiye paralel olarak, sindirimin gastrik fazından sonra önemli ölçüde DPPH değerlerinin arttığını belirtmişlerdir.

Tablo 4.12. *İn vitro* sindirim sırasında toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler

NRG				
	Sindirim Öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
TFM (mg/100g KM)	26124,82±0,90	435,71±0,07	609,23±0,04	527,28±0,01
ABTS (μmol/100g KM)	11741,77±0,76	253,09±0,02	514,09±0,02	312,45±0,01
DPPH (μmol/100g KM)	7806,14±0,72	120,48±0,02	311,97±0,04	193,24±0,03
PNRG3				
	Sindirim Öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
TFM (mg/100g KM)	1411,97±0,07	119,65±0,02	490,17±0,2	896,28±0,06
ABTS (μmol/100g KM)	973,75±0,4	176,66±0,07	563,82±0,03	681,69±0,03
DPPH (μmol/100g KM)	552,16±0,29	99,05±0,02	445,01±0,05	478,95±0,04

Tablo 4.12. *İn vitro* sindirim sırasında toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler (**Devamı**)

KONTROL				
	Sindirim Öncesi	Ağız	Mide	Bağırsak
TFM (mg/100g KM)	50,98±0,00	16,11±0,00	21,52±0,01	44,39±0,01
ABTS (μmol/100g KM)	90,20±0,02	27,75±0,01	30,11±0,08	62,11±0,11
DPPH (μmol/100g KM)	58,50±0,03	20,54±0,01	23,10±0,06	45,15±0,07

NRG:Naringin, **PNRG3:**Proniozomal naringin, **KONTROL:**Naringin Yüklenmemiş Proniozom

Proniozomal naringinin (PNRG3), ağız, mide ve bağırsak aşamaları toplam fenolik madde bakımından incelendiğinde, ağıza kıyasla midede yaklaşık 4,11 kat, bağırsakta ise 7,5 kat artış olarak belirlenmiştir. ABTS ve DPPH analizinde ise sırayla ağıza kıyasla midede 3,19 ve 4,49 kat, bağırsakta ise 3,86 ve 4,82 katlık artış görülmektedir. Fenolik bileşiklerin *in vitro* antioksidan aktivite analiz sonuçları biyolojik aktivitede olumlu sonuçlar verebilse de *in vivo* testlerde sonuç daha farklı belirlenebilmektedir. Bunun nedeni, fenolik bileşiklerin gastrointestinal sisteminin ortamında kararsız olması, yeterince çözünür olmaması ve çoğunun bağırsak zarından geçememesidir (Li, Jiang, Xu, ve Gu, 2015; Heleno, Martins, Queiroz, ve Ferreira, 2015). Kapsülleme, gastrointestinal sindirim sırasında stabilitelerini iyileştirmek ve ince bağırsakta fenolik bileşiklerin emilimini artırmak için bu bileşikleri bir veya iki polimer içinde hapsetmek için kullanılabilen bir tekniktir (Grgić, Šelo, Planinić, Tišma, ve Bucić-Kojić, 2020). Taşıyıcı malzeme olarak uygulanacak polimerin seçimi, nanokapsüllerin kimyasal özelliklerini ve fiziksel özelliklerini etkilediği için önem taşımaktadır (Norkaew ve diğerleri 2019). Her üç analizde midede sindirimin artması, düşük pH ve gastrik sindirim aşamasındaki enzimatik aktivite, karbonhidratlarla bağlı bazı fenolik bileşiklerin salınmasına yol açarak, bu biyoaktif bileşiklerin biyoerişilebilirliğini arttırmıştır (Cuvas-Limon ve diğerleri 2022). Mide ortamında biyoerişilebilirliğin artması, midenin asidik ortamından dolayı pH'nın düşük olması

ve polisakkarit, lignin ester bağları oluşarak salım miktarının artması yönünde yorumlanabilmektedir (Luo ve diğerleri 2022). Kapsüllenmemiş naringinin mide fazına kıyasla bağırsak fazı sonunda TFM sonuçlarındaki azalma, Ortega, Macià, Romero, Reguant, ve Motilva (2011), tarafından yapılan keçi boynuzu tozunun *in vitro* sindirimindeki çalışmayla uyumludur. Benzer şekilde Gullon, Pintado, Fernández-López, Pérez-Álvarez ve Viuda-Martos (2015), nar kabuğunda yaptıkları çalışmada da bağırsak fazında azalma olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca, PNRG3 ve NRG sindirim sonrası örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite analizlerinde ağıza göre artış göstermesinin sebebi bağırsak ve midenin sindirim süresinin daha uzun olması, sindirim enzimlerinin fenolik bileşiklerin salınmasını kolaylaştırması gibi birkaç parametreye bağlanabilmektedir. (Bouayed, Hoffmann ve Bohn, 2011; Sęczyk, Sugier, Świeca, ve Gawlik-Dziki, 2021).

PNRG3 ve NRG örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite analizlerinde sindirim öncesine göre ise önemli derecede azalma saptanmıştır. Bu durumun, simüle edilen gastrointestinal ortamda bulunan enzimlerden ve pH farklılıklarından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, gastrointestinal sindirimin keçi boynuzu posası özütlerinin TFM değerlerinin sindirilmemiş örneklere kıyasla *in vitro* sindirimden sonra güçlü bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Granese ve diğerleri (2014) ise, simüle edilmiş gastrointestinal geçişten sonra çilek üzümünde polifenollerin, antosiyaninlerin ve antioksidan aktivitesinde elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde azalma olduğunu belirlemişlerdir.

Toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitenin simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sonrasında serbest naringine kıyasla enkapsüle edilen naringin örneğinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Naringin bağırsak sindirimi sırasında bozulmaya meyilli bir yapısının olması biyoyararlanımda önemli bir azalmaya yol açmaktadır. Naringinin bezelye proteini ile pickering emülsiyonu metodu kullanılarak enkapsüle edildiği çalışmada, sindirimden sonra

enkapsüle naringinin ince bağırsaktaki biyoyararlanımı %92,01, saf naringininki ise %63,00 olarak bulunmuştur (Huang, ve diğerleri 2024). Sonuçların bu çalışmadan daha yüksek olması, naringinin ticari olarak temin edilmesi ve enkapsüle edilen materyallerin farklılığına bağlamak mümkündür. Naringinin bezelye proteini ile emülsiyon oluşturması biyoyararlanımını arttırmıştır. Benzer şekilde, naringin ve peynir altı suyu proteini izolatının kombinasyonunun, yağ-su emülsiyonlarının fiziksel stabilitesini ve oksidasyon stabilitesini artırdığı belirtilmiştir (Hu ve diğerleri 2020).

Enkapsüle edilen örneklerin, bağırsak fazında daha fazla ve mide fazında daha az salım göstermesi beklenmektedir. Kapsüllenen naringinin, enzimlerden ve pH değişimleri gibi sindirim koşullarının değişikliklerinden korunduğu anlamı taşımaktadır (Ydjedd ve diğerleri, 2017). PNRG3'ün biyoerişilebilirliğinin bağırsak fazında daha yüksek çıkması, naringin fenolik bileşiğinin nanokapsül yüzeyinden salınan düşük fenolik bileşik içeriğinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. PNRG3 analiz sonuçlarının, bağırsak fazında serbest naringine kıyasla daha iyi salım göstermesi, enkapsüle yaban mersini ekstraktının *in vitro* salım özelliklerini inceleyen Flores, Singh, Kerr, Phillips, ve Kong, (2015) ve Ydjedd ve diğerleri (2017)'nin keçiyoynuzu ekstraktının enkapsülasyonunu üzerine yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Saikia ve diğerleri (2015)'nin Averrhoa carambola posasının maltodekstrin ile püskürtme ve dondurarak kurutma yoluyla mikrokapsüllenmesi üzerine *in vitro* sindiriminin incelendiği çalışmada ise, her iki teknikte de fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğinin mide ortamda bağırsak ortamına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Simüle edilmiş bir gastrointestinal ortamdaki kapsüllerin davranışının, kapsülleme için kullanılan kaplama malzemesinin türüne ve özelliğine ve sindirim enzimlerine karşı direnç veya duyarlılıklarına ve ayrıca pH aralığı gibi gastrointestinal koşullara bağlı olduğu belirtilmiştir (Saura-Calixto, Serrano, ve Goñi, 2007; Saikia ve diğerleri,2015).

5. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında, optimize edilen ekstraksiyon koşullarında greylift kabuğundan naringinin saflaştırılması sağlanmıştır ve elde edilen naringin proniozom ile enkapsüle edilerek biyoaktif özellikleri açısından incelenmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, optimum koşullar istenilebilirlik koşulunu da sağlamakla birlikte greylift kabuğundan saflaştırılan kristal yapı ve kristal yapıdaki naringin miktarı için % 67,16 metanol konsantrasyonu, 38 g örnek miktarı, 119 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

Farklı stabilizör (kolesterol-dodekanol) ve naringin konsantrasyonlarında proniozomal formülasyonlar hazırlanarak karakterize edilmiş ve ideal kompozisyonun kolesterol stabilizörü kullanılarak ve 50 mg naringin bileşiği yüklenerek hazırlanan formülasyonda belirlenmiştir.

Naringin yüklü proniozom ve kontrol örneklerinin stabilite çalışması için 4°C ve 25°C koşullarında 28 gün depolanarak karakterize edilmiş ve sıcaklık artışına bağlı olarak enkapsülasyon etkinliği ve homojenlik (PDI) azalmıştır, dolayısıyla sıcaklıktaki artışın olumsuz etkiye yol açabildiği saptanmıştır.

Karakterizasyonun belirlenmesinde önemli bir parametre olan FTIR analizinde ise, proniozomlar içerisindeki naringinin yapısında kimyasal değişiklikler olmadığı, ancak fiziksel formülasyon değişiklikleri ile etkileşimde olduğu görülmüştür. Bu da naringin ve taşıyıcı arasında kimyasal etkileşim olmadığını, niozomal yolla enkapsüle edilen naringinin stabilitesinin korunduğunu ortaya koymuştur.

NRG'nin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi, PNRG3'ten daha yüksek bulunmuştur. *In vitro* gastrointestinal sindirim sistemi modeli ile biyoerişilebilirlik analizinde ise PNRG3'ün biyoerişilebilirliği NRG'den yüksek çıkmıştır. Nanoenkapsülasyondaki amaç naringinin biyoerişilebilirliğini arttırmaktır. Bu farklılığa, simüle edilen gastrointestinal ortamda bulunan enzimlerin, pH farklılıklarının neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Nanoformülasyonun sağladığı biyoaktif bileşen koruması ve uzun vadeli stabilite avantajları

göz önüne alındığında bu durumun kabul edilebilir olduğunu söylemek mümkündür. Nanoformülasyon teknikleriyle yapılan çalışmalar, naringinin biyoerişilebilirliğini artırırken, antioksidan kapasitesinde bazı azalmaların gözlemlenebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, naringinin etkin kullanımı için uygun taşıma ve uygulama yöntemlerinin seçilmesi önemlidir.

