

**Atf İçin:** Erdoğan, S.F., Durmuş, Ş.N. ve Özdemir S. (2023). *Cistus creticus* ekstrelerinin kontrollü salımını gerçekleştiren katı lipid nanopartiküllerin (KLN) geliştirilmesi ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2505-2515.

**To Cite:** Erdoğan, S.F., Durmuş, Ş.N. & Özdemir S. (2023). Development of controlled release of *Cistus creticus* extracts loaded solid lipid nanoparticles (SLN) and investigation their antimicrobial activities. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2505-2515.

### ***Cistus creticus* Ekstrelerinin Kontrollü Salımını Gerçekleştiren Katı Lipid Nanopartiküllerin (KLN) Geliştirilmesi ve Antimikrobiyal Etkinliklerinin Araştırılması**

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ<sup>1\*</sup>, Şerife Nur DURMUŞ<sup>1</sup>, Saniye ÖZDEMİR<sup>1</sup>

#### **Öne Çıkanlar:**

- Bitki ekstresi
- Mikroorganizma
- Nanopartikül

#### **Anahtar Kelimeler:**

- Antimikrobiyal aktivite
- *Cistus creticus*
- Katı lipid nanopartikül (KLN)

#### **ÖZET:**

Bu çalışmanın amacı, tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan *Cistus creticus* ekstreleri yüklü kontrollü salım yapabilen katı lipid nanopartikül sistemleri geliştirmek ve bu sistemlerin patojen test mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğini araştırmaktır. Çalışma kapsamında *C. creticus* yapraklarından etanol ve su ekstresi ultrasonik yöntem kullanılarak elde edilmiştir. Bu ekstrelerinin yüklü olduğu katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyonu SEM, DLS analizleri ve zeta potansiyelleri, in vitro salım profilleri ile değerlendirilmiştir. Etanol ve su ekstreleri yüklü katı lipid nanopartiküllerin boyutları sırasıyla 40-90 nm, zeta potansiyelleri -35.5 ve -30.7 mV ve PDI değerleri 0.455 ve 0.475 olarak saptanmıştır. Elde edilen katı lipid nanopartiküllerin patojen test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) üzerindeki MİK değerleri 1.56-25 mg/mL aralığında değişiklik göstermektedir. Kuyu difüzyon testi sonuçlarına göre ekstre yüklü katı lipid nanopartiküllere karşı mikroorganizmalar, duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal etki etanol ekstresi yüklü nanopartiküller için zon çapı 19±0.75 olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115'e karşı tespit edilmiştir.

### **Development of Controlled Release of *Cistus creticus* Extracts Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Investigation of Their Antimicrobial Activities**

#### **Highlights:**

- Microorganism
- Nanoparticle
- Plant extract

#### **Keywords:**

- Antimicrobial activity
- *Cistus creticus*
- Solid lipid nanoparticle (SLN)

#### **ABSTRACT:**

This study aims to investigate the development extracts of *Cistus creticus* which is among medicinal and aromatic plants loaded with controlled delivery solid lipid nanoparticle systems and to investigate the antimicrobial activity of these systems against pathogen test microorganisms. Within the scope of this study, ethanol and water extracts from *Cistus creticus* leaves were obtained by using the ultrasonic method. The characterization of plant extracts loaded with solid lipid nanoparticles was evaluated by SEM, DLS analyses, and zeta potentials, in vitro release profiles. The sizes of ethanol and water plant extracts loaded solid lipid nanoparticles are respectively 40-90 nm, zeta potentials -35.5 and -30.7 mV and PDI values 0.455 and 0.475 were determined. The MIC values of the obtained solid lipid nanoparticles on pathogenic test microorganisms (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) were determined as in the range of 56-25 mg/mL. According to the results of the good diffusion test, microorganisms were determined as susceptible, moderately sensitive, and resistant to the extract-loaded solid lipid nanoparticles. The highest antimicrobial effect was determined against *L. monocytogenes* ATCC 19115 with a zone diameter of 19±0.75 for ethanol extract-loaded nanoparticles.

<sup>1</sup> Sevim Feyza ERDOĞMUŞ (Orcid ID: 0000-0002-4319-7558), Şerife Nur DURMUŞ (Orcid ID: 0009-0004-3790-9952), Saniye ÖZDEMİR (Orcid ID: 0009-0006-7890-1177), Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, e-mail: feyza.erdogmus@afsu.edu.tr

## GİRİŞ

Türkiye kuzey yarım kürenin ılıman kuşağında yer almakta olup üç farklı coğrafi bölgenin (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz) kesişme noktasında konumlanır (Davis, 1965). Ülkemizin bu jeopolitik konumu çok sayıda bitki gen kaynağına ev sahipliği yapmasına, floristik açıdan zengin ve değişik vejetasyon tiplerinin varlığına olanak sağlar. Tıbbi ve aromatik bitkiler, sahip oldukları biyoaktif bileşenler sayesinde sadece gıda ve kozmetik amaçlı olarak değil aynı zamanda hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılırlar (Velsankar ve ark., 2020; Bhatia ve ark., 2020; Mokhtari ve ark., 2023). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılır fakat antibiyotiklerin yanlış ve aşırı kullanımları sonucunda mikroorganizmalarda antibiyotik direnci gelişebilir (Liu ve ark., 2017). Tıbbi ve aromatik bitkiler, içerdikleri biyoaktif bileşenler ve sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması sebebiyle antibiyotiklere alternatif antimikrobiyal etkili maddeler aranması ve geliştirilmesi amacıyla araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Ho ve ark., 2010; Saddiqa ve ark., 2010; Dash ve ark., 2011; Liu ve ark., 2017; Bouarab-Chibane ve ark., 2019; Ganaie 2021; Fierascu ve ark., 2021; Bakrim ve ark., 2022; Sarıkürkcü ve Tilili, 2022; Snoussi ve ark., 2022). Yapılan çalışmalarda, tek bir antibiyotikle tedavi edilmesi zor olan mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliğine karşı bitki içeriğindeki çok sayıda bileşenin sinerjik etkisinden dolayı bitkilerin tedavi amaçlı olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Shanthi-Sree ve ark., 2010). Bugüne kadar tıbbi ve aromatik bitkilerin ekstrelerinin antimikrobiyal etkinliğine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen ekstreler ile yüklenmiş nanopartiküllerin patojen mikroorganizmalar üzerine olan etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan, *Cistus creticus*, Cistaceae (Ladengiller) familyası içinde yer alır, bodur ve çalı biçimindedir ve çiçeğinin rengine göre tanımlanır. Türkiye’de genellikle halk arasında tüylü laden, pembe laden olarak isimlendirilen, *C. creticus* türü halk arasında peptik ülser, diyare, yüksek ateş, romatizmal hastalıklar, idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Şükran, 2021).

Nanopartiküller, çözünürlüğü düşük olan ilaç/etken maddelerin çözünürlüğünü arttıran, hedeflendirebilen ve biyoyumluluğunu geliştiren akıllı ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılır. Ekstrelerinin nanopartikül taşıma sistemlerine yüklenmesi onların etkinliğini arttırmada ve kontrollü salınım yapılmasına imkân sağlaması bakımından önemlidir. Konvansiyonel ilaç salım sistemleri vücutta belirli bir etkinliğe sahip olmakla beraber bazı durumlarda yan etkilere sebep olması, biyolojik parçalanmalarının düşük ve etkinliklerinin geçici olması sebebiyle verimli olamayabilir (Liechty ve ark., 2010). Bu gibi sorunların çözümünde nanoteknolojik yöntemler oldukça avantajlıdır. Kontrollü salım gerçekleştiren akıllı ilaç taşıma sistemleri arasında yer alan nanopartikül sistemler ilaç sektöründe oldukça önemli rol oynamaktadır (Gürsoy, 2002; Wickham, 2003; Soloviev, 2007; Değim, 2011). Nanopartiküller; boyutları 10-1000 nm aralığında değişen etken maddelerin partikül içinde çözündüğü ve hapsedildiği, doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak elde edilebilen sistemlerdir. Bu sistemlerin, küçük partikül boyutlarına sahip olmaları sayesinde etken maddenin hedef bölgede birikmesini sağlamaları ve küçük partiküllerin hazırlanmasında biyoçözünür materyallerin kullanılarak uzun süre kontrollü etken madde salınımını sağlayabilmeleri, kolay sterilize edilebilmeleri gibi avantajları bulunur (Derma ve ark., 2013).

Katı lipid nanopartiküller (KLN), oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve emülgatörler ile kararlı hale getirilen yapılardır (Wissing ve ark., 2004). Lipidler, GRAS (Generally Recognized As Safe) özelliğine sahip olan bileşiklerdir, trigliseridler, kısmi gliseridler, yağ asitleri, steroidler ve mumlar bu grupta yer alır. Lipid dispersiyonu stabilize etmek için, molekül ağırlıkları ve yüklerine göre lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbaterler gibi

farklı emülgatör tipleri kullanılabilir. KLN'ler lipozom, emülsiyon ve katı partiküllerin sağladığı avantajlara sahip olması bakımından avantajlıdır. Düşük sitotoksositeye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretilibilmeleri ve dokulara etken madde hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarına sahipken, katı lipid matriksleri, kontrollü etken madde salımı ve kimyasal bozulmaya karşı etken maddelerin koruyarak katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarını sağlar (Mehnert ve Madern, 2001; Numanoglu ve ark., 2006).

Bu çalışmanın amacı, tıbbi öneme sahip olan *C. creticus* bitki ekstreleri yüklü kontrollü salım yapabilen KLN sistemleri geliştirmek ve onların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini ortaya çıkarmaktır.

## MATERYAL VE METOT

### Bitki ekstrelerinin ultrasonik yöntem kullanılarak hazırlanması

*C. creticus* bitkisi Ağva-Şile/İstanbul bölgesinden haziran (2022) ayında toplanmış ve laboratuvara getirilerek teşhis edilmiştir (Herbaryum numarası: AKU-10384). Bitkinin yapraklı sürgünleri kurutulup öğütülerek toz haline getirilmiştir. Etanol ve distile su ekstraktlarının (Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O) hazırlanmasında ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Duman ve ark., 2017). Toz halindeki her 30 g numune, 400 mL çözücü içerisine alınarak 25-37 °C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve ardından filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüştür. Daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph)'de 40 °C'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Liyofilizasyon işlemi sonucunda elde edilen toz halindeki ekstreler kullanılmaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

### Bitki Ekstrelerinden Nanopartikül Eldesi ve Karakterizasyonu

Nanopartikül dispersiyonları %0.5 (w/v) bitki ekstresi, %5.0 (w/v) gliserol monosterat ve % 0.1 (w/v) lesitin içerecek şekilde 55-60 °C'de eritilerek hazırlanmıştır. Bu karışıma %0.3 (w/v) bitki ekstresi ilave edilmiştir. Elde edilen erime fazı bu sıcaklıklarda tutularak % 0.4 (w/v) polisorbata 80 içeren sulu surfaktan çözelti içine karıştırılarak dağıtılmıştır. Daha sonra sonikasyon probu ön emülsiyon çözeltisi içerisine yerleştirilerek nanopartikül oluşumu sağlanmıştır (Lima ve ark., 2013). Nanopartiküllerin karakterizasyonu, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi (DLS) kullanılarak yapılmış ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutlarını belirleyebilmek için SEM görüntüleri imageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir.

### Nanopartiküle yüklenen ekstre miktarının saptanması

Katı lipid nanopartikül (KLN) yapıları yüklenen ekstre miktarının belirleyebilmek için modifiye santrifüj yöntemi kullanılmıştır (Khoshraftar ve ark., 2020). İlk olarak Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 520 nm'de ölçülerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Liyofilize haldeki boş ve Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O yüklü KLN yapıları (Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN) PBS içerisinde karıştırılmıştır ve 30 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantdaki serbest Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O ekstrelerinin miktarlarını belirleyebilmek için 520 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. % Yükleme etkinliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. AEa; santrifüj sonrası KLN'lerdeki ekstre miktarı (Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O). AEb; santrifüj öncesi KLN'lerdeki ekstre miktarı (Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O). Çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Yükleme etkinliği (\%)} = (AEa/AEb) \times 100$$

(1)

### In Vitro Nanopartikül Salınım Çalışmaları

Nanopartiküllerden bitki ekstrelerinin in vitro salım profillerini belirleyebilmek için bitki ekstreleri PBS tamponu içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlar elde edilmiş olup UV spektrofotometre kullanılarak 520 nm'de absorbansları ölçülmüş ve standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Bütün çalışmalar 37 °C'de ve pH 7.4±0.2'de gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller yapıardan in vitro etken madde salım profilinin tayin etmek için pH'sı 7.4 olan 10 mL'lik PBS tampon çözeltisine aktararak 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0. 3, 5, 15, 20. 30. 40. 50. 60. 80. 100. dakika) salım ortamından 1.5 mL çözelti alınarak eppendorf tüplerine alınmış ve UV-spektrofotometre kullanılarak 520 nm dalga boyunda örnekler için absorbanslar ölçülerek in vitro salım profili oluşturulmuştur (Kim ve ark., 2017). Deneysel süreç üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için kültür koleksiyonumuzda mevcut olan patojen test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland'a eşit türbidite oluşana kadar Müeller Hinton Broth (MHB) sıvı besi ortamında 37 °C'de inkübe edilmiştir. MHA besiyeri içeren petrilere steril agar delici yardımıyla 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Mac Farland bulanıklığına getirilen kültürden 0.1 mL alınarak MHA katı besiyerine yayma ekim yapılmıştır. KLN'lerin antimikrobiyal etkinliklerini belirleyebilmek için her birinden 10 µL olacak şekilde açılan kuyucuklara yerleştirilmiştir. Petriler +4 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona alınmıştır. İnhibisyon zon çapları ölçülerek kontrol grubuna göre değerlendirme yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak geniş spektrumlu antibiyotikler olan penisilin (10 mg/ml), amikasin (30 mg/mL) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır (Magaldi ve ark., 2004, Valgas ve ark., 2007).

