

KERSETİN YÜKLÜ KITOSAN NANOPARTİKÜLLERİN *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

***IN VITRO* EVALUATION OF QUERCETIN-LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES**

Çiğdem YÜCEL¹, Gökçe Şeker KARATOPRAK², Yeşim AKTAŞ¹, Müberra KOŞAR²

¹Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Bu çalışmada, antioksidan özellik gösteren doğal polifenolik bileşiklerden kersetin ile kitosan nanopartikülleri hazırlanmış, *in vitro* karakterizasyonu ve 24 saat boyunca pH 7.4 fosfat tamponunda salım çalışması yapılmıştır. Salım çalışması boyunca belirlenen zamanlarda alınan örneklerden antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde kersetinin ilaç taşıyıcı sisteme başarılı bir şekilde yüklenebildiği ve uzatılmış salım ile gösterdiği antioksidan aktivitenin 24 saat sürdürülebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kersetin, kitosan, nanopartikül, antioksidan aktivite

GİRİŞ

Kersetin, doğal polifenolik bir bileşik olup antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antikanserojen, hepatoprotektif ve yaşlanma karşıtı gibi birçok etkiye sahip olması ile hem farmasötik alanda hem de gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (1,2). Kersetinin suda zayıf çözünürlüğü nedeniyle oral kullanım sonrası sınırlı absorpsiyon ve düşük biyoyararlanım göstermekte ve kullanımı sınırlanmaktadır (3). Kontrollü salım sistemleri, biyoaktif bileşiklerin enzimatik ve kimyasal degradasyona karşı korunmasını, kontrollü salımını ve etkilerini artırmayı sağlayan sistemlerdir. Konvansiyonel ilaç şekillerine nazaran tedavi etkinliğinin artırılması, tedavide kullanılan terapötik dozun ve oluşan yan etkilerin azaltılması ve biyoyararlanımın artırılması amacıyla kontrollü salım sistemleri, üzerinde yoğun olarak çalışılan bir gruptur (4). Hastanın yaşam kalitesini artırmak, daha düşük dozda, dozlama aralığını uzatarak yan ve zararlı etkilerden arınmak gibi birçok avantajı sahip nanopartiküler sistemlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (5).

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik polimerlerle hazırlanan, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş olan etken maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküllerdir.

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, toksik olmayan polisakkarit yapıda biyoyumlu ve biyoadeziv

Makale Geliş Tarihi : 01.02.2016
Makale Kabul Tarihi: 30.03.2016

ABSTRACT

In this study, chitosan nanoparticles were prepared with natural, polyphenolic compound, quercetin, characterized *in vitro* and release study was also performed at 37°C using pH 7.4 phosphate buffer for 24 h. Antioxidant activity was measured from samples taken at specified time periods throughout release study. When all results were evaluated together, quercetin could load the carrier system successfully and it was concluded that the prolonged antioxidant activity was could be sustained for 24 hours.

Keywords: Quercetin, chitosan, nanoparticle, antioxidant activity

doğal bir polimerdir (6). Kitosan, katyonik yapısı nedeniyle permeabilite artırıcı özellik gösterir. Enzimatik ve kimyasal degradasyondan korunarak etkilerinin devam etmesi amacıyla birçok ilacın kitosan bazlı nanopartikülleri hazırlanmıştır (7-9).

Serbest radikaller, endojen ve ekzojen kaynaklı olup DNA ve proteinlere hasar vererek birçok hastalığa yol açmaktadır. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), stabil serbest bir radikal olup farklı antioksidan bileşiklerin serbest radikal süpürücü etkisini tayin etmede kullanılır ve 517 nm'de karakteristik absorpsiyon gösterir (3,10). Bu çalışmada, etken madde kersetin yüklü kitosan nanopartiküllerin hazırlanması, geliştirilmesi, karakterizasyonu ve geliştirilen kersetin yüklü nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma kapsamında etken madde olarak kersetin (Sigma, Almanya), polimer olarak kitosan (Protasan UP CL-213, FMC Biopolymers, Norveç), nanopartikül yapımında çapraz bağlayıcı olarak polianyonik tripolifosfat (TPP) (Kimetsan, Türkiye) kullanılmıştır. Etkin madde miktar tayini için UV-spektrofotometresi kullanılmıştır.

Corresponding Author: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Yücel
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye
Tel:0352 207 66 66/28176
cigdemyucel85@gmail.com

Kersetin için dalga boyu taraması yapılmış, 364 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon elde edilmiş ve tüm ölçümler bu dalga boyunda üç paralel üzerinden yapılmıştır.