Naringin *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir ve elde edilen inhibisyon zon çapları sırasıyla, 13,05 mm, 10,73 ve 11,01 mm olarak bulunmuştur. MİK değerleri bakımından değerlendirildiğinde ise, *S. aureus*'un gelişimini engelleyen en düşük MİK değeri 3,75 mg/mL, *E.coli* ve *P. aeruginosa* üzerine belirlenen MİK değeri 7,5 mg/mL ise olarak belirlenmiştir. Proniozomal naringin ise herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

Naringinin süper sarmallı dairesel plazmid DNA'nın (Supercoiled) formunu OH● radikal hasarına karşı koruduğu, proniozomal naringin ve kontrol örneklerinin ise plazmid DNA'yı H₂O₂'nin UV fotolizinden üretilen oksidatif hasara karşı koruyamadığı gözlenmiştir. Naringinin koruyucu etkisinin yüksek antioksidan kapasite göstermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma greyfurt atığının değerlendirilmesi ve bu atıktan ticari değeri olan naringinin saflaştırılması, yeni proniozomal yapıda enkapsülasyonu ile yeni bir ürün elde etmesi sebebiyle sürdürülebilir atık yönetimi ve gıda takviyesi olarak kullanımı için ileriki çalışmalar için umut vaat etmektedir.

KAYNAKÇA

- A. Bakheet, S. ve M. Attia, S. (2011). Evaluation of chromosomal instability in diabetic rats treated with naringin. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011(1), 365292.
- Abd-Elghany, A. A., Ahmed, S. M., Masoud, M. A., Atia, T., Waggiallah, H. A., El-Sakhawy, M. A. ve Mohamad, E. A. (2022). *Annona squamosa* L. extract-loaded niosome and its anti-ehrllich ascites' carcinoma activity. *ACS omega*, 7(43), 38436-38447.
- Abou-Taleb, H. A., Khallaf, R. A. ve Abdel-Aleem, J. A. (2018). Intranasal niosomes of nefopam with improved bioavailability: preparation, optimization, and in-vivo evaluation. *Drug design, development and therapy*, 3501-3516.
- Acero, N., Gradillas, A., Beltran, M., García, A. ve Mingarro, D. M. (2019). Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Food chemistry*, 279, 260-271.
- Ademosun, A. O. (2022). Citrus peels odyssey: From the waste bin to the lab bench to the dining table. *Applied food research*, 2(1), 100083.
- Agarwal, S., Mohamed, M. S., Raveendran, S., Rochani, A. K., Maekawa, T. ve Kumar, D. S. (2018). Formulation, characterization and evaluation of morusin loaded niosomes for potentiation of anticancer therapy. *RSC advances*, 8(57), 32621-32636.
- Ahmad, B., Khan, M. R., Jamil, A., Ahmad, M. Z., Pervez, S., Claridge, T. D., Odell, B. ve McCullagh, J. S. (2024). Antioxidant and antimicrobial potential of compounds isolated from *Carissa opaca*. *Food Bioscience*, 57, 103556.
- Ahmad, J. ve Langrish, T. A. G. (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 162-174.

Ahmad, S. F., Attia, S. M., Bakheet, S. A., Zoheir, K. M., Ansari, M. A., Korashy, H. M., E. Abdel-Hamied, H., E. Ashour, A. ve Abd-Allah, A. R. 2015. "Naringin attenuates the development of carrageenan-induced acute lung inflammation through inhibition of NF- κ B, STAT3 and pro-inflammatory mediators and enhancement of I κ B α and anti-inflammatory cytokines", *Inflammation*, 38(2), 846-857.

Ahmed, O. M., AbouZid, S. F., Ahmed, N. A., Zaky, M. Y. ve Liu, H. (2021). An up-to-date review on citrus flavonoids: chemistry and benefits in health and diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 27(4), 513-530.

Ahmed, O. M., Mahmoud, A. M., Abdel-Moneim, A. ve Ashour, M. B. (2012). Antidiabetic effects of hesperidin and naringin in type 2 diabetic rats. *Diabetologia croatica*, 41(2).

Ahmed, S., Khan, H., Aschner, M., Hasan, M. M. ve Hassan, S. T. (2019). Therapeutic potential of naringin in neurological disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110646.

Ajrin, M. ve Anjum, F. (2022). Proniosome: A promising approach for vesicular drug delivery. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 462.

Alam, F., Mohammadin, K., Shafique, Z., Amjad, S. T. ve Asad, M. H. H. B. (2022). Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: A review. *Phytotherapy Research*, 36(4), 1417-1441.

Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M. ve Sarker, S. D. 2014. "Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action", *Advances in Nutrition*", 5(4), 404-417.

Al-Âni, W. N., Tawfik, N. O. ve Shehab, E. Y. 2011. "Antimicrobial activity of grapefruit seeds extracts (in vitro study)", *Al-Rafidain Dental Journal*, 11(2), 341-345.

Al-Enazi, N. M., Alsamhary, K., Ameen, F. ve Nobre, M. A. L. (2023). Novel vesicular formulation based on a herbal extract loaded with niosomes and evaluation of its antimicrobial and anticancer potential. *Microbiology Research*, 14(4), 2133-2147.

Alkaya, E., Erguder, T. H. ve Demirer, G. N. (2010). Effect of operational parameters on anaerobic co-digestion of dairy cattle manure and agricultural residues: A case study for the Kahramanmaraş region in Turkey. *Engineering in Life Sciences*, 10(6), 552-559.

Alsaidan, O. A., Zafar, A., Al-Ruwaili, R. H., Yasir, M., Alzarea, S. I., Alsaidan, A. A., Singh L. ve Khalid, M. (2023). Niosomes gel of apigenin to improve the topical delivery: development, optimization, ex vivo permeation, antioxidant study, and in vivo evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 51(1), 604-617.

Amich, J., Dümig, M., O'Keeffe, G., Binder, J., Doyle, S., Beilhack, A. ve Krappmann, S. (2016). Exploration of sulfur assimilation of *Aspergillus fumigatus* reveals biosynthesis of sulfur-containing amino acids as a virulence determinant. *Infection and immunity*, 84(4), 917-929.

Ana, C. C., Jesús, P. V., Hugo, E. A., Teresa, A. T., Ulises, G. C. ve Neith, P. (2018). Antioxidant capacity and UPLC–PDA ESI–MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of food science and technology*, 55, 5106-5114.

Andrade-Ochoa, S., Chacón-Vargas, K. F., Sánchez-Torres, L. E., Rivera-Chavira, B. E., Noguera-Torres, B. ve Nevárez-Moorillón, G. V. (2021). Differential antimicrobial effect of essential oils and their main components: Insights based on the cell membrane and external structure. *Membranes*, 11(6), 405.

Araujo, N. M. P., Arruda, H. S., Dos Santos, F. N., de Moraes, D. R., Pereira, G. A. ve Pastore, G. M. (2020). LC-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in leaves, pulp and seed from *Eugenia calycina* Cambess. *Food Research International*, 137, 109556.

Asahina, Y. ve Inubuse, M. (1928). Über die Konstitution des Naringenins (II. Mitteilung über die Flavanon-Glucoside). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 61(7), 1514-1516.

Atık Yönetimi Yönetmeliği, (2015). Atık Yönetimi Yönetmeliği. T.C. Resmî Gazete (29314, 2 Nisan 2015).

- Attia, S. M. (2008). Abatement by naringin of lomefloxacin-induced genomic instability in mice. *Mutagenesis*, 23(6), 515-521.
- Aznar, R., Rodríguez-Pérez, C. ve Rai, D. K. (2022). Comprehensive characterization and quantification of antioxidant compounds in finger lime (*Citrus australasica* L.) by HPLC-QToF-MS and UPLC-MS/MS. *Applied Sciences*, 12(3), 1712.
- Bacanlı, M., Başaran, A. A. ve Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and chemical Toxicology*, 81, 160-170.
- Bai, Y., Peng, W., Yang, C., Zou, W., Liu, M., Wu, H., Fan, L., Li, P., Zeng, X. ve Su, W. (2020). Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans, and the differences between species. *Frontiers in pharmacology*, 11, 364.
- Baranei, M., Taheri, R. A., Tirgar, M., Saeidi, A., Oroojalian, F., Uzun, L., Asefnejad, A., R. Wurm F. ve Goodarzi, V. (2021). Anticancer effect of green tea extract (GTE)-Loaded pH-responsive niosome Coated with PEG against different cell lines. *Materials Today Communications*, 26, 101751.
- Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. *Current opinion in colloid & interface science*, 6(1), 66-77.
- Barrales, F. M., Silveira, P., Barbosa, P. D. P. M., Ruviano, A. R., Paulino, B. N., Pastore, G. M., Macedo, G.A. ve Martinez, J. (2018). Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids—An application to orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 112, 9-21.-413.
- Bellemare, M. F., Çakir, M., Peterson, H. H., Novak, L. ve Rudi, J. (2017). On the measurement of food waste.
- Ben-Azu, B., Nwoke, E. E., Aderibigbe, A. O., Omogbiya, I. A., Ajayi, A. M., Olonode, E. T., Umukoro, S. ve Iwalewa, E. O. (2019). Possible neuroprotective mechanisms of action involved in the neurobehavioral property of naringin in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 536-546.

Bernsdorff, C., Wolf, A., Winter, R. ve Gratton, E. (1997). Effect of hydrostatic pressure on water penetration and rotational dynamics in phospholipid-cholesterol bilayers. *Biophysical journal*, 72(3), 1264-1277.

Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R. ve Pandey, S. (2020). Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101581.

Bharti, S., Rani, N., Krishnamurthy, B. ve Arya, D. S. (2014). Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta medica*, 80(06), 437-451.

Bonamici, D. (2009). Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisencões. São Paulo.

Borodovitsyna, O., Flamini, M. ve Chandler, D. (2017). Noradrenergic modulation of cognition in health and disease. *Neural plasticity*, 2017(1), 6031478.

Bouayed, J., Hoffmann, L. ve Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128(1), 14-21.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. ve Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., R. Mackie, A., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., N. Santos, C., Souchon, I., Singh, R. P., E. Vegarud, G., S. J. Wickham, M., Weitschies W. ve Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.

Brudzynski, K. ve Maldonado-Alvarez, L. (2015). Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(2).

- Bucić-Kojić, A., Fernandes, F., Silva, T., Planinić, M., Tišma, M., Šelo, G., Šibalić, D., M. Pereira D. ve Andrade, P. B. (2020). Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & function*, 11(1), 680-688.
- Budel, R. G., da Silva, D. A., Moreira, M. P., Dalcin, A. J. F., da Silva, A. F., Nazario, L. R., Majolo, J.H., Lopes, L.Q.S., Santos, R.C.V., Soares, F.A.A., Souza da Silva, R., Gomes P. ve Boeck, C. R. (2020). Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110754.
- Bülbül, G. Y., Mis, L., Şengül, E., Yıldırım, S., Çelebi, F. ve Çınar, A. (2018). Cyclophosphamide İle İndüklenmiş Ratlarda Karaciğer Enzimleri (AST, ALT, ALP) ve Histopatolojisi Üzerine Naringin'in Protektif Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(2), 182-190.
- Cao, H., Liu, J., Shen, P., Cai, J., Han, Y., Zhu, K. Fu, Y., Zhang, N., Zhang Z. ve Cao, Y. (2018). Protective effect of naringin on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(50), 13133-13140.
- Cao, R., Li, X., Zhou, Z. ve Zhao, Z. (2021). Synthesis and biophysical analysis of Naringin-Chitooligosaccharide complex. *Natural product research*, 35(2), 305-311.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J. ve Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.
- Castro-Vazquez, L., Alañón, M. E., Rodríguez-Robledo, V., Pérez-Coello, M. S., Hermosín-Gutierrez, I., Díaz-Maroto, M. C., Jordán, J., Galindo M.F. ve Arroyo-Jimenez, M. D. M. (2016). Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 8915729.
- Celiz, G., Daz, M. ve Audisio, M. C. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *Journal of applied microbiology*, 111(3), 731-738.

- Chaudhary, S. ve Singh, B. (2024). From Bin to Benefit: Sustainable Valorization of Grapefruit (*Citrus paradisi*) Byproducts Towards the Circular Economy. *Current Food Science and Technology Reports*, 1-26.
- Chavan, P., Singh, A. K. ve Kaur, G. 2018. “Recent progress in the utilization of industrial waste and by-products of citrus fruits: A review”, *Journal of Food Process Engineering*, 41(8), e12895.
- Chavda, V. P., Patel, C., Modh, D., Ertas, Y. N., Sonak, S. S., Munshi, N. K., Anand, K., Soni, A. ve Pande, S. (2022). Therapeutic approaches to amyotrophic lateral sclerosis from the lab to the clinic. *Current Drug Metabolism*, 23(3), 200-222.
- Chávez-González, M. L., Sepúlveda, L., Verma, D. K., Luna-García, H. A., Rodríguez-Durán, L. V., Ilina, A. ve Aguilar, C. N. (2020). Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes*, 8(4), 434.
- Cheigh, C. I., Chung, E. Y. ve Chung, M. S. (2012). Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 472-477.
- Chen, G. L., Chen, S. G., Chen, F. U., Xie, Y. Q., Han, M. D., Luo, C. X., Zhao, Y.Y. ve Gao, Y. Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 317-331.
- Chen, R., Qi, Q. L., Wang, M. T. ve Li, Q. Y. (2016). Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*, 54(12), 3203-3210.
- Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M. ve Wen, J. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 144, 18-39.
- Cheng, L., Zhang, X., Qi, J., Zhang, Y. ve Zhou, K. (2023). Determination of multicomponents from Zhuanggu Guanjie capsule in rat plasma by UHPLC–MS/MS and pharmacokinetic study. *Bioanalysis*, 15(10), 537-551.

- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Aida, W. W. ve Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427.
- Choe, S. C., Kim, H. S., Jeong, T. S., Bok, S. H. ve Park, Y. B. (2001). Naringin has an antiatherogenic effect with the inhibition of intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 38(6), 947-955.
- Choi, M. S., Do, K. M., Park, Y. B., Jeon, S. M., Jeong, T. S., Lee, Y. K., Lee, M. K., ve Bok, S. H. (2001). Effect of naringin supplementation on cholesterol metabolism and antioxidant status in rats fed high cholesterol with different levels of vitamin E. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45(5), 193-201.
- Choi, M. Y., Chai, C., Park, J. H., Lim, J., Lee, J. ve Kwon, S. W. (2011). Effects of storage period and heat treatment on phenolic compound composition in dried Citrus peels (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC-DAD analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(4), 638-645.
- Chtourou, Y., Aouey, B., Aroui, S., Kebieche, M. ve Fetoui, H. (2016). Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chemico-Biological Interactions*, 243, 1-9.
- Chun, J. Y., Choi, M. J., Min, S. G. ve Weiss, J. (2013). Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 249-257.
- Ciğeroğlu, Z., Bayramoğlu, M., Kırbaşlar, Ş. İ. ve Şahin, S. (2021). Comparison of microwave-assisted techniques for the extraction of antioxidants from *Citrus paradisi* Macf. biowastes. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1190-1198.

- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M. ve Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 165, 522-531.
- Cristóbal-Luna, J. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. ve Chamorro-Cevallos, G. (2018). Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 224-234.
- Cuvas-Limon, R. B., Ferreira-Santos, P., Cruz, M., Teixeira, J. A., Belmares, R. ve Nobre, C. (2022). Effect of gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity of fermented Aloe vera juices. *Antioxidants*, 11(12), 2479.
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P. ve Brandelli, A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27(1), 175-178.
- Dahiya, N. K., Rao, R. ve Nanda, S. (2011). Preparation and evaluation of ramipril niosomes prepared using sonication method. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 53(3).
- Dalcin, A. J. F. (2015). Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanocápsulas de dihidromiricetina em cateteres urinários.
- Dall'Asta, M., Derlindati, E., Curella, V., Mena, P., Calani, L., Ray, S., Zavaroni, I., Brighenti, F. ve Del Rio, D. (2013). Effects of naringenin and its phase II metabolites on in vitro human macrophage gene expression. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(7), 843-849.
- De Castro, W. V., Mertens-Talcott, S., Rubner, A., Butterweck, V. ve Derendorf, H. 2006. "Variation of flavonoids and furanocoumarins in grapefruit juices: A potential source of variability in grapefruit juice– drug interaction studies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 249-255.
- Del Río, J. A., Fuster, M. D., Gómez, P., Porras, I., Garcia-Lidón, A. ve Ortuño, A. (2004). Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food chemistry*, 84(3), 457-461.

Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., Slavchev, A. ve Hristova-Ivanova, Y. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(5-6), 175-185.

Desbois, A. P. ve Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 1629-1642.

Deshmukh, R., Prajapati, M. ve Harwansh, R. K. (2023). Recent advances and prospects in naringin nanocarrier drug delivery system for cancer management. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105182.

Dey, P., Parai, D., Banerjee, M., Hossain, S. T. ve Mukherjee, S. K. (2020). Naringin sensitizes the antibiofilm effect of ciprofloxacin and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(3), 151410.

Dhadwal, A., Sharma, D. R., Pandit, V., Ashawat, M. S. ve Kumar, P. (2020). Cubosomes: A novel carrier for transdermal drug delivery. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 10(1), 123-130.

Duong, V. A., Nguyen, T. T. L. ve Maeng, H. J. (2020). Preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery and the effects of preparation parameters of solvent injection method. *Molecules*, 25(20), 4781.

Edet, U., Ebana, R., Ekanemesang, U., Ikon, G., Edem, E. ve Mbim, E. (2016). Phytochemical screening, nutrient analysis, anti-termite and antimicrobial activity of *Citrus paradisi* peel powder. *Journal of Applied Life Sciences International*, 9(4), 1-9.

El Kantar, S., Rajha, H. N., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G. ve Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. *Food Chemistry*, 295, 165-171.

- Elmi, N., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Sahraee, S., Heshmati, M. K., Hoseini, M. ve Pezeshki, A. (2021). Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. *Journal of Food Engineering*, 296, 110463.
- El-Ridy, M. S., Badawi, A. A., Safar, M. M. ve Mohsen, A. M. (2012). Niosomes as a novel pharmaceutical formulation encapsulating the hepatoprotective drug silymarin. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 549-59.
- Emerald, F. M. E., Pushpadass, H. A., Joseph, D. ve Jaya, S. V., (2020). Impact of Nanotechnology in Beverage Processing.
- Fahmy, S. A., Ramzy, A., Sawy, A. M., Nabil, M., Gad, M. Z., El-Shazly, M., Aboul-Soud, M.A.M. ve Azzazy, H. M. E. S. (2022). Ozonated olive oil: enhanced cutaneous delivery via niosomal nanovesicles for melanoma treatment. *Antioxidants*, 11(7), 1318.
- Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N. ve Haddad, P. R. 2005. "Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill", *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2), 14-18.
- Fang, Z. ve Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- FAO, 2021. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division, (<http://www.Zema.org/faostat/en/#data/QC>).
- FAO, 2022. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division, (<http://www.Zema.org/faostat/en/#data/QC>).
- Fathi, M., Mozafari, M. R. ve Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.
- Feng, J., Lin, C., Wang, H. ve Liu, S. (2017). Gemini dodecyl O-glucoside-based vesicles as nanocarriers for catechin laurate. *Journal of Functional Foods*, 32, 256-265.

- Feng, T., Wang, K., Liu, F., Ye, R., Zhu, X., Zhuang, H. ve Xu, Z. (2017). Structural characterization and bioavailability of ternary nanoparticles consisting of amylose, α -linoleic acid and β -lactoglobulin complexed with naringin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 365-374.
- Ferreira, C. D., da Conceição, E. J. L., Machado, B. A. S., Hermes, V. S., de Oliveira Rios, A., Druzian, J. I. ve Nunes, I. L. (2016). Physicochemical characterization and oxidative stability of microencapsulated crude palm oil by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 124-136.
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Phillips, D. R. ve Kong, F. (2015). In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food chemistry*, 168, 225-232.
- Fontana, M. C., Bastos, M. O. ve Beck, R. C. R. (2010). Development and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of clobetasol propionate in topical nanocapsule suspensions. *Journal of chromatographic science*, 48(8), 637-640.
- Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Gasparri, M., Mazzoni, L., Quiles, J. L., Alvarez-Suarez, J. M. ve Battino, M. 2014. "The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms", *Food and Chemical Toxicology*, 68, 154-182.
- Franzoni, F., Scarfò, G., Guidotti, S., Fusi, J., Asomov, M. ve Pruneti, C. (2021). Oxidative stress and cognitive decline: the neuroprotective role of natural antioxidants. *Frontiers in neuroscience*, 15, 729757.
- Frydman, A., Weiss Haus, O., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Bar-Peled, M., Lewinsohn, E., Fluhr R., Gressel J. ve Eyal, Y. (2005). Metabolic engineering of plant cells for biotransformation of hesperedin into neohesperidin, a substrate for production of the low-calorie sweetener and flavor enhancer NHDC. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(25), 9708-9712.
- Galbraith, H. ve Miller, T. B. (1973). Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(4), 647-658.

Gan, J., Deng, X., Le, Y., Lai, J. ve Liao, X. (2023). The development of naringin for use against bone and cartilage disorders. *Molecules*, 28(9), 3716.

Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C. ve Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1114-1122.

García-Díaz, M., Patiño, B., Vázquez, C. ve Gil-Serna, J. (2019). A novel niosome-encapsulated essential oil formulation to prevent *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. *Toxins*, 11(11), 646-659.

Ghosal, K., Ghosh, D. ve Das, S. K. (2018). Preparation and evaluation of naringin-loaded polycaprolactone microspheres based oral suspension using Box-Behnken design. *Journal of Molecular Liquids*, 256, 49-57.

Giannuzzo, A. N., Boggetti, H. J., Nazareno, M. A. ve Mishima, H. T. (2003). Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochemical Analysis*, 14(4), 221-223.

Gibis, M., Thellmann, K., Thongkaew, C. ve Weiss, J. (2014). Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. *Food Hydrocolloids*, 41, 119-131.

Gollavilli, H., Hegde, A. R., Managuli, R. S., Bhaskar, K. V., Dengale, S. J., Reddy, M. S., Kalthur G. ve Mutalik, S. (2020). Naringin nano-ethosomal novel sunscreen creams: Development and performance evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 193, 111122.

Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y. S., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspi, A., Libman I. ve Trakhtenberg, S. 2001. "Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits", *Food Chemistry*, 74(3), 309-315.

- Gouranton, E., El Yazidi, C., Cardinault, N., Amiot, M. J., Borel, P. ve Landrier, J. F. (2008). Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3832-3836.
- Granese, T., Cardinale, F., Cozzolino, A., Pepe, S., Ombra, M. N., Nazzaro, F., Coppola, R. ve Fratianni, F. (2014). Variation of polyphenols, anthocyanins and antioxidant power in the strawberry grape (*Vitis labrusca*) after simulated gastro-intestinal transit and evaluation of in vitro antimicrobial activity. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Grassino, A. N., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V., Karlović, S., Ježek, D. ve Bosiljkov, T. (2020). Insight into high-hydrostatic pressure extraction of polyphenols from tomato peel waste. *Plant foods for human nutrition*, 75, 427-433.
- Gregoriadis, G. ve Davis, C. (1979). Stability of liposomes invivo and invitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 89(4), 1287-1293.
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M. ve Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, 9(10), 923.
- Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. ve Viuda-Martos, M. (2015). In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.
- Guneser, B. A. ve Yilmaz, E. (2017). Bioactives, aromatics and sensory properties of cold-pressed and hexane-extracted lemon (*Citrus limon* L.) seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94, 723-731.
- Gupta, A. K., Das, S., Sahu, P. P. ve Mishra, P. (2022). Design and development of IDE sensor for naringin quantification in pomelo juice: An indicator of citrus maturity. *Food chemistry*, 377, 131947.

Gupta, I., Adin, S. N., Aqil, M. ve Mujeeb, M. (2024). Nose to brain delivery of naringin loaded transniosomes for epilepsy: formulation, characterisation, blood-brain distribution and invivo pharmacodynamic evaluation. *Journal of Liposome Research*, 34(1), 60-76.



- Gupta, I., Adin, S. N., Aqil, M., Mujeeb, M. ve Akhtar, M. (2023). Application of QbD-based approach to the development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous estimation of pregabalin and naringin in dual-drug loaded liposomes. *Biomedical chromatography*, 37(6), e5623.
- Gurunath, S., Nanjwade, B. K. ve Patil, P. A. (2015). Oral bioavailability and intestinal absorption of candesartan cilexetil: Role of naringin as P-glycoprotein inhibitor. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(1), 170-176.
- Gutiérrez, G., Matos, M., Barrero, P., Pando, D., Iglesias, O. ve Pazos, C. (2016). Iron-entrapped niosomes and their potential application for yogurt fortification. *LWT*, 74, 550-556.
- Gutiérrez-Venegas, G., Gómez-Mora, J. A., Meraz-Rodríguez, M. A., Flores-Sánchez, M. A., ve Ortiz-Miranda, L. F. (2019). Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. *Heliyon*, 5(12).
- Hakim, A., Loka, I. N. ve Prastiwi, N. W. W. S. (2019). New method for isolation of naringin compound from *Citrus maxima*. *Natural Resources*, 10(08), 299.
- Hale, M. W., Shekhar, A. ve Lowry, C. A. (2012). Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cellular and molecular neurobiology*, 32, 695-708.
- Han, G. ve Lee, D. G. (2022). Naringin generates three types of reactive oxygen species contributing differently to apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Life Sciences*, 304, 120700.
- Han, Q., Feng, L., Zhang, Y., Zhang, R., Wang, G. ve Zhang, Y. (2021). Effect of juglone against *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* planktonic growth and biofilm formation. *Molecules*, 26(24), 7580.
- Hassan, R. A., Hozayen, W. G., Abo Sree, H. T., Al-Muzafar, H. M., Amin, K. A. ve Ahmed, O. M. (2021). Naringin and Hesperidin Counteract Diclofenac-Induced Hepatotoxicity in Male Wistar Rats via Their Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiapoptotic Activities. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021(1), 9990091.

- Haytowitz, D. B., Wu, X. ve Bhagwat, S. (2018). USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3.3. US Department of Agriculture, 173.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. ve Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
- Higashi, Y. (2023). Endothelial Function in dyslipidemia: roles of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides. *Cells*, 12(9), 1293.
- Hoffmann, Ed. "Naringin (Hesperidin de Vry)." *Archiv der Pharmazie* 214.2 (1879): 139-145.
- Hu, J. N., Zheng, H., Chen, X. X., Li, X., Xu, Y. ve Xu, M. F. (2020). Synergetic effects of whey protein isolate and naringin on physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 101, 105517.
- Huang, J. Y., Liao, J. S., Qi, J. R., Jiang, W. X. ve Yang, X. Q. (2021). Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel. *Food Hydrocolloids*, 110, 106140.
- Huang, M., Tian, M., Tan, C., Ying, R., Ahmad, M., Hao, G. ve Liao, Q. (2024). Thermal stability, antioxidant activity and bioavailability of pea protein–naringin Pickering emulsion for enhanced delivery applications. *Food Research International*, 188, 114393.
- Huang, R., Zhang, Y., Shen, S., Zhi, Z., Cheng, H., Chen, S. ve Ye, X. 2020. “Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: An in vitro study”, *Food Chemistry*, 326, 126785.
- Huang, Y. S. ve Ho, S. C. (2010). Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*, 119(3), 868-873.
- Husain, F. M., Perveen, K., Qais, F. A., Ahmad, I., Alfarhan, A. H. ve El-Sheikh, M. A. (2021). Naringin inhibits the biofilms of metallo- β -lactamases (M β LS) producing *Pseudomonas* species isolated from camel meat. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 333-341.

Hussain, K., Ali, I., Ullah, S., Imran, M., Parveen, S., Kanwal, T., Shafiq, A.S., Saifullah, S. ve Shah, M. R. (2022). Enhanced antibacterial potential of naringin loaded β cyclodextrin nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, 1-10.

Ibrahim, F. M., Abdelsalam, E., Mohammed, R. S., Ashour, W. E. S., Vilas-Boas, A. A., Pintado, M. ve El Habbasha, E. S. (2024). Polyphenol-Rich Extracts and Essential Oil from Egyptian Grapefruit Peel as Potential Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Food Additives. *Applied Sciences*, 14(7), 2776.

Imam, S. S., Gilani, S. J., Zafar, A., Jumah, M. N. B., Ali, R., Ahmed, M. M. ve Alshehri, S. (2022). Preparation and optimization of naringin oral nanocarrier: In vitro characterization and antibacterial activity. *Coatings*, 12(9), 1230.

Ioannou, I., M'hiri, N., Chaaban, H., Boudhrioua, N. M. ve Ghoul, M. (2018). Effect of the process, temperature, light and oxygen on naringin extraction and the evolution of its antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(12), 2754-2760.

Isnan, A. P. ve Jufri, M. (2017). Formulation of niosomal gel containing green tea extract (*Camellia sinensis* L. Kuntze) using thin-layer hydration. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9, 38-43.

Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Castellan, A., Gardrat, C. ve Coma, V. (2014). Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. *Carbohydrate polymers*, 110, 374-381.

Izhar, M. P., Hafeez, A., Kushwaha, P. ve Simrah. (2023). Drug Delivery Through Niosomes: A Comprehensive Review with Therapeutic Applications. *Journal of Cluster Science*, 34(5), 2257-2273.

Jabri, T., Imran, M., Aziz, A., Rao, K., Kawish, M., Irfan, M., Malik, M.I., Simjee, S.U., Arfan, M. ve Shah, M. R. (2019). Design and synthesis of mixed micellar system for enhanced anticancer efficacy of Paclitaxel through its co-delivery with Naringin. *drug development and industrial pharmacy*, 45(5), 703-714.

Jadid, M. F. S., Jafari-Gharabaghlo, D., Bahrami, M. K., Bonabi, E. ve Zarghami, N. (2023). Enhanced anti-cancer effect of curcumin loaded-niosomal nanoparticles in combination with

heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* against human colon cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 80, 104167.

Jagetia, G. C. ve Reddy, T. K. 2005. "Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin", *Life Sciences*, 77(7), 780-794.

Jagetia, G. C. ve Reddy, T. K. 2011. "Alleviation of iron induced oxidative stress by the grape fruit flavanone naringin in vitro", *Chemico-biological interactions*, 190(2-3), 121-128.

Jain, S., Patel, M. ve Navale, A. (2024). Investigation of Naringin's Antifungal Potential, Optimization and Characterization of Niosomal Gel Formulation. *Proceedings of the 9h World Congress on Recent Advances in Nanotechnology*, NDDTE 137.

Jakab, J., Miškić, B., Mikšić, Š., Juranić, B., Ćosić, V., Schwarz ve D. Včev, A. (2021). Adipogenesis as a potential anti-obesity target: A review of pharmacological treatment and natural products. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity*, 67-83.

Jamal, M., Imam, S. S., Aqil, M., Amir, M., Mir, S. R. ve Mujeeb, M. (2015). Transdermal potential and anti-arthritic efficacy of ursolic acid from niosomal gel systems. *International immunopharmacology*, 29(2), 361-369.

Jeon, S. M., Park, Y. B. ve Choi, M. S. (2004). Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clinical nutrition*, 23(5), 1025-1034.

Jin, Y., Wen, J., Garg, S., Liu, D., Zhou, Y., Teng, L. ve Zhang, W. (2013). Development of a novel niosomal system for oral delivery of Ginkgo biloba extract. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 421.

Joseph, E. ve Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *Nanomaterials for drug delivery and therapy*, 91-116.

Junyaprasert, V. B., Singhsa, P. ve Jintapattanakit, A. (2013). Influence of chemical penetration enhancers on skin permeability of ellagic acid-loaded niosomes. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 8(2), 110-117.

- Kamble, B., Talreja, S., Gupta, A., Patil, D., Pathak, D., Moothedath, I. ve Duraiswamy, B. (2013). Development and biological evaluation of *Gymnema sylvestre* extract-loaded nonionic surfactant-based niosomes. *Nanomedicine*, 8(8), 1295-1305.
- Kamboj, S., Saini, V. ve Bala, S. (2014). Formulation and characterization of drug loaded nonionic surfactant vesicles (niosomes) for oral bioavailability enhancement. *The scientific world journal*, 2014(1), 959741.
- Kandhare, A. D., Alam, J., Patil, M. V., Sinha, A. ve Bodhankar, S. L. (2016). Wound healing potential of naringin ointment formulation via regulating the expression of inflammatory, apoptotic and growth mediators in experimental rats. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 419-432.
- Kaoud, R. M., Heikal, E. J. ve Hammady, T. M. (2022). Diacerein-loaded niosomes (DC-NS): A new technique to sustain the release of drug action. *Int J App Pharm*, 14(1), 156-163.
- Kashef, M. T., Saleh, N. M., Assar, N. H. ve Ramadan, M. A. (2020). The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*, 1619-1629.
- Kaur, D. ve Kumar, S. (2018). Niosomes: present scenario and future aspects. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 8(5), 35-43.
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S. I., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T. ve Kumazawa, Y. (2004). A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 679-683.
- Kazi, K. M., Mandal, A. S., Biswas, N., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M. ve Kuotsu, K. (2010). Niosome: a future of targeted drug delivery systems. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(4), 374-380.
- Kelebek, H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 269-274.

- Kelebek, H., Selli, S., Kadiroğlu, P., Kola, O., Kesen, S., Uçar, B. ve Çetiner, B. (2017). Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process. *Food Chemistry*, 220, 31-41.
- Keshtmand, Z., Naimi, S. N., Piran, Z. K., Jafroodi, P. P. ve Yarakı, M. T. (2023). Enhanced anticancer effect of *Artemisia turcomanica* extract in niosomal formation on breast cancer cells: in-vitro study. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 35, 101030
- Khalil, M. N., Farghal, H. H., ve Farag, M. A. (2022). Outgoing and potential trends of composition, health benefits, juice production and waste management of the multi-faceted Grapefruit *Citrus X paradisi*: A comprehensive review for maximizing its value. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(4), 935-956.
- Khatoon, M., Shah, K. U., Din, F. U., Shah, S. U., Rehman, A. U., Dilawar, N. ve Khan, A. N. (2017). Proniosomes derived niosomes: recent advancements in drug delivery and targeting. *Drug delivery*, 24(2), 56-69.
- Khudair, N., Agouni, A., Elrayess, M. A., Najlah, M., Younes, H. M. ve Elhissi, A. (2020). Letrozole-loaded nonionic surfactant vesicles prepared via a slurry-based proniosome technology: Formulation development and characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 101721.
- Kırtıl, E. ve Öztop, M. H. (2014). Enkapsülasyon maddesi olarak lipozom ve gıdalarda kullanımı: Yapısı, karakterizasyonu, üretimi ve stabilitesi. *Akademik Gıda*, 12(4), 41-57.
- Kietrungruang, K., Sookkree, S., Sangboonruang, S., Semakul, N., Poomanee, W., Kitidee, K., Tragoolpua, Y. ve Tragoolpua, K. (2023). Ethanolic extract propolis-loaded niosomes diminish phospholipase B1, biofilm formation, and intracellular replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages. *Molecules*, 28(17), 6224.
- Kim, H. ve Lee, D. G. (2021). Naringin-generated ROS promotes mitochondria-mediated apoptosis in *Candida albicans*. *IUBMB life*, 73(7), 953-967.

- Kim, S. R. (2017). Naringin as a beneficial natural product against degeneration of the nigrostriatal dopaminergic projection in the adult brain. *Neural Regeneration Research*, 12(8), 1375-1376.
- Ko, M. J., Kwon, H. L. ve Chung, M. S. (2016). Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Markovich) peel. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 175-181.
- Kola, P. K., Akula, A., NissankaraRao, L. S. ve Danduga, R. C. S. R. (2017). Protective effect of naringin on pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling; possible mechanisms of antikindling, memory improvement, and neuroprotection. *Epilepsy & Behavior*, 75, 114-126.
- Kong, F., Bi, Y., Yan, C. ve Zeng, Z. (2013). Orthogonal test design for optimization of the ultrasonic extraction of naringin from *Citrus grandis tomentosa*. *J. Med. Plants Res*, 7(12), 720-726.
- Kopermsub, P., Mayen, V. ve Warin, C. (2011). Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food research international*, 44(2), 605-612.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A. Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, A. R. ve Herceg, Z. 2016. "Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice", *Food Chemistry*, 190, 317-323.
- Krithika R., Leelarani Ravilla, S. Perumal, Padmini R. (2023). Formulation and characterization of Naringin-niosomes for sustained drug delivery and wound healing properties. *Journal of Advanced Zoology*, 44(3), 1579–1598.
- Kulasekaran, G. ve Ganapasam, S. (2015). Neuroprotective efficacy of naringin on 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction through the modulation of Nrf2 signaling pathway in PC12 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 409, 199-211.

- Kumar, K. ve Rai, A. K. (2012). Proniosomal formulation of curcumin having anti-inflammatory and anti-arthritic activity in different experimental animal models. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(10), 852-857.
- Kumar, V. S., Rajmane, A. R., Adil, M., Kandhare, A. D., Ghosh, P. ve Bodhankar, S. L. (2014). Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of endogenous oxidant-nitrosative balance and DNA damage in rats. *Journal of biomedical research*, 28(2), 132.
- Kumari, S. D., Chevala, N. T., Jitta, S. R., Kumar, L., Verma, R. ve Jose, J. (2022). Design and development of naringin-loaded proposomal gel for wound healing. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(10), 5187-5202.
- Lavrador, P., Gaspar, V. M. ve Mano, J. F. (2018). Bioinspired bone therapies using naringin: applications and advances. *Drug discovery today*, 23(6), 1293-1304.
- Lee, S. G., Kim, K., Vance, T. M., Perkins, C., Provatas, A., Wu, S., Qureshi, A., Cho, E. ve Chun, O. K. (2016). Development of a comprehensive analytical method for furanocoumarins in grapefruit and their metabolites in plasma and urine using UPLC-MS/MS: a preliminary study. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(8), 881-887.
- Leporini, M., Tundis, R., Sicari, V. ve Loizzo, M. R. 2021. "Citrus species: Modern functional food and nutraceutical-based product ingredient", *Italian Journal of Food Science*, 33(2), 63-107.
- Lewinska, A., Siwak, J., Rzeszutek, I. ve Wnuk, M. (2015). Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. *Toxicology in vitro*, 29(3), 417-425.
- Li, L., Zhao, J., Yang, T. ve Sun, B. (2022). High-speed countercurrent chromatography as an efficient technique for large separation of plant polyphenols: A review. *Food Research International*, 153, 110956.
- Li, Z., Jiang, H., Xu, C. ve Gu, L. (2015). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153-164.

Liang, Y., Hou, D., Ni, Z., Cao, M. ve Cai, L. (2022). Preparation, characterization of naringenin, β -cyclodextrin and carbon quantum dot antioxidant nanocomposites. Food Chemistry, 375, 131646.

Liang, Y., Huang, Z., Chen, H., Zhang, T. ve Ito, Y. (2007). Preparative isolation and purification of two closely related glycosidic flavonoids from *Exocarpium Citri Grandis* by high-speed countercurrent chromatography. Journal of liquid chromatography & related technologies, 30(3), 419-430.

Lin, F. X., Du, S. X., Liu, D. Z., Hu, Q. X., Yu, G. Y., Wu, C. C., Zheng, G. Z., Xie, D., Li X.D. ve Chang, B. (2016). Naringin promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by up-regulating Foxc2 expression via the IHH signaling pathway. American Journal of Translational Research, 8(11), 5098.

Lipinski, B., Hanson, C., Waite, R., Searchinger, T. ve Lomax, J. (2013). Reducing food loss and waste.

Liu, F., Han, S. ve Ni, Y. (2017). Isolation and purification of four flavanones from peel of *Citrus changshanensis*. Journal of Food Processing and Preservation, 41(6), e13278.

Liu, N., Li, X., Zhao, P., Zhang, X., Qiao, O., Huang, L., Guo, L. ve Gao, W. (2021). A review of chemical constituents and health-promoting effects of citrus peels. Food chemistry, 365, 130585.

Liu, X., Wan, Y., Liu, P., Fu, Y. ve Zou, W. 2018. “A novel activated carbon prepared from grapefruit peel and its application in removal of phenolic compounds”, Water Science and Technology, 77(10), 2517-2527.

Liu, Y. N., Chen, J., Xu, X., Hu, Y., Hu, J. Y., Xu, R. A. ve Lin, G. (2023). Lack of pharmacokinetic interaction between derazantinib and naringin in rats. Pharmaceutical Biology, 61(1), 514-519.

Liu, Y., Heying, E. ve Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. Comprehensive reviews in Food Science and Food safety, 11(6), 530-545.

- Liu, Z., Pan, Y., Li, X., Jie, J. ve Zeng, M. (2017). Chemical composition, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of pummelo peel flavonoid extract. *Industrial crops and products*, 109, 862-868.
- Liu, Z., Qiao, L., Gu, H., Yang, F. ve Yang, L. (2017). Development of Brönsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels. *Separation and Purification Technology*, 172, 326-337.
- Lu, W. A. N. G., Zhe, D. I. N. G., Shengmin, L. U., Hao, J. I. A. N. G., Meiyu, Z. H. E. N. G. ve Ying, Y. A. N. G. (2023). OSA-modified porous starch loading and improving bioavailability of naringin. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 35(2), 425.
- Lu, Y., Zhang, C., Bucheli, P. ve Wei, D. (2006). Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 55-63.
- Luo, X., Tian, M., Cheng, Y., Ji, C., Hu, S., Liu, H., Lu, J. ve Ren, J. (2022). Effects of simulated in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activities and potential bioaccessibility of phenolic compounds from *K. coccinea* fruits. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1024651.
- Luo, Z., Chen, G., Li, X., Wang, L., Shu, H., Cui, X., Chang, C., Zeng, A. ve Fu, Q. (2019). Molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for rapid analysis of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicine. *Journal of Separation Science*, 42(21), 3352-3362.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M. ve Mihoubi Boudhrioua, N. (2017). Phytochemical characteristics of citrus peel and effect of conventional and nonconventional processing on phenolic compounds: A review. *Food Reviews International*, 33(6), 587-619.
- Machado, N. D., Gutiérrez, G., Matos, M. ve Fernández, M. A. (2021). Preservation of the antioxidant capacity of resveratrol via encapsulation in niosomes. *Foods*, 10(5), 988.

- Macheix, J. J., Fleuriet, A. ve Sarni-Manchado, P. (2006). Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 390-399.
- Mahale, N. B., Thakkar, P. D., Mali, R. G., Walunj, D. R. ve Chaudhari, S. R. (2012). Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. *Advances in colloid and interface science*, 183, 46-54.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M. ve Cho, M. H. 2018. “Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives”, *Journal of Functional Foods*, 40, 307–316.
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R. ve Cho, M. H. (2019). Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods*, 8(11), 523.
- Mahmoud, A. M., Hernandez Bautista, R. J., Sandhu, M. A. ve Hussein, O. E. (2019). Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 5484138.
- Mai, T. C., Tran, N. T., Mai, D. T., Mai, T. T. N., Duyen, N. H. T., An, T. N. M., Alam, M., Dang, C.H. ve Nguyen, T. D. (2022). Supercritical CO₂ assisted extraction of essential oil and naringin from *Citrus grandis* peel: in vitro antimicrobial activity and docking study.
- Maity, S., Mukhopadhyay, P., Kundu, P. P. ve Chakraborti, A. S. 2017. “Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An in vitro and in vivo approach”, *Carbohydrate polymers*, 170, 124-132.
- Mallick, N. ve Khan, R. A. 2016. “Behavioral effects of *Citrus paradisi* in rats”, *Metabolic brain disease*, 31, 329-335.

- Manakas, P., Balafoutis, A. T., Kottaridi, C. ve Vlysidis, A. (2024). Sustainability assessment of orange peel waste valorization pathways from juice industries. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-20.
- Mangla, B. ve Kohli, K. (2018). Combination of natural agent with synthetic drug for the breast cancer therapy. *Int J Drug Dev Res*, 10(10), 22-26.
- Manokaran, S., AH, M. R., Keerthi, A. M., Kallapur, S. S. ve Soujanya, R. (2021). Molecular docking and pharmacokinetic studies of naturally occurring flavonoid glycosides and their activity against COVID-19 viral proteins. *SPAST Abstracts*, 1(01).
- Maqsoodlou, A., Assadpour, E., Mohebodini, H. ve Jafari, S. M. (2022). The influence of nanodelivery systems on the antioxidant activity of natural bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(12), 3208-3231.
- Marianecchi, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F., Esposito, S. ve Carafa, M. (2014). Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Advances in colloid and interface science*, 205, 187-206.
- Marianecchi, C., Rinaldi, F., Mastriota, M., Pieretti, S., Trapasso, E., Paolino, D. ve Carafa, M. (2012). Anti-inflammatory activity of novel ammonium glycyrrhizinate/niosomes delivery system: human and murine models. *Journal of controlled release*, 164(1), 17-25.
- Maurer, R. H., Burdick, E. M. ve Waibel, C. W. (1950). Distribution of naringin in Texas grapefruit.
- Memariani, Z., Abbas, S. Q., Ul Hassan, S. S., Ahmadi, A. ve Chabra, A. (2021). Naringin and naringenin as anticancer agents and adjuvants in cancer combination therapy: Efficacy and molecular mechanisms of action, a comprehensive narrative review. *Pharmacological Research*, 171, 105264.
- Mencherini, T., Campone, L., Piccinelli, A. L., García Mesa, M., Sánchez, D. M., Aquino, R. P. ve Rastrelli, L. (2013). HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. amara peel with antiedematogenic activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), 1686-1693.

- Messaoudene, L., Lovillo, M. P., Hazzit, M. ve Djebbar, R. (2018). Optimization of phenolic compounds extraction conditions from artichoke (*Cynara scolymus* L.), antioxidant activity and comparison between Folin-Ciocalteu and UV methods for total phenolic content quantification. *Annals of Oradea University, Biology Fascicle/Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 25(2).
- Michalik, A., Bauer, E., Szklarzewicz, T. ve Kaltenpoth, M. (2023). Nutrient supplementation by genome-eroded *Burkholderia* symbionts of scale insects. *The ISME Journal*, 17(12), 2221-2231.
- Misra, S. K., Ye, M., Kim, S. ve Pan, D. (2015). Defined nanoscale chemistry influences delivery of peptido-toxins for cancer therapy. *PLoS One*, 10(6), e0125908.
- Moammeri, A., Chegeni, M. M., Sahrayi, H., Ghafelehbash, R., Memarzadeh, F., Mansouri, A., Akbarzadeh, A., Abtahi, M.S., Hejabi F. ve Ren, Q. (2023). Current advances in niosomes applications for drug delivery and cancer treatment. *Materials Today Bio*, 23, 100837.
- Moghassemi, S. ve Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185, 22-36.
- Mohamed, H. 2016. "Extraction and characterization of pectin from grapefruit peels", *MOJ Food Processing & Technology*, 2(1), 31-38.
- Mohamed, S. A., Mahmoud, H. E., Embaby, A. M., Haroun, M. ve Sabra, S. A. (2024). Lactoferrin/pectin nanocomplex encapsulating ciprofloxacin and naringin as a lung targeting antibacterial nanoplatfrom with oxidative stress alleviating effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129842.
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B. ve Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022.
- Morakul, B. ve Junyaprasert, V. B. (2020). Proniosomes: An effective carrier for dermal and transdermal delivery. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 42(6), 1171-1186.

- Moret, S., Purcaro, G., Conte, L. S., Moret, S. ve Conte, L. S. (2014). Estrazione in fase solida (SPE) (pp. 127-176). Springer Milan.
- Mostafavi, M., Khazaeli, P., Sharifi, I., Farajzadeh, S., Sharifi, H., Keyhani, A., Parizi, M.H. ve Kakooei, S. (2019). A novel niosomal combination of selenium coupled with glucantime against *Leishmania tropica*. *The Korean journal of parasitology*, 57(1), 1.
- Murunga, A. N., Miruka, D. O., Driver, C., Nkomo, F. S., Cobongela, S. Z. ve Owira, P. M. (2016). Grapefruit derived flavonoid naringin improves ketoacidosis and lipid peroxidation in type 1 diabetes rat model. *PLoS One*, 11(4), e0153241.
- Nagalakshmi, S., Nivathra, V. ve Shanmuganathan, S. (2020). Fabrication of novel topical drug loaded elastic membrane vesicles of liposomes as a tool for dermal delivery in effective treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutical Research* (09752366), 12(4).
- Naggar, V. F., El Gamal, S. S. ve Allam, A. N. (2012). Proniosomes as a stable carrier for oral acyclovir: Formulation and physicochemical characterization. *J Am Sci*, 8(9), 417-28.
- Naghavi, S., Peighambaroust, S. H., Azadmard-Damirchi, S. ve Khiabani, M. S. (2016). Preparation and evaluation of nanoliposomes containing green tea extract and investigating its efficacy in extending the shelf life of fresh orange and pomegranate juices. In *Biol forum* (Vol. 8, pp. 73-87).
- Nagy, A., Harrison, A., Sabbani, S., Munson Jr, R. S., Dutta, P. K. ve Waldman, W. J. (2011). Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *International journal of nanomedicine*, 1833-1852.
- Nallamuthu, I., Ponnusamy, V., Smruthi, M. R. ve Khanum, F. (2021). Formulation of naringin encapsulation in zein/caseinate biopolymers and its anti-adipogenic activity in 3T3-L1 pre-adipocytes. *Journal of Cluster Science*, 32, 1649-1662.
- Nasseri, B. (2005). Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *International journal of pharmaceutics*, 300(1-2), 95-101.

- Natarajan, V., Krithica, N., Madhan, B. ve Sehgal, P. K. (2011). Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), 195-205.
- Negi, P. ve Jayaprakasha, G. 2001. “Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extracts”, *European Food Research and Technology*, 213, 484-487.
- Negro, V., Mancini, G., Ruggeri, B. ve Fino, D. 2016. “Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization”, *Bioresource Technology*, 214, 806-815.
- Nieman, C. (1954). Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 18(2), 147-163.
- Nishad, J., Saha, S. ve Kaur, C. (2019). Enzyme-and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8), e14046.
- Nishad, J., Singh, S. P., Singh, S., Saha, S., Dubey, A. K., Varghese, E. ve Kaur, C. 2018. “Bioactive compounds and antioxidant activity of selected Indian pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) germplasm”, *Scientia Horticulturae*, 233, 446-454.
- Niu, D., Ren, E. F., Li, J., Zeng, X. A. ve Li, S. L. (2021). Effects of pulsed electric field-assisted treatment on the extraction, antioxidant activity and structure of naringin. *Separation and Purification Technology*, 265, 118480.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. ve Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(1), 178-192.
- Nooprasit, I. (2000). Influence of Lipid Composition, Liposome Charge and PH of Hydration Medium on the Physicochemical Properties and Stability of Amphoterican B Liposomes. Mahidol University.

Norkaew, O., Thitisut, P., Mahatheeranont, S., Pawin, B., Sookwong, P., Yodpitak, S. ve Lungkaphin, A. (2019). Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. *Food chemistry*, 294, 493-502.

Oboh, G. ve Ademosun, A. O. 2012. "Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels", *Journal of food science and technology*, 49, 729-736.

Okunowo, W. O., Oyedeji, O., Afolabi, L. O. ve Matanmi, E. (2013). Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1-9.

Oliveira, P. V., Dias, J. L., Sakata, G. S., Aguiar, G. P., Kuhn, K. Z., Sanaiotto, O., Provinelli, A.C., Daniel, C.F., Bortoluzzi, A., Precisvalle, N., Siebel, A.M., Lerin, L.A., Trapella, C., Müller, L.G. ve Oliveira, J. V. (2024). Naringin processing using GAS antisolvent technique and in vivo applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 207, 106148.

Ortega, N., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J. ve Motilva, M. J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry*, 124(1), 65-71.

Ortuño, A., Garcia-Puig, D., Fuster, M. D., Perez, M. L., Sabater, F., Porras, I., Garcia-Lidon, A. ve Del Rio, J. A. (1995). Flavanone and nootkatone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 1-5.

O'sullivan, T. C., Lynch, P. B., Morrissey, P. A. ve O'Grady, J. F. (2003). Evaluation of citrus pulp in diets for sows and growing pigs. *Irish journal of agricultural and food research*, 243-253.

Özçelik, B., Kartal, M. ve Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical biology*, 49(4), 396-402.

- Özkan, G., Subaşı, B. G., Beştepe, S. K. ve Güven, E. Ç. (2022). Sürdürülebilir gıda ve tarımsal atık yönetimi. *Çevre İklim ve Sürdürülebilirlik*, 23(2), 145-160.
- Pai, D. A., Vangala, V. R., Ng, J. W., Ng, W.K. ve Tan, R. B. (2015). Resistant maltodextrin as a shell material for encapsulation of naringin: Production and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, 161, 68-74.
- Palozza, P., Muzzalupo, R., Trombino, S., Valdannini, A. ve Picci, N. (2006). Solubilization and stabilization of β -carotene in niosomes: delivery to cultured cells. *Chemistry and physics of lipids*, 139(1), 32-42.
- Pande, S., Patel, C., Beladiya, J., Kher, M. ve Dholakia, S. (2024). A spectrofluorimetric approach for the quantification of naringin in biological fluids: Method development, validation and pharmacokinetic applications. *Phytochemistry Letters*, 60, 211-218.
- Pandey, R. P., Gurung, R. B. ve Sohng, J. K. 2015. "Dietary sources, bioavailability and biological activities of naringenin and its derivatives. Apigenin and naringenin: natural sources, pharmacology and role in cancer prevention", New York: Nova Science Publishers, 151-72.
- Pando, D., Beltrán, M., Gerone, I., Matos, M. ve Pazos, C. (2015). Resveratrol entrapped niosomes as yoghurt additive. *Food chemistry*, 170, 281-287.
- Panwar, D., Panesar, P. S. ve Chopra, H. K. (2021). Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products. *Food Reviews International*, 37(1), 91-120.
- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D. J. ve Decker, E. A. (2010). Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5679-5684.
- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. ve Isac, I. (1973). Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 311(3), 330-348.

Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2007). Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5), 407-413.

Pichaiyongvongdee, S. ve Haruenkit, R. (2009). Comparative studies of limonin and naringin distribution in different parts of pummelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] cultivars grown in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 43(1), 28-36.

Pleguezuelos-Villa, M., Mir-Palomo, S., Díez-Sales, O., Buso, M. O. V., Sauri, A. R. ve Nácher, A. (2018). A novel ultradeformable liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 265-270.

Polat, D. Ç., Eyilmaz, M., Akalın, K. ve Coşkun, M. (2018). Antimicrobial activity of grapefruit seed. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 38(1), 1-3.

Prasannan, P., Suliman, H. S., ve Robertus, J. D. (2009). Kinetic analysis of site-directed mutants of methionine synthase from *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(4), 730-734.

Predescu, N. C., Papuc, C., Nicorescu, V., Gajaila, I., Goran, G. V., Petcu, C. D. ve Stefan, G. (2016). The influence of solid-to-solvent ratio and extraction method on total phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts. *Rev. Chim*, 67(10), 1922-1927.

Prevete, G., Carvalho, L. G., del Carmen Razola-Diaz, M., Verardo, V., Mancini, G., Fiore, A. ve Mazzonna, M. (2024). Ultrasound assisted extraction and liposome encapsulation of olive leaves and orange peels: How to transform biomass waste into valuable resources with antimicrobial activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 102, 106765.

Priya, H. ve Singh, H. (2012). Formulation and evaluation of niosomes containing punicalagin from peels of *punica granatum*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(6).

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J.M. ve Shpigelman, A. 2017. “Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes—A review”, *Molecules*, 22(5), 680.

Qin, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Li, Y. ve Wu, Z. (2018). Release of phenolics compounds from *Rubus idaeus* L. dried fruits and seeds during simulated in vitro digestion and their bio-activities. *Journal of Functional Foods*, 46, 57-65.

Qu, H., Zhang, Y., Qu, B., Cheng, J., Liu, S., Feng, S., Wang, Q. ve Zhao, Y. (2016). Novel immunoassay and rapid immunoaffinity chromatography method for the detection and selective extraction of naringin in *Citrus aurantium*. *Journal of separation science*, 39(7), 1389-1398.

Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A. ve González-Aguilar, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & function*, 5(6), 1063-1072.

Raafat, K., El-Darra, N., Saleh, F. A., Rajha, H. N., Maroun, R. G., ve Louka, N. (2018). Infrared-Assisted Extraction and HPLC-Analysis of *Prunus armeniaca* L. Pomace and Detoxified-Kernel and their Antidiabetic Effects. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 156-167.

Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F. ve Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.

Rajadurai, M. ve Prince, P. S. M. (2007). Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an in vivo and in vitro study. *Toxicology*, 232(3), 216-225.

Rajadurai, M. ve Prince, P. S. M. (2009). Naringin ameliorates mitochondrial lipid peroxides, antioxidants and lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(3), 358-362.

- Raman, G., Cho, M., Brodbelt, J. S., & Patil, B. S. (2005). Isolation and purification of closely related Citrus limonoid glucosides by flash chromatography. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(3), 155-160.
- Rasamiravaka, T., Vandeputte, O. M., Pottier, L., Huet, J., Rabemanantsoa, C., Kiendrebeogo, M., Andriantsimahavandy, A., Rasamindrakotroka, A., Stévigny, C., Duez, P. ve El Jaziri, M. 2015. "Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and persistence, along with the production of quorum sensing-dependent virulence factors, are disrupted by a triterpenoid coumarate ester isolated from *Dalbergia trichocarpa*, a tropical legume", *PloS one*, 10(7), e0132791.
- Rasul, A., Imran Khan, M., Ur Rehman, M., Abbas, G., Aslam, N., Ahmad, S., Abbas, K., Shah, P.A., Iqbal, M., Al Subari, A.M.A., Shaheer, T. ve Shah, S. (2020). In vitro characterization and release studies of combined nonionic surfactant-based vesicles for the prolonged delivery of an immunosuppressant model drug. *International Journal of Nanomedicine*, 7937-7949.
- Rauf, A., Shariati, M. A., Imran, M., Bashir, K., Khan, S. A., Mitra, S., Emran, T.B., Badalova, K., Uddin, Md. S., Mubarak, M.S., Aljohani, M., Alhumaydhi, F.A., Derkho, M., Korpayev, S. ve Zengin, G. (2022). Comprehensive review on naringenin and naringin polyphenols as a potent anticancer agent. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(21), 31025-31041.
- Ravaghi, M., Sinico, C., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Pini, E. ve Fadda, A. M. (2017). Proniosomal powders of natural canthaxanthin: preparation and characterization. *Food Chemistry*, 220, 233-241.
- Ravetti, S., Garro, A. G., Gaitán, A., Murature, M., Galiano, M., Brignone, S. G. ve Palma, S. D. (2023). Naringin: nanotechnological strategies for potential pharmaceutical applications. *Pharmaceutics*, 15(3), 863.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Ribeiro, I. A. ve Ribeiro, M. H. 2008. "Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method", *Food Control*, 19(4), 432-438.
- Ribeiro, M., Barateiro, A., Vila-Real, H., Fernandes, A. ve Brites, D. 2009. "Anti-inflammatory effect of naringin and naringenin on TNF- α secretion in cultured cortical astrocytes after stimulation with LPS", *New Biotechnology*, (25), S10-S11.
- Rivoira, M., Rodríguez, V., Picotto, G., Battaglini, R. ve de Talamoni, N. T. (2018). Naringin prevents bone loss in a rat model of type 1 Diabetes mellitus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 637, 56-63.
- Romano, R., De Luca, L., Aiello, A., Rossi, D., Pizzolongo, F. ve Masi, P. (2022). Bioactive compounds extracted by liquid and supercritical carbon dioxide from citrus peels. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(6), 3826-3837.
- Russo, G., Landi, R., Pezone, A., Morano, A., Zuchegna, C., Romano, A., Muller, M.T., Gottesman, M.E., Porcellini, A. ve Avvedimento, E. V. (2016). DNA damage and repair modify DNA methylation and chromatin domain of the targeted locus: mechanism of allele methylation polymorphism. *Scientific Reports*, 6(1), 33222.
- Saikia, S., Mahnot, N. K. ve Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food chemistry*, 171, 144-152.
- Samavat, Z., Shamsaie Mehrgan, M., Jamili, S., Soltani, M. ve Hosseini Shekarabi, S. P. 2019. "Determination of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract bio-active substances and its application in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) diet: Growth, haemato-biochemical parameters and intestinal morphology", *Aquaculture Research*, 50(9), 2496-2504.
- Sammour, R. M., Taher, M., Chatterjee, B., Shahiwala, A. ve Mahmood, S. (2019). Optimization of aceclofenac proniosomes by using different carriers, part 1: Development and characterization. *Pharmaceutics*, 11(7), 350.

Sangboonruang, S., Semakul, N., Obeid, M. A., Ruano, M., Kitidee, K., Anukool, U., Pringproa, K., Chantawannakul, P., Ferro, V.A., Tragoolpua, Y. ve Tragoolpua, K. (2021). Potentiality of melittin-loaded niosomal vesicles against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal skin infection. *International journal of nanomedicine*, 7639-7661.

Sant, A., Ahmad, I. ve Bhatia, S. (2022). Extraction and Hydrolysis of Naringin from Citrus fruit peels. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1263, No. 1, p. 012031). IOP Publishing.

Saura-Calixto, F., Serrano, J. ve Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food chemistry*, 101(2), 492-501.

Sawalha, S. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. ve Fernández-Gutiérrez, A. 2009. “Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS”, *Food Chemistry*, 116(2), 567-574.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.

Schlich, M., Lai, F., Pireddu, R., Pini, E., Ailuno, G., Fadda, A. M., Valenti, D. ve Sinico, C. (2020). Resveratrol proniosomes as a convenient nanoingredient for functional food. *Food chemistry*, 310, 125950.

Schmidt, S. E., Holub, G., Sturino, J. M. ve Matthew Taylor, T. (2009). Suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A in fluid milk by free and liposome-entrapped nisin. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1, 152-158.

Scott, J. ve Amich, J. (2023). The role of methionine synthases in fungal metabolism and virulence. *Essays in Biochemistry*, 67(5), 853-863

Scott, J., Sueiro-Olivares, M., Thornton, B. P., Owens, R. A., Muhamadali, H., Fortune-Grant, R., Thomson, D. ve Amich, J. (2020). Targeting methionine synthase in a fungal pathogen causes a metabolic imbalance that impacts cell energetics, growth, and virulence. *MBio*, 11(5), 10-1128.

- Secerli, J., Adatepe, Ş., Altuntas, S., Topal, G. R., Erdem, O. ve Bacanlı, M. (2023). In vitro toxicity of naringin and berberine alone, and encapsulated within PMMA nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 89, 105580.
- Sęczyk, Ł., Sugier, D., Świeca, M. ve Gawlik-Dziki, U. (2021). The effect of in vitro digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. *Food Chemistry*, 344, 128581.
- Shaghayegh Alavi, S., Hadi Razavi, S., Khodaiyan, F., Cristina Cardia, M., Lai, F., Valenti, D., Pini, E., Rosa, A., Nieddu, M. ve Fadda, A. M. (2021). Proniosomal Formulation Encapsulating Pomegranate Peel Extract for Nutraceutical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21(5), 2907-2916.
- Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H. ve Lee, Y. R. 2017. “Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches”, *Nutrition*, 34, 29-46.
- Sharma, K., Mahato, N., ve Lee, Y. R. (2019). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2), 265-284.
- Sharma, P., Vishvakarma, R., Gautam, K., Vimal, A., Gaur, V. K., Farooqui, A., Varjani, S. ve Younis, K. (2022). Valorization of citrus peel waste for the sustainable production of value-added products. *Bioresource Technology*, 351, 127064.
- Sheu, C. W. ve Freese, E. (1973). Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 115(3), 869-875.
- Shilakari, G., Singh, D. ve Asthana, A. (2013). Novel vesicular carriers for topical drug delivery and their application's. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(1), 77-86.
- Shilpa, V. S., Shams, R., Dash, K. K., Pandey, V. K., Dar, A. H., Ayaz Mukarram, S., Harsányi, E. ve Kovács, B. (2023). Phytochemical properties, extraction, and pharmacological benefits of naringin: a review. *Molecules*, 28(15), 5623.

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H. ve Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.

Shruthi, P. A., Pushpadass, H. A., Magdaline Eljeeva Emerald, F., Surendra Nath, B. ve Laxmana Naik, N. (2021). Formulation and characterization of catechin-loaded proniosomes for food fortification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(6), 2439-2448.

Singh, A., Gautam, P. K., Verma, A., Singh, V., Shivapriya, P. M., Shivalkar, S., Sahoo, A.K. ve Samanta, S. K. (2020). Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Biotechnology Reports*, 25, e00427.

Singleton, V. L. (1966). The total phenolic content of grape berries during the maturation of several varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17(2), 126-134.

Sir Elkhathim, K. A., Elagib, R. A., & Hassan, A. B. (2018). Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food science & nutrition*, 6(5), 1214-1219.

Son, H. N., Thi, V. L., Hau, Q. B., Khang, C. V. ve Cang, H. M. (2021). Process of removing the bitter taste of pomelo peel. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 306, p. 04022). EDP Sciences.

Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R. ve Bernatoniene, J. (2022). Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. *Biomedicines*, 10(7), 1686.

Stabrauskiene, J., Marksa, M., Ivanauskas, L. ve Bernatoniene, J. (2022). Optimization of naringin and naringenin extraction from *Citrus× paradisi* L. using hydrolysis and excipients as adsorbent. *Pharmaceutics*, 14(5), 890.

Stoyanova, N., Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Toshkova, R. ve Georgieva, A. (2020). Nanoparticles based on complex of berberine chloride and polymethacrylic or polyacrylic acid with antioxidant and in vitro antitumor activities. *International Journal of Pharmaceutics*, 584, 119426.

- Sudto, K., Pornpakakul, S. ve Wanichwecharungruang, S. (2009). An efficient method for the large scale isolation of naringin from pomelo (*Citrus grandis*) peel. *International journal of food science & technology*, 44(9), 1737-1742.
- Suliman, H. S., Appling, D. R. ve Robertus, J. D. (2007). The gene for cobalamin-independent methionine synthase is essential in *Candida albicans*: a potential antifungal target. *Archives of biochemistry and biophysics*, 467(2), 218-226.
- Suri, S., Singh, A. ve Nema, P. K. 2022. “Current Applications of Citrus Fruit Processing Waste: A Scientific Outlook”, *Applied Food Research*, 100050.
- Tan, C., Xia, S., Xue, J., Xie, J., Feng, B. ve Zhang, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(34), 8175-8184.
- Tang, D. M., Zhu, C. F., Zhong, S. A. ve Zhou, M. D. (2011). Extraction of naringin from pomelo peels as dihydrochalcone's precursor. *Journal of separation science*, 34(1), 113-117.
- Tareen, F. K., Shah, K. U., Ahmad, N., Asim. ur. Rehman, Shah, S. U. ve Ullah, N. (2020). Proniosomes as a carrier system for transdermal delivery of clozapine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(6), 946-954.
- Tavano, L., Vivacqua, M., Carito, V., Muzzalupo, R., Caroleo, M. C. ve Nicoletta, F. (2013). Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 803-807.
- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D. ve Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2(1), 1-9.
- Thabet, Y., Elsabahy, M. ve Eissa, N. G. (2022). Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods*, 199, 9-15.

- Tong, C., Peng, M., Tong, R., Ma, R., Guo, K. ve Shi, S. (2018). Use of an online extraction liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry method for the characterization of polyphenols in Citrus paradisi cv. Changshanhuayu peel. *Journal of Chromatography A*, 1533, 87-93.
- Toniazzi, T., Berbel, I. F., Cho, S., Fávaro-Trindade, C. S., Moraes, I. C. ve Pinho, S. C. (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT-food science and technology*, 59(2), 1265-1273.
- Tsui, V. W. K., Wong, R. W. K. ve Rabie, A. B. M. (2008). The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(3), 401-406.
- TÜİK, 2022. Türkiye İstatistik Kurumu, (<http://www.tuik.gov.tr>).
- TÜİK, 2023. Türkiye İstatistik Kurumu, (<http://www.tuik.gov.tr>).
- Tyagi, R., Waheed, A., Kumar, N., Ahad, A., Mujeeb, M., Naved, T. ve Madan, S. (2023). Application of Box–Behnken design for the optimization of Plumbago zeylanica extract-loaded niosomes: preparation, characterization and in vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1-15.
- Ueng, Y. F., Chang, Y. L., Oda, Y., Park, S. S., Liao, J. F., Lin, M. F. ve Chen, C. F. (1999). In vitro and in vivo effects of naringin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. *Life Sciences*, 65(24), 2591-2602.
- USDA, 2022, The United States Department of Agriculture, (<http://www.usda.gov>).
- Vankayala, J. S., Battula, S. N., Kandasamy, R., Mariya, G. A., Franklin, M. E. E., Pushpadass, H. A. ve Naik, L. N. (2018). Surfactants and fatty alcohol based novel nanovesicles for resveratrol: Process optimization, characterization and evaluation of functional properties in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Molecular Liquids*, 261, 387-396.

Vaz, V. M., Jitta, S. R., Verma, R. ve Kumar, L. (2021). Hesperetin loaded proposomal gel for topical antioxidant activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102873.

Venkataraman, S., Rajendran, D. S., Kumar, P. S., Rangasamy, G. ve Vaidyanathan, V. K. (2024). A Comprehensive Review on the Refinery of Citrus Peel Towards the Production of Bioenergy, Biochemical and Biobased Value-Added Products: Present Insights and Futuristic Challenges. *Waste and Biomass Valorization*, 1-22.

Verma, K., Shrivastava, D. ve Kumar, G. (2015). Antioxidant activity and DNA damage inhibition in vitro by a methanolic extract of *Carissa carandas* (Apocynaceae) leaves. *Journal of Taibah University for science*, 9(1), 34-40.

Victor, M. M., David, J. M., Sakukuma, M. C., França, E. L. ve Nunes, A. V. (2018). A simple and efficient process for the extraction of naringin from grapefruit peel waste. *Green Processing and Synthesis*, 7(6), 524-529.

Vilet, N. Z., Gué, E., Servent, A., Delalonde, M. ve Wisniewski, C. (2020). Filtration-compression step as downstream process for flavonoids extraction from citrus peels: Performances and flavonoids dispersion state in the filtrate. *Food and Bioproducts Processing*, 120, 104-113.

Wang, Q., Luo, J., Liu, H., Brennan, C. S., Liu, J. ve Zou, X. (2019). Protective effects of the flavonoid fraction obtained from pomelo fruitlets through ultrasonic-associated microwave extraction against AAPH-induced erythrocyte hemolysis. *RSC advances*, 9(28), 16007-16017.

Wang, S., Zhao, K., Zang, W., Zhang, Q., Zhao, X., Zhao, M., He, X., Liu, Q., Feng, W. ve Zheng, X. (2014). Highly selective screening of the bioactive compounds in Huoxue capsule using immobilized β 2-adrenoceptor affinity chromatography. *Analytical biochemistry*, 457, 1-7.

Wechtersbach, L., Ulrih, N. P. ve Cigić, B. (2012). Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT-food science and technology*, 45(1), 43-49.

- Wedamulla, N. E., Fan, M., Choi, Y. J. ve Kim, E. K. (2022). Citrus peel as a renewable bioresource: Transforming waste to food additives. *Journal of Functional Foods*, 95, 105163.
- Wheatley, R. W., Ng, K. K. ve Kapoor, M. (2016). Fungal cobalamin-independent methionine synthase: Insights from the model organism, *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 590, 125-137.
- Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K. ve Cameron, R. G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource technology*, 98(8), 1596-1601.
- Wu, H., Calvarano, M. ve Giacomo, A. D. (1991). Pilot plant manufacture of naringin dihydrochalcone and neohesperidin dihydrochalcone. *Ess Derivati Agrumari*, 61, 56-60.
- Xu, Y. Q., Chen, W. R., Tsosie, J. K., Xie, X., Li, P., Wan, J. B., He, C.W. ve Chen, M. W. (2016). Niosome encapsulation of curcumin: characterization and cytotoxic effect on ovarian cancer cells. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Yadav, M., Sehrawat, N., Singh, M., Upadhyay, S. K., Aggarwal, D. ve Sharma, A. K. (2020). Cardioprotective and hepatoprotective potential of citrus flavonoid naringin: Current status and future perspectives for health benefits. *Asian J. Biol. Life Sci*, 9(1), 1-5.
- Yan, Y., Zhou, H., Wu, C., Feng, X., Han, C., Chen, H., Liu, Y. ve Li, Y. (2021). Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of synephrine, naringin, and neohesperidin from *Citrus aurantium* L. fruitlets. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 780-791.
- Yayintas, O. T. ve Demir, N. (2021). Determination of antioxidant activity and DNA damage protection of *Marchantia polymorpha* L. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 3420–3425.
- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M. ve Lin, C. C. (2009). Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharmaceutical research*, 26, 893-902.

- Yilmaz, E., Aydeniz Guneser, B. ve Ok, S. (2019). Valorization of grapefruit seeds: cold press oil production. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 2713-2724.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M. ve Patil, B. S. 2005. "Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins", *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2009-2014.
- Yu, X. L., Meng, X., Yan, Y. D., Han, J. C., Li, J. S., Wang, H. ve Zhang, L. (2023). Optimisation of the Extraction Process of Naringin and Its Effect on Reducing Blood Lipid Levels In Vitro. *Molecules*, 28(4), 1788.
- Yuksel, N., Bayindir, Z. S., Aksakal, E. ve Ozcelikay, A. T. (2016). In situ niosome forming maltodextrin proniosomes of candesartan cilexetil: in vitro and in vivo evaluations. *International journal of biological macromolecules*, 82, 453-463.
- Z. Shilei, W. Hongfei ve D. Jiexiong (2006). *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*.
- Zafar, A., Alsaidan, O. A., Elkomy, M. H., Imam, S. S., Yasir, M., Alharbi, K. S. ve Khalid, M. (2023). Formulation and optimization of Naringin polymeric nanoparticles: Optimization to in vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 88, 104978.
- Zarate-Vilet, N., Wisniewski, C., Gué, E. ve Delalonde, M. (2020). Towards a better identification of naringin and narirutin dispersion state in grapefruit peel press liquor. *Chemical Engineering Research and Design*, 159, 205-214.
- Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G. ve Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste management*, 80, 252-273.
- Zhang JiuXu, Z. J. (2007). Flavonoids in grapefruit and commercial grapefruit juices: concentration, distribution, and potential health benefits.

Zhang, J., Sun, C., Yan, Y., Chen, Q., Luo, F., Zhu, X., Li, X. ve Chen, K. (2012). Purification of naringin and neohesperidin from Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit and their effects on glucose consumption in human HepG2 cells. *Food Chemistry*, 135(3), 1471-1478.

Zhang, W., Song, J., He, Q., Wang, H., Lyu, W., Feng, H., Xiong, W., Guo, W., Wu, J. ve Chen, L. 2020. "Novel pectin based composite hydrogel derived from grapefruit peel for enhanced Cu (II) removal", *Journal of hazardous materials*, 384, 121445.

Zhao, B. T., Kim, E. J., Son, K. H., Son, J. K., Min, B. S. ve Woo, M. H. (2015). Quality evaluation and pattern recognition analyses of marker compounds from five medicinal drugs of Rutaceae family by HPLC/PDA. *Archives of pharmacal research*, 38, 1512-1520.

Zheng, H., Zhang, Q., Quan, J., Zheng, Q. ve Xi, W. (2016). Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. *Food chemistry*, 205, 112-121.

Zheng, M., Zhang, W. ve Lu, S. (2024). The characterization of the pectin/alginate nanoparticle for encapsulation of hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringin and its effects on cellular uptake and oxidative stress in Caco-2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130398.

Zochedh, A., Chandran, K., Priya, M., Sultan, A. B. ve Kathiresan, T. (2023). Molecular simulation of naringin combined with experimental elucidation–Pharmaceutical activity and Molecular docking against Breast cancer. *Journal of Molecular Structure*, 1285, 135403.

Zubairu, Y., Negi, L. M., Iqbal, Z. ve Talegaonkar, S. (2015). Design and development of novel bioadhesive niosomal formulation for the transcorneal delivery of anti-infective agent: In-vitro and ex-vivo investigations. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 10(4), 322-330.