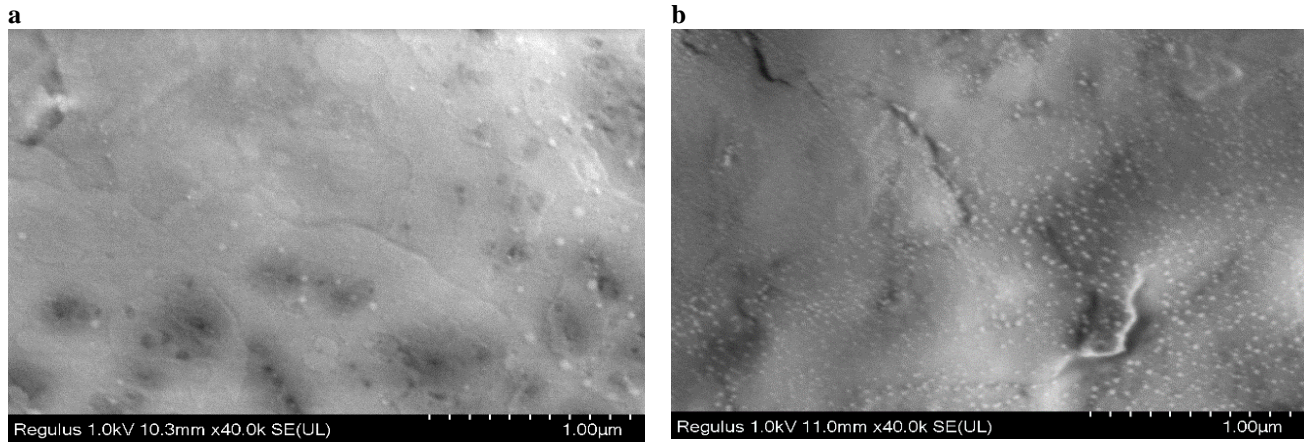
Bitki ekstrelerinin mikroorganizmaların gelişiminin inhibisyonuna yol açan minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2009; Günter ve ark., 2020). Patojen test mikroorganizmaların 37°C'de bir gecelik kültürleri yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarına her bir test mikroorganizmasından 100 µL (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> kob/mL) ve seyreltilen bitki ekstraktlarının ikişer kat artan konsantrasyonlarından (0.097-100 mg/mL) 100 µL eklenmiştir. Ardından mikropalakalar kapatılarak 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı en son kuyucuk MİK değeri olarak belirlenmiştir. Çalışmada, besiyer, %0.1 penisilin kontrol olarak kullanılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında önemli bir yere sahip olan *Cistus* spp.'ler, flavanoidler, fenolik ve terpenoidler gibi biyokatif bileşikler bakımından zengindir (Küpeli ve ark., 2007; Stepien ve ark., 2018; Zalegh ve ark., 2021). Bu bileşiklerin anti-inflamatuvar (Demetzos ve ark., 2001. antibakteriyel (Güvenç ve ark., 2005; Benali ve ark., 2020), antifungal (Ehrhardt ve ark., 2007), antiviral (Barros ve ark., 2013), analjezik (Sayah ve ark., 2017), antitumoral (Dimas ve ark., 2000) etkileri vardır. *Cistus* spp.ekstreleri kullanılarak yapılan bazı nanoteknolojik çalışmalar mevcuttur. Düz ve Yakut (2022), *C. creticus* yaprak ekstresi kullanarak mikrodalga destekli tek adımlı fitosentez ile gümüş nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Florkiewicz ve arkadaşları (2021), *C. creticus* yaprak



ekstrelerinden yeşil biyosentez yöntemiyle gümüş nanopartiküller sentezleyerek antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışma kapsamında *C. creticus* bitki yapraklarından elde edilen etanol ve su özütleri yüklü KLN yapıları ultrasonik yöntem kullanılarak başarılı bir şekilde yüklenmiştir. Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O ekstreleri sırasıyla %11.2 ve %10.9 verimlilikte ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin yüklendiği KLN yapıları elde edilerek karakterizasyonları için SEM, DLS analizleri yapılmış, zeta potansiyelleri ve PDI değerleri belirlenmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN'lerin SEM görüntüleri imageJ programında analiz edilmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapılarının SEM analiz görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN partikül boyutları ortalama 40-90 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Cc-ETOH-KLN (a), Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN (b) yüklü KLN'lerin SEM görüntüleri

Nanopartikül sistemlerinin en önemli özellikleri partikül boyutu ve dağılımıdır. Bu özellikler nanopartikül sistemlerin hedeflenebilme özelliği, toksisitesi, kararlılığı, ilaç yükleme kapasitesi ve ilaç salımı gibi özellikleri üzerinde etkilidir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, koloidal dağılımların kararlılığının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Yapılan çalışmalar, zeta potansiyel değeri ne kadar yüksek ise koloidal dağılımların kararlılığında o derece iyi olduğunu göstermiştir. Koloidal partiküller dispersiyon ortamında pozitif veya negatif yüklü olmalarına göre zıt yüklü iyonlarla yüklenirler. Yüksek zeta potansiyeline sahip sistemlerde agregatlar daha zor oluşur. Elektriksel iletkenlikleri, -31 ile -60 mV aralığındaki yapılar orta dereceli, -61 ile -80 mV aralığındaki yapılar iyi ve -81 ile -100 mV aralığındaki yapılar ise mükemmel elektrostatik kararlılığa sahip sistemler olarak bilinir (Muller ve Keck 2004). Heterojenlik dağılımı anlamına gelen polidispersite indeksi (PDI) saptanmıştır. In vitro ekstre salım testleri Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN'lerin Cc-ETOH-KLN'lere göre daha yüksek salım yaptığını göstermiştir. Bu durumun Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN'lerin suda çözünürlüğünün daha fazla olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Cc-ETOH-KLN'lerin zeta potansiyeli -35.5 mV, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN'lerin zeta potansiyeli -30.7 mV olarak belirlenmiştir. Heterojenlik dağılımı anlamına gelen polidispersite indeksinin (PDI) belirlenmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapılarının partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyeli Çizelge 1'de gösterilmiştir.

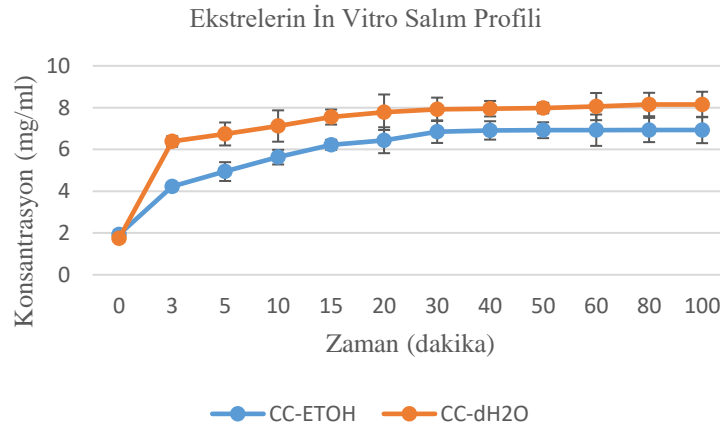
Çizelge 1. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapılarının partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyeli

Ekstre Yüklü KLN Yapılar	Ortalama partikül büyüklüğü ortalama (nm)	PDI değeri	Zeta potansiyeli (mV)
Cc-ETOH-KLN	72	0.455	-35.5
Cc-dH <sub>2</sub> O-KLN	69	0.475	-30.7

Poudel ve ark. (2019) yaptığı bir çalışmada, elde ettikleri lipozomların zeta potansiyelinin -9.8 ile -14 mV arasında değiştiği raporlanmıştır. Parçacık boyutu dağılımı, bakıldığında ise 186 ila 260 nm boyutları arasında değiştiği belirlenmiştir. KLN yapılarına ekstre yükleme oranı >80% olarak tespit

edilmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Lima ve ark. (2013), hiperisin yüklü KLN yapıları ultrasonik yöntem ile elde etmişlerdir. KLN'lerin partikül çaplarını 153 nm ve PDI değerini ise 0.30 olarak belirlemişlerdir. Zeta potansiyel değeri ise yaklaşık olarak -18.5 mV olarak saptanmıştır. Hiperisin yükleme oranı >80% olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, Haghghi ve ark. (2018) *Ginkgo biloba* ekstresi yüklü KLN yapıları basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanarak sentezlemişlerdir. Fizikokimyasal, sitotoksik ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemişlerdir. Farklı formülasyonlar kullanarak elde ettikleri KLN büyüklüklerini 104-621 nm aralığında olduklarını saptamışlardır. Sonuç olarak KLN yapıların uygun şekil ve büyüklükte, biyoaktif maddelerin yüklenebildiği, antimikrobiyal etkili ve sitotoksik olmayan yapılar olarak elde edilmiştir.

Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıların ekstre yükleme etkinliği ve in vitro salınım testi profillerinin tayininde bitki ekstrelerinin kalibrasyon grafiklerinden yararlanılmıştır ( $R^2=0.9612$ ,  $R^2=0.9728$ ). KLN yapıları Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O yüklemeye etkinliği yaklaşık olarak sırasıyla %84.76 ± 2.67 ve % 83.50 ± 3.43 olarak belirlenmiştir. Bu değerler Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O ekstrelerinin KLN yapılarına yükleme etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bitki ekstresi yüklü nanopartiküllerin nanolif yapılardan kümülatif salımı (mg/mL) zamanın fonksiyonu olarak elde edilmiştir (Şekil 2). Elde edilen in vitro salım profiline göre bitki ekstresi yüklü nanopartiküllerin nanolif yapılardan sürekli salımı doğrulamıştır. İlk 5 dakika içinde gerçekleşen hızlı ekstre salımını takiben daha yavaş ve kontrollü bir salım hızı gözlenmiştir. Cc-dH<sub>2</sub>O salımı Cc-ETOH salım profiline göre daha yüksek değerler göstermiştir.



Şekil 2. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıların in vitro salım profili

*C. creticus*'un biyolojik aktivitesinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma mevcuttur (Maggi ve ark., 2016; Stepien ve ark., 2019; Lahcen ve ark., 2020). Mastino ve ark. (2018), *C. creticus*'un farklı ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Ekstreler, antimikrobiyal aktivitelerinde herhangi bir belirgin farklılık göstermemiştir ancak gram-pozitif bakterilerin ekstrelerle karşı gram-negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin hiçbiri *Candida* türlerine karşı gözle görülür bir etki göstermemiştir. Bazı çalışmalarda, nanoteknolojik yöntemler kullanılarak bileşiklerin MİK ve MBEK değerlerinin azaltılabileceğini belirtilmiştir (Ghaffari ve ark., 2011).

Bitki ekstresi yüklü KLN yapıların mikroorganizmaların gelişiminin inhibisyonuna yol açan minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için mikrodilüsyon test yöntemi kullanılmıştır. Bitki ekstrelerinin patojen test mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerleri Çizelge 2'de gösterilmiştir. Cc-ETOH-KLN yapıları için en yüksek MİK değeri 25 mg/mL olarak *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. coli* ATCC 35218 mikroorganizmaları için belirlenmiştir. En düşük MİK değeri ise 3.12 olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115 için tespit edilmiştir. Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıları

için ise en yüksek MİK değeri 25 mg/mL olarak *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizması için belirlenmiştir. En düşük MİK değeri ise 1.56 mg/mL olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115 için tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.** Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerleri

Test Mikroorganizmaları	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (mg/mL)	
	Cc-ETOH-KLN	Cc-dH <sub>2</sub> O-KLN
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	3.12	1.56
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25	25
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	12.5	12.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	6.25	12.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	6.25	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 35218	25	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	12.5

Bitki ekstresi yüklü KLN yapıların antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için ayrıca kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 50 mg/mL Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki etkileri Çizelge 3’de gösterilmiştir. Kuyu difüzyon sonuçları; Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN’lerin Cc-ETOH-KLN’lere göre patojen test mikroorganizmaları üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Cc-ETOH yüklü KLN yapılar en yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes* ATCC 1911 (16±1.20) üzerinde gösterirken en düşük etkiyi *K. pneumoniae* NRRLB 4420 (12±0.90), *P. aeruginosa* ATCC 11778 (12±0.70) mikroorganizmalarına karşı göstermiştir. Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN ise en yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes* ATCC 1911 (19±0.75) en düşük etkiyi ise *P. aeruginosa* ATCC 11778 (13±0.25) üzerinde göstermiştir.

**Çizelge 3.** Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN yapıların antimikrobiyal etkinliği

Patojen Test Mikroorganizmaları	Zon Çapı (mm)				
	NK	Penisilin G	Amikasin	Cc-ETOH-KLN (25 mg/mL)	Cc-dH <sub>2</sub> O-KLN (25 mg/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	-	24±1.00	14±0.75	16±1.20	19±0.75
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	29±1.25	13±1.00	14±1.25	15±1.50
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	28±1.25	15±0.50	12±0.90	16±1.35
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	-	28 ±1.45	14±0.50	12±0.70	13±0.25
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	-	23±0.85	15±1.00	13±1.45	15±1.25
<i>E. coli</i> ATCC 35213	-	30±1.62	13±0.75	15±0.55	17±1.85
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	27±1.56	14±0.50	15±0.35	17±0.90

Penisilin G (10 mg/mL), amikasin (30 mg/mL) NK: dH<sub>2</sub>O, SS: standart sapma

Cc-ETOH-KLN ve Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN’ler en çok *L. monocytogenes* ATCC 1911 üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Cc-ETOH-KLN patojen test mikroorganizmaları üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin, ekstre hazırlarken kullanılan çözücülerin içerisindeki etken maddelerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, bitki ekstrelerinin içerisindeki polifenolik bileşenler ile anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, hücre canlılığı gibi biyolojik aktiviteler arasında ilişkili olduğu gösterilmiştir (Handoussa ve ark., 2013; Fernandes ve Salgado, 2016; Sallah ve ark., 2016; Vittorazzi ve ark., 2016). Ayrıca, bitki ekstrelerinin fenolik içeriklerinin bitkilerin türü, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, kullanılan çözücü gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Barrajon-Catalan ve ark., 2011; Jeszka-Skowron ve ark., 2018; Mastino ve ark., 2018). Diaz-Gomez ve arkadaşları (2013), fenolik bileşenler arasında yer alan gallik asit ve kateşinin *Helicobacter pylori*’nin gelişimini inhibe edici rol oynadıklarını rapor etmişlerdir. Bu inhibe edici etkinin ise penolik içeriğin çeşidine ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Chen ve arkadaşları

(2018), *Cistus* türlerinden elde ettikleri hesperidin, hesperetin antioksidan, anti-inflamatuvar ve antikanserojenik etkinliği olduğunu belirlemiştir.

## SONUÇ

Bu çalışmada ilk kez *C. creticus* bitki ekstreleri nanoteknolojik yöntemle kullanılarak patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, Cc-ETOH, Cc-dH<sub>2</sub>O ekstreleri yüklenmiş katı lipid nanopartiküller ultrasonik yöntem kullanılarak başarılı bir şekilde uygun büyüklük ve yapıda elde edilebilmiştir. Bu KLN yapıların ekstre yükleme etkinliğinin yüksek olduğu ve kontrollü salım yapabildikleri belirlenmiştir. Ekstre yüklü katı lipid nanopartikül yapılarına karşı patojen test mikroorganizmaları; duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençlilik göstermişlerdir. Sonuç olarak, Cc-ETOH-KLN, Cc-dH<sub>2</sub>O-KLN'lerin sağlık sektöründe antibiyotiklere alternatif biyoteknolojik ürün olarak kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmalar devam ettirilerek biyoteknolojik bir ürün geliştirilebilme potansiyeli vardır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209A I. Dönem Üniversite Öğrencileri Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Roldan, C., Guillen, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2011). A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis*, 22(4), 303-312.
- Barros, L., Duenas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Journal of Crops and Products*, 41, 41-45.
- Bhatia, N., Kumari, A., Chauhan, N., Thakur, N., & Sharma, R. (2023). *Duchsnea indica* plant extract mediated synthesis of copper oxide nanomaterials for antimicrobial activity and free-radical scavenging assay. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102574.
- Bakrim, B. W., Aghraz, A., Hriouch, F., Larhsini, M., Markouk, M., Bekkouche, K., Costa, R., Arrigo, S., Cicero, N. & Dugo, G. (2022). Phytochemical study and antioxidant activity of the most used medicinal and aromatic plants in Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 1-12.
- Benali, T., Bouyahya, A., Habbadi, K., Zengin, G., Khabbach, A., Achbani, E.H., & Hammani, K. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101696.
- Bouarab Chibane, L., Forquet, V., Lanteri, P., Clement, Y., Akkari, L. L. & Oulahal, N. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. *Frontiers Microbiology*, 10.829.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial standards institute susceptibility testing, 26 th Edition. CLSI supplement M100S. Wayne PA: Clinical and Laboratory, 2016.



- CLSI (2009). (Clinical and Laboratory Standard Institute). Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Seventh Edition. M07- A7, Villanova, PA, USA.
- Dash, B. K., Sultana, S. & Sultana, N. (2011). Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). *Life Sciences and Medicine Research*, 27:1-8.
- Davis, P. (1965). Introduction in Flora of Turkey and the East Aegean Islands.
- Değim, İ. & Mised, S. (2011). Farmasötik Nanoteknoloji. 8(13), 198-205.
- Demetzos, C., Dimas, K., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., & Angelopoulou, D. (2001). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta Medica*, 67(7), 614-618.
- Derman, S., Kızılbey, K. & Akdeste, Z. (2013). Polymeric nanoparticles. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31. 109-122.
- Duman, R., Dogan, H. H. & Tuncer, P. (2017). Evaluation of the in vitro antiviral activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* extracts against human respiratory syncytial virüs (HRSV). *International Journal of Science and Technology Research*, 3 (7), 44-59.
- Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolokouris, A., & Mavromoustakos, T. (2000). Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmaceutical Research*, 42(5), 475-478.
- Düz, M., & Yakut, Ö. (2022). Microwave-assisted green synthesis, characterization, and antioxidant activity of silver nanoparticles using the aqueous extract of *Cistus creticus*. *Particulate Science and Technology*, 41. 589 -599.
- Ehrhardt, C., Hrcinius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., & Ludwig, S. A. (2007). Polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research*, 76(1), 38-47.
- Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M. & Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1521.
- Günter, Ü., Maçın, S., & Tuncer, E. İ. (2020). Çeşitli bitki ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 30(3), 184-189.
- Florkiewicz, W., Pluta, K., Malina, D., Rudnicka, K., Zywicka, A., Duarte Guigou, M., Tyliczszak, B., & Sobczak-Kupiec, A. (2021). Investigation on green synthesis, biocompatibility, and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared using *Cistus incanus*. *Materials*, 14 (7), 5028.
- Ghaffari, S., Varshosaz, J., Saadat, A., & Atyabi, F. (2011). Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 35-43.
- Ganaie, H. A. (2021). Review of the active principles of medicinal and aromatic plants and their disease fighting properties. *Medicinal and Aromatic Plants*, 1-36.
- Gürsoy, A. Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri: İlaç Taşıyıcı Partiküller Sistemler. *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 7, 3-102.
- Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A.M., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., & Okada, Y. (2005). Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharmaceutical Biology*, 43(2), 178-183.
- Ho, C., Ismai, N., Shaida, F. S. & Ahmad, R. (2010). In vitro antibacterial and antioxidant activities of *Orthosiphon stamineus* benth. extracts against food-borne bacteria. *Food Chemistry*, 122(4), 1168-1172.
- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grzeškowiak, A., & Frankowski, R. (2018). *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC-MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids-A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74, 71-81.

- Khoshraftar, Z., Shamel, A., Safekordi, A. A., Ardjmand, M., & Zaefizadeh, M. (2020). Natural nanopesticides with origin of *Plantago major* seeds extract for *Tribolium castaneum* control. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10, 255-264.
- Kim, J. H., Baek, J. S., Park, J. K., Lee, B. J., Kim, M. S., Hwang, S. J., Lee, J. Y. & Cho, C. W. (2017). Development of *Houttuynia cordata* extract-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery: high drug loading efficiency and controlled release. *Molecules*, 22 (12), 2215.
- Küpeli, E., & Yesilada, E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 524-530.
- Lahcen, S. A., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., ... & Zarrouk, A. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26, 100346.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 149-173.
- Lima, A. M. Pizzol, D. C. Monteiro, B. F. F., Creczynsk-Pasa, B. T., Andrade, P. G., Ribeiro, O. A. & Perussi, R. T. (2013). Hyperin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125,146-154.
- Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2017). Antimicrobial resistance and cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1357.
- Poudel, A., Gachumi, G., Wasan, K. M., Dallal Bashi, Z., El-Aneed, A., & Badea, I. (2019). Development and characterization of liposomal formulations containing phytosterols extracted from canola oil deodorizer distillate along with tocopherols as food additives. *Pharmaceutics*, 11(4), 185.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45.
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., & Dall'Acqua, S. (2016). Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 50-57.
- Mastino, P. M., Mauro, M., Jean, C., Juliano, C., & Marianna, U. (2018). Analysis and potential antimicrobial activity of phenolic compounds in the extracts of *Cistus creticus* subspecies from Sardinia. *The Natural Products Journal*, 8(3), 166-174.
- Mehnert, W., & Mader, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83-101.
- Muller, R. H., & Keck, C. M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 151-170.
- Nazri, N. M., Ahmat, N., Adnan, A., Mohamad, S. S., & Ruzaina, S. S. (2011). In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5728-5735.
- Mastino, P. M., Mauro, M., Jean, C., Juliano, C., & Marianna, U. (2018). Analysis and potential antimicrobial activity of phenolic compounds in the extracts of *Cistus creticus* subspecies from Sardinia. *The Natural Products Journal*, 8(3), 166-174.
- Mokhtari, R., Kazemi Fard, M., Rezaei, M., Moftakharzadeh, S. A., & Mohseni, A. (2023). Antioxidant, antimicrobial activities, and characterization of phenolic compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and thyme-sage mixture extracts. *Journal of Food Quality*.
- Numanoğlu, U. & Tarımcı, N. (2006). Kati lipid nanopartiküllerin özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (3) 211-235.
- Saddiqe, L. Z., Naeem, I. & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511-521.

- Sarıkürkü, N. & Tilili, N. (2022). *Onosma inexpectata* and *Onosma armenum* novel sources of phytochemicals with determination by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with evaluation of the antioxidant and enzyme inhibitory capacities. *Analytical Letters*, 55 (7), 1068-1079.
- Sayah, K., Chemlal, L., Marmouzi, I., El Jemli, M., Cherrah, Y., & Faouzi, M.E.A. (2017). In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South African Journal of Botany*, 113, 160-163.
- Shanthi Sree, K. S., & Yasodamma, N. (2010). Paramageetham CH, phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Müell. *The Bioscan*, 5, 173-175.
- Snoussi, M., Ahmad, I., Aljohani, A., Patel, H., Abdulhakeem, M. A., Alhazmi, Y. S., Ahazmi, S., Tepe, B., Adnan, M., Sarıkürkü, C., Riadh, B., Feo, V., Alreshidi, M. & Noumi, E. (2022). Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of *Ducrosia flabellifolia*: A combined experimental and computational approaches. *Antioxidants*, 11(11), 2174.
- Soloviev, M. (2007). Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(1), 1-3.
- Stepien, A., Aebisher, D., & Bartusik Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, (2), 27-132.
- Stepien, A. E., Gorzelany, J., Matlok, N., Lech, K., & Figiel, A. (2019). The effect of drying methods on the energy consumption, bioactive potential and colour of dried leaves of Pink Rock Rose (*Cistus creticus*). *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2386-2394.
- Şükran, A. M. A. Ç. *Cistus creticus* (Pembe Laden) Türünün Farmakolojik Özellikleri. *Medical Records*, 3(2), 161-163.
- Uchegbu, I. F., & Schatzlein, A. G. (Eds.). (2006). *Polymers in Drug Delivery*. CRC Press.
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Velsankar, K., RM, A. K., Preethi, R., Muthulakshmi, V., & Sudhakar, S. (2020). Green synthesis of CuO nanoparticles via *Allium sativum* extract and its characterizations on antimicrobial, antioxidant, antilarvicidal activities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104123.
- Wickham, T. J. (2003). Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nature Medicine*, 9(1), 135-139.
- Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257-1272.
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S., Khalil Alyahya, H., & Mhand, R. A. (2021). A review on *Cistus* sp.: Phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214.