Nanopartiküller iyonik jelyasyon metodu ile hazırlanmıştır (11). Bu metotta katyonik yapıdaki kitosan çözeltisi ile TPP çözeltisinin belirli oranlarda karıştırılmasıyla spontan olarak nanopartiküller oluşturulmuştur. İlk olarak üç farklı başlangıç konsantrasyonu (60 µg/mL-N1, 50 µg/mL-N2, 40 µg/mL-N3) belirlenmiş, nanopartiküller hazırlandıktan sonra partikül büyüklüğü, zeta potansiyel değerleri ve polidispersite indeksleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer dopler anemometri ile analiz edilmiştir. Yükleme etkinliği ise; süspansiyon halindeki yüklü nanopartiküllerin santrifüj edilerek üstteki berrak kısımdan (süpernatant) serbest yüklenmemiş kersetin miktarı hesaplanmış ve toplam miktardan çıkarılarak elde edilen kersetin yüklü kısmın toplam kersetin miktarına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Salım çalışmaları kersetin yüklü nanopartiküllerin 37°C'de pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarıyla alınan örneklerdeki kersetinin analiz edilmesi ve 24 saat boyunca salınan miktarların belirlenmesi suretiyle yapılmıştır. Antioksidan aktivite için belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler Gyamfi ve ark. (12) uyguladığı metod kullanılarak DPPH radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 50 µL örnek; 450 µL Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7.4) ve 1 mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış ve DPPH radikal çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorpsiyonlar 517 nm'de okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olarak yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \right] \times 100$$

BULGULAR

Üç farklı başlangıç konsantrasyonu ile hazırlanan kersetin yüklü kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, polidispersite indeksleri ve yükleme etkinlikleri) yapılmış ve Tablo 1'de belirtilmiştir. N1, N2 ve

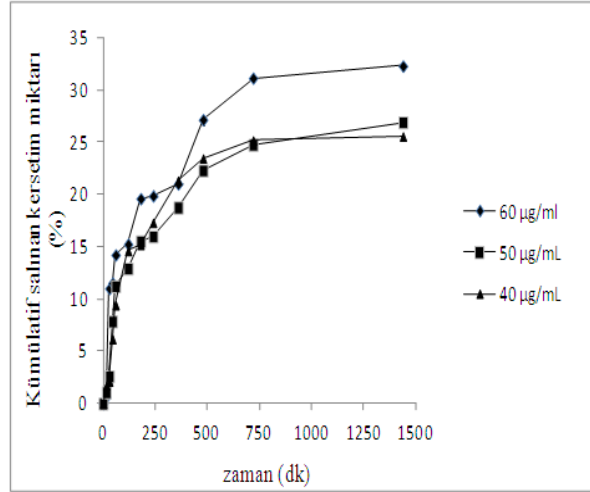
Tablo 1: Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, polidispersite indeksleri ve yükleme etkinliği (n=3)

Başlangıç konsantrasyonu µg/mL	Partikül büyüklüğü (µm)±SS	Zeta Potansiyel (mV)±SS	Polidispersite İndeksi (PDI)±SS	Yükleme Etkinliği ±SS
60 (N1)	0.360 ± 0.615	13.5 ± 2.69	0.056 ± 0.105	14.6 ± 0.56
50 (N2)	0.502 ± 0.569	11.8 ± 3.03	0.075 ± 0.123	14.0 ± 1.47
40 (N3)	0.612 ± 0.643	10.8 ± 4.13	0.120 ± 0.225	9.42 ± 1.07

. Veriler ortalama±standart sapma (SS) kullanılarak ifade edilmiştir

N3 formülasyonlarının partikül büyüklükleri sırasıyla 0.360, 0.502 ve 0.612 µm olarak bulunmuştur. Katyonik kersetin yüklü kitosan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri sırasıyla +10.8, +11.8 ve +13.5 mV, polidispersite değerleri 0.120, 0.075 ve 0.056 olarak bulunmuştur. Değişen başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak farklı yükleme etkinlikleri üç formülasyonda

sırasıyla %9.42, %14.0 ve %14.2 olarak belirlenmiştir. Yirmi dört saat boyunca kersetin nanopartiküllerinin salım çalışmaları pH 7.4 fosfat tamponu ortamında ya-



Şekil 1: Kersetin nanopartiküllerinin pH 7.4 fosfat tamponunda salım profili (n=3)

pılmış ve oluşturulan profiller Şekil 1'de belirtilmiştir. N1 formülasyonundan salınan kersetin miktarı %32.3, N2 formülasyonundan salınan kersetin miktarı %26.9 ve N3 formülasyonundan salınan kersetin miktarı %25.6 olarak bulunmuştur.

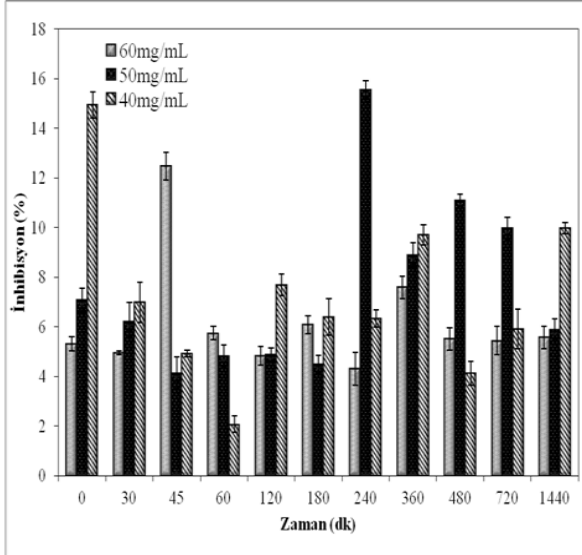
Salım deneyi boyunca alınan örneklerin antioksidan aktivite tayinleri yapılmış ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Yirmi dört saatte artan radikal süpürücü etki belirlenmiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA

Yapılan literatür araştırmalarında nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak, birçok etken maddenin biyoyararlanımının ve terapötik etkinliğinin artırılması sağlanabilmektedir (13). Bu çalışmada, nanopartiküller taşıyıcı sistemin sağladığı avantajların bir araya gelmesiyle lipofilik yapıdaki kersetinin kitosan nanopartikülleri hazırlanması hedeflenmiş ve başarıyla elde edilmiştir. Literatür taraması yapıldığında farklı polimerler kulla-

nılarak hazırlanan kersetin nanopartikülleri ve çeşitli aktivite tayinleri yapılmış çalışmalar mevcuttur (1,4). Bu çalışmada; doğal ve katyonik yapıdaki polimer olan kitosan tercih edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarına bakıldığında, üç formülasyonun da partikül büyüklüğü nanometre boyunda olup zeta potansiyelleri pozitif bulunmuştur. Pool



Şekil 2: Kersetin nanopartiküllerinin % inhibisyon profili (n=3)

ve ark. yaptığı bir çalışmada kersetin ile Poli laktid-koglikolik asit (PLGA) nanopartikülleri hazırlanmış, karakterizasyon çalışması yapılmış ve antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Hazırlanan bu nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ortalama 400 nm olup zeta potansiyelleri negatif bulunmuştur. Polidispersite indeks değerleri ise 0.173 ile 0.392 arasında değişmektedir (1). Yapılan başka bir çalışmada farklı oranlarda ve molekül ağırlıklarında kitosanın kullanılması ile elde edilen kitosan-TPP nanopartiküllerinde 100-1000 nm arasında değişen partikül büyüklükleri ve pozitif zeta potansiyeller elde edilmiştir (14). Çalışmamızda kullanılan kitosanın polikationik bir polimer olması nedeniyle yüksek zeta potansiyel elde edilmiştir. Zeta potansiyelin yüksek oluşu koloidal sistemlerin stabilitesinde, nanopartiküllerin agregasyonunu önlemede ve negatif yüklü hücre membranı ile etkileşiminde önemlidir (10,14,15). Bunun yanında polidispersite değerlerinin her üç formülasyonda 0.15'in altında olduğu tespit edilmiş ve bunun monodispers bir dağılım olduğu sonucuna varılmıştır. Polidispersite indeksi 0.5'e kadar olan değerlerde sistemler monodispers olarak değerlendirilmektedir. Koloidal sistemlerde monodispers dağılım istenmekte olup partikül büyüklüğü dağılımının dar olduğu anlamına gelmektedir (10,16). Literatürlere bakıldığında kitosan kullanılarak hazırlanan siklosporin A yüklü nanopartiküllerin yükleme etkinliği % 9.1 olarak belirtilmiştir (17). Başka bir çalışmada ise kitosan ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenilen ilaç % 24.1 olarak belirtilmiştir (18). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde hazırladığımız kitosan nanopartiküllerinin uygun karakterizasyona sahip olduğu düşünülmektedir.

Salım çalışmalarında başlangıç konsantrasyonu 60 µg/mL olan N1 formülasyonunda en yüksek salım gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak nanopartiküle yüklenen kersetinin yükleme etkinliğinin en yüksek N1 formülasyonunda görülmesi olarak düşünülmüştür. Yirmi dört saat yapılan salım çalışmasında N1 formülasyonu %33.2 salım göstermiştir. Yükleme etkin-

liği göz önüne alınarak N2 ve N3 formülasyonlarında da salım sırasıyla %26.9 ve %25.6'dır. Bu üç formülasyonda salım miktar farklılıklarının yükleme etkinliği farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada kersetin yüklenmiş kitosan nanopartikülleri ile pH 7.4 fosfat tamponu ortamında 12 saat süren salım çalışmasında %70 ilaç salımı gözlenmiştir. Yükleme etkinliği %62.5 olarak belirtilmiş (19) ve yüksek yükleme etkinliğine bağlı olarak 12 saat sonuna gözlenen ilaç salımı da yüksek bulunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda kersetin yüklenen nanopartiküllerin (N1, N2 ve N3) DPPH radikaline karşı olan inhibisyon yüzdeleri %50'nin altında kalmıştır. Bunun nedeni olarak nanopartiküllere yüklