



Hesperidin Mikroemülsiyonunun Bazı Standart (ATCC) Gram Negatif Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Etkinliğinin Tespiti

Mukaddes Barel^{1,a}

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
ORCID: ^a0000-0002-1170-8632

Sorumlu yazar: Mukaddes BAREL; E-posta: mukaddesbarel@erciyes.edu.tr

Atif yapmak için: Barel M. Hesperidin mikroemülsiyonunun bazı standart (ATCC) Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğinin tespiti. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2024; 21(3):143-147

Öz: Sentetik antibiyotiklere karşı artan antimikrobiyal direnç, doğal olarak oluşan bileşiklerin etkili antibakteriyel ajanlar olarak kullanılması bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. Doğal olarak oluşan bileşiklerden Hesperidin'in farklı patojen bakterilere karşı da etkili olabileceği, bakteriyel büyümeyi doğrudan engelleyebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, Hesperidin'in bazı ATCC suşlarına (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Salmonella enteritidis* NCTC, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966) karşı etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan minimal inhibisyon konstrasyon (MİK) testi sonuçlarına göre Hesperidin için *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine ait MİK değerleri 128 µg/mL iken, *A. hydrophila* bakterisine ait MİK değeri 64 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, pozitif kontrol kolistin için *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. hydrophila* bakterilere ait MİK değerleri 0.5 µg/mL olarak belirlenirken, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* bakterilerine ait MİK değerleri sırasıyla 0.5 ve 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları Hesperidin'in özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde koruyucu ve alternatif bir antibakteriyel tedavi seçeneği olarak yenilikçi kanıtlar sunabilir.

Anahtar kelimeler: Gram negatif bakteri, Hesperidin, minimal inhibitör konsantrasyon

Determination of Antimicrobial Activity of Hesperidin Microemulsion Against Some Standard (ATCC) Gram Negative Bacteria

Abstract: Increasing antimicrobial resistance to synthetic antibiotics has attracted the interest of scientists in using naturally occurring compounds as effective antibacterial agents. It has been stated that hesperidin can also be effective against different pathogenic bacteria and can directly inhibit bacterial growth. This study aimed to determine the effectiveness of Hesperidin against various ATCC strains (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. enteritidis* NCTC, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *A. hydrophila* ATCC 7966). According to the MIC test results, the minimal inhibitory concentration (MIC) values of *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* and *K. pneumoniae* bacteria for hesperidin were determined as 128 µg/mL, while the MIC value of *A. hydrophila* bacteria was determined as 64 µg/mL. In addition to these results, the MIC values for colistin for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *A. hydrophila* bacteria were determined as 0.5 µg/mL, while the MIC values for *E. coli* O157:H7 and *S. enteritidis* bacteria were 0.5 and 1 µg/mL, respectively. was determined as. These study results provide innovative evidence for hesperidin as a preventive and alternative antibacterial treatment, especially in aquaculture.

Keywords: Gram negative bacteria, Hesperidin, minimal inhibitory concentration

Giriş

Hesperidin (C₁₆H₁₄O₆) 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksi flavanon olarak adlandırılmaktadır. Flavonoidler, bitkilerin farklı kısımlarında geniş çapta dağılan, düşük molekül ağırlıklı polifenolik bitki hücrelerinde bulunan ve tat ve renkten sorumlu olan bir grup bileşiklerdir. Hesperidin, flavonoidlerin flavanon grubuna ait olup, aglikon kısmı ve rutinoz adı verilen bir disakkarit kısmından (glikoz ve ramnoz) oluşmaktadır. Hesperidin, portakal, turunc, limon, greylift gibi turunçgillerin farklı kısımlarından, özellikle beyaz kabuklarından önemli miktarlarda doğal olarak elde edilebilmektedir.

Gram negatif bakteriler arasında 1970'lerde başlayan antibiyotik direncindeki artan artış, kritik bir küresel kriz haline gelmiştir. Son yıllardaki önemli sorun, spesifik patojenleri, özellikle de hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan, insanlar arasında yayılma potansiyeli olan ve farklı antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş patojenleri tedavi etmek için kullanılabilecek olası alternatiflerin tükenmesidir. Söz konusu bu sebebe yönelik olarak ilaç endüstrisinde yeni antibiyotiklerin keşfinin azalması ile kolistin antibiyotiğine yeniden ilginin artmasına yol açmıştır. Bu bağlamda kolistin Gram negatif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı kullanılmak üzere yeniden ortaya çıkmıştır (Falagas ve ark., 2005; Bialvaei ve ark., 2015). Son yıllarda sentetik antibiyotiklere karşı artan antimikrobiyal direnç, doğal olarak oluşan bileşiklerin etkili

antibakteriyel ajanlar olarak kullanılmasına neden olmuştur (Guazelli ve ark., 2021). Birçok rapor, Hesperidin'in farklı patojen bakterilere karşı da etkili olabileceğini, bakteriyel büyümeyi doğrudan engelleyebileceğini veya virülens genlerini eksprese ederek dolaylı olarak etki ettiğini göstermiştir (Corciova ve ark., 2015; Farhadi ve ark., 2019; González ve ark., 2021; Suriyaprom ve ark., 2022). Truchado ve ark. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada, glikosile flavanonlar (naringin, hesperidin ve neohesperidin) bakımından zengin ekstraktın *Chromobacterium violaceum* ve *Yersinia enterocolitica* üzerindeki inhibitör etkisi test edilmiş ve portakal ekstraktının ve ana flavanon bileşenlerinin *Chromobacterium violaceum* bakterisinde çekirdek algılamayı engellediği rapor edilmiştir (Truchado ve ark., 2012). Ayrıca Hesperidin'in *Yersinia enterocolitica* bakterisinde çevreye salgıladığı laktonların seviyesini azalttığı ve bakteri üremesini inhibe etmeden, biyofilm üretimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Bouyahya ve ark., 2022; Chaieb ve ark., 2022). Hesperidin'in farklı merkezi sinir sistemi (MSS) bozukluklarında önemli antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkiler sağladığı belirtilmiştir (Ikram ve ark., 2019; Muhammad ve ark., 2019). Ayrıca Hesperidin ile yapılan bir çalışmada insanlarda lipopolisakkarid kaynaklı hafıza bozukluğunu in vitro ve in vivo olarak azalttığı rapor edilmiştir (Muhammad ve ark., 2019). Yapılan başka çalışmada streptozotosin verilen diyabetik ve Parkinson hastalığı olan farelerde Hesperidin'in antidepresif etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir (Muhammad ve ark., 2019; Antunes ve ark., 2020). Hesperidin aynı zamanda yukarıda belirtilenler dışında UV koruması, yara iyileşmesi ve kutanöz fonksiyonlar ve iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu hasara karşı radyokoruyucu koruma gibi diğer yararlı sağlık etkileriyle de ilişkilendirilmiştir. Kılcal kırılabilirliği azalttığı bu sebeple venöz dolaşım bozukluklarının (bacaklarda şişme, ağrı, gece krampları) ve akut hemoroidal atağa bağlı semptomların tedavisinde bazı araştırmacılar tarafından tavsiye edilmiştir (Hu ve ark., 2018; Fraga ve ark., 2019; Man ve ark., 2019; Musa ve ark., 2019). Bu çalışmada, Hesperidin'in çeşitli bakterilere (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. enteritidis* NCTC, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *A. hydrophila* ATCC 7966) karşı antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Antibakteriyel etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan Hesperidin (Sigma-Aldrich Katalog no.520-26-3) ve kolistin (Sigma-Aldrich, Katalog no: C4461) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Stok solüsyonları 100mL/mg dimetil sülfat oksit (DMSO) ile hazırlanmıştır (Karayıldırım, 2017).

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Hesperidin'in antibakteriyel aktivitesi, beş farklı Gram negatif bakterisi (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. enteritidis* NCTC, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *A. hydrophila* ATCC 7966) kullanılarak test edilmiştir. Söz konusu suşlar Blood Agar'a (Merck, Germany Katalog no: 103879) ekilerek 37°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Analize tabi tutulan ATCC suşlar aracı firmadan (Elips laboratuvar ürünleri San. Ve Tic. Ltd. Şti) temin edilmiştir (Karayıldırım, 2017).

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) testi

MİK'in belirlenmesi, CLSI (2007) tarafından açıklanan mikrodilüsyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Kanlı Agarda (Merck, Germany Katalog no: 103879) 37°C'de 18-24 saat boyunca üreyen bakteriler 1:100 (h/h) oranında ayarlanan Mueller Hinton broth (Merck, Germany, Katalog no: 103872) içerisine inokule edilerek McFarland (0.5 CFU/1.5X10⁸) standartına göre ayarlanmıştır. Hazırlanmış Hesperidin stok solüsyonları 96 kuyucuklu mikrotitre platelerine (ISOLAB) daha önceden eklenmiş broth üzerine inokule edilmiştir. Kuyuculardaki Hesperidin konsantrasyonları 256 ile 0.5 µg/mL arasında değişmiştir. Son kuyucukta ise negatif kontrol olarak 100 µL broth ve 100µL bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Tüm plate-lerin üzeri steril bir plate kapağı ile kapatılarak ve 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklarda mevcut süspansiyonlar Mueller Hinton agarda (Merck, Germany, Katalog no:103872) ekilerek inkübasyona bırakılmıştır. Hesperidin mikroemülsiyonunun etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla kolistin antibiyotigi kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanan kolistin antibiyotik stok solüsyonları kuyucuklarda 4 ile 0.36 µg/mL arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

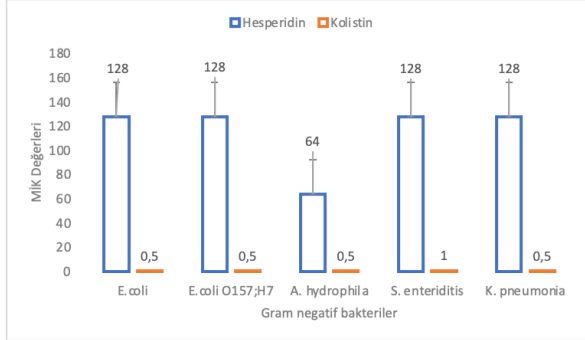
İstatistiksel analiz

Hesperidin'in beş farklı bakteriye karşı MİK değerlerinin sonuçları, Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, ABD) kullanılarak ortalama+standart sapma cinsinden ifade edilmiştir. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar T-testi (Windows 11 için SPSS; one way ANOVA) ile belirlenmiştir.

Bulgular

Yapılan MİK testi sonuçlarına göre Hesperidin için *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine ait MİK değerleri 128 µg/mL iken, *A. hydrophila* bakterisine ait MİK değeri 64 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, kolistin için *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. hydrophila* bakterilerine ait MİK değerleri 0.5 µg/mL olarak belirlenirken, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* bakterilerine ait MİK değerleri sırasıyla 0.5 ve 1 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonucunda MİK yöntemi sonuçlarına göre Gr (-) bak-

teriler arasında MİK değerleri açısından istatistiksel farklılık olmadığı görüldü ($P>0,05$).



Şekil 1. Çeşitli Gram negatif standart bakterilere göre belirlenen Hesperidin ve Colistin MİK değerleri (µg/mL).

Tartışma ve Sonuç

Hesperidin antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyel özellikleriyle bilinen bir flavanondur. Ek olarak, önemli oranda tıbbi değere sahip olduğu ve antimikrobiyal, analjezik ve immünomodülatör olduğu farmakolojik olarak kanıtlanmıştır (Yamamoto ve ark., 2000; Gar ve ark., 2001).

Bu çalışmada Hesperidin'in *A. hydrophila* için MİK değeri 64 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucuna benzer olarak, Abuelsaad ve ark. (2013) tarafından Hesperidin'in *A. hydrophila* bakterisine karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada MİK değerlerinin 100-12.5 mg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Mevcut çalışmamızda Hesperidin'in *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve *K. pneumoniae* bakterileri için MİK değerleri 128 µg/mL olarak bulunmuştur. Balakrishnan ve ark. (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı Hesperidin'in MİK₅₀ değerinin 92.17±3.71 µg/mL aralığında olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda Hesperidin'in *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* bakterileri için MİK değerleri 128 µg/mL bulunmuştur. Bu çalışma sonucundan farklı olarak, Yi ve ark. (2008) Hesperidin ile yapılan bir çalışmada *E. coli* ve *S. typhi* bakterilerine ait MİK değerlerinin 800 µg/mL olarak bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, Abass ve ark. (2014) *E. coli* ve *S. typhi* bakterilerine ait MİK değerlerini 175-450 µg olarak bulmuştur. Bu çalışmadan farklı olarak Hesperidin'in antimikrobiyel etkisinin araştırıldığı çalışmada *Helicobacter pylori* bakterisine ait MİK değerinin >200 µM olarak bildirilmiştir (Moon ve ark., 2013).

Klinik açıdan önemli Gram-negatif bakteriler arasında çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması, kolistin gibi eski antibiyotiklerin yeniden klinik kullanımını artırmıştır. Söz konusu bu artış, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Klebsiella* spp. gibi Gram-negatif patojen bakterilerde kolistin direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Gram

negatif bakterilerde kolistin antibiyotik direnç mobil elementlerde bulunmasının mutasyonların yanı sıra kromozomal mutasyonların aracılık ettiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2016; Xavier ve ark., 2016). Bu durum hem hasta bakımı hem de epidemiyolojik süreyans için klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından standartlaştırılmış in vitro duyarlılık testlerine olan acil ihtiyacın önemini artırmıştır. Bununla birlikte, kolistin kationik yapısı, plastiğe afinitesi ve agarda zayıf yayılabilirliği gibi doğal özellikleri nedeniyle standartlaştırılmış in vitro duyarlılık testlerini zorlaştırmıştır (Sader ve ark., 2012; Hindler ve Humphries, 2013).

Bu çalışmada kolistin için *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. hydrophila* bakterilere ait MİK değerleri 0.5 µg/mL olarak belirlenirken, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* bakterilerine ait MİK değerleri sırasıyla 0.5 ve 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucuna benzer olarak, yapılan bir çalışmada *E. coli* ve *P. aeruginosa* için MİK değerlerini 0.5-4 µg/ml ve 1-2 µg/ml olarak bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* için MİK değerleri sırasıyla 8-0.25 µg/ml ve 32-0.5 µg/ml aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Matuschek ve ark., 2018). Ancak, bu çalışma sonucundan yüksek olarak, Tan ve Ng, (2006) tarafından yapılan çalışmada ise *E. coli* ve *K. pneumoniae* için MİK değerleri sırasıyla MIC90 ≤2 mg/L ve MIC90 ≤1 mg/L olarak rapor edilmiştir. Buna ek olarak Esposito ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *K. pneumoniae* suşları için MİK değerlerinin 4-256 mg/L aralığında değiştiği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise *E. coli* ve *S. enterica* bakterilerine ait MİK değerleri 0.5 µg/mL ve 8 µg/mL olarak bildirilmiştir (Morales ve ark., 2012). Mevcut çalışmamız Hesperidin mikromülsiyonunun nispeten yüksek bir antibakteriyel tepkiye sahip olduğunu göstermiştir. Buna karşın daha önce yapılan çalışmada Hesperidin'in Gram negatif bakterilere karşı nispeten daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Basile ve ark., 2000). Ayrıca Hesperidin ile ön tedavinin farelerde enfeksiyonun neden olduğu endotoksik şoku baskılayabildiği ve enfeksiyon sırasında bakteri kolonilerini azaltabildiği gösterilmiştir (Kawaguchi ve ark., 2004).

Sonuç olarak, bu çalışma Hesperidin'in *A. hydrophila* üremesini önemli oranda azalttığını göstermiştir. Buna ilaveten, Hesperidin'in özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde koruyucu ve alternatif bir antibakteriyel tedavi seçeneği olabileceğine ilişkin yenilikçi kanıtlar sunulabilir.

Kaynaklar

Abass EH, Zair SK, Mohammad TK, Nagem SA. Recovery of pure Hesperidin from Iraqi Sweet Oranges Peel and study the effect in some bacteria. Baghdad Sci J 2014; 11(2): 455-60.

Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solamani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities

- of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sci* 2013; 93(20): 714-22.
- Antunes MS, Cattelan Souza L, Ladd FVL, Ladd AABL, Moreira AL, Bortolotto VC, Araújo SM, Prigol M, Nogueira CW, Boeira SP. Hesperidin ameliorates anxiety-depressive-like behavior in 6-OHDA model of Parkinson's disease by regulating striatal cytokine and neurotrophic factors levels and dopaminergic innervation loss in the striatum of mice. *Mol Neurobiol* 2020; 57: 3027-41.
- Balakrishnan, K, Casimeer SC, Ghidan AY, Al Antary TM, Singaravelu A. Exploration of antioxidant, antibacterial activities of green synthesized hesperidin loaded PLGA nanoparticles. *Biointerface Res Appl Chem* 2021; 11(6): 14520-28.
- Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo CR, Vuotto ML, Ferrara L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 2000; 1: 110-6.
- Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Med Res Opinion* 2015; 31(4): 707-21.
- Bouyahya A, Chamkhi I, Balahbib A, Rebezov M, Shariati MA, Wilairatana P, El Omari N. Mechanisms, anti-quorum-sensing actions, and clinical trials of medicinal plant bioactive compounds against bacteria: A comprehensive review. *Molecules* 2022; 27(5): 1484.
- Chaieb K, Kouidhi B, Hosawi SB, Baothman OA, Zamzami MA, Altayeb HN. Computational screening of natural compounds as putative quorum sensing inhibitors targeting drug resistance bacteria: Molecular docking and molecular dynamics simulations. *Comput Biol Med* 2022; 145: 105517.
- Corciova A, Ciobanu C, Poiata A, Mircea C, Nicolescu A, Drobova M, Marangoci N. Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin: β -cyclodextrin complexes obtained by different techniques. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem* 2015; 81: 71-84.
- Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cucurullo S, Imperi F, Zarrilli R. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. *Front Microbiol* 2018; 9: 1463.
- Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahi M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. *Phytother Res* 2019; 33(1): 13-40.
- Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., Saravolatz, L. D. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinic Infect Dis* 2005; 40(9): 1333-41.
- Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 2019; 10(2): 514-28.
- Gar A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Res* 2001; 15: 655-69.
- González A, Casado J, Lanas Á. Fighting the antibiotic crisis: Flavonoids as promising antibacterial drugs against *Helicobacter pylori* infection. *Front Cell Infect Microbi* 2021; 11: 709749.
- Guazelli CF, Fattori V, Ferraz CR, Borghi SM, Casagrande R, Baracat MM, Verri Jr WA. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. *Chem Biol Interact* 2021; 333: 109315.
- Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013; 51(6): 1678-84.
- Hu Y, Li Y, Zhang W, Kou G, Zhou Z. Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in arabic gum-stabilized microcapsules: Modulation of whey protein concentrate. *Food Hydrocoll* 2018; 77: 588-97.
- Ikram M, Muhammad T, Rehman SU, Khan A, Jo MG, Ali T, Kim MO. Hesperetin confers neuroprotection by regulating Nrf2/TLR4/NF- κ B signaling in an A β mouse model. *Mol Neurobiol* 2019; 56: 6293-309.
- Kawaguchi K, Kikuchi S, Hasunuma R, Maruyama H, Yoshikawa T, Kumazawa YA. Citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 679-83.
- Karayıldırım ÇK. Characterization and in vitro evolution of antibacterial efficacy of novel hesperidin microemulsion. *Celal Bayar Univ J Sci* 2017; 13(4): 943-7.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16(2): 161-8.
- Man MQ, Yang B, Elias PM. Benefits of hesperidin for cutaneous functions. *J Evid Based Complement Altern Med* 2019: 2676307.
- Matuschek E, Ahman J, Webster C, Kahlmeter G.

- Antimicrobial susceptibility testing of colistin-evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinic Microbiol Infect* 2018; 24(8): 865-70.
- Moon SH, Lee JH, Kim KT, Park YS, Nah SY, Ahn DU, Paik HD. Antimicrobial effect of 7-O-butylnaringenin, a novel flavonoid, and various natural flavonoids against *Helicobacter pylori* strains. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(11): 5459-69.
- Morales AS, Fragoso de Araújo J, de Moura Gomes VT, Reis Costa AT, Prazeres Rodrigues DD, Porfida Ferreira TS, Rodrigues DP Ferreira TSP, De Lima Filsner PHN, Felizardo MR, Micke Moreno A. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* Enterica strains isolated from swine in Brazil. *Sci World J* 2012: 109795.
- Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling. *Nutrients* 2019; 11(3): 648.
- Musa AE, Omyan G, Esmaily F, Shabeeb D. Radioprotective effect of hesperidin: A systematic review. *Medicina* 2019; 55(7): 370.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard-Eighth Edition, Wayne, Pennsylvania: NCCLS Document M7-A6, 2007.
- Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(4): 412-4.
- Suriyaprom S, Mosoni P, Leroy S, Kaewkod T, Desvaux M, Tragoolpua Y. Antioxidants of fruit extracts as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *Antioxidants* 2022; 11(3): 602.
- Tan TY, Ng SY. The in-vitro activity of colistin in Gram-negative bacteria. *Singapore Med J* 2006; 47(7): 621.
- Truchado P, Gimenez-Bastida JA, Larrosa M, Castro-Ibáñez I, Espín JC, Tomas-Barberan FA, MT, Alende A. Inhibition of quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. *J Agric Food Chem* 2012; 60(36): 8885-94.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* 2016; 21(27): 30280.
- Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, Oninami H, Shibuya Y, Suzuki A, Hase T, Shimotoyodome A. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activity of extract from *Castanea sativa* leaves, *Fitoterapia* 2000; 71: 110-6.
- Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng B. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT* 2008; 41(4): 597-603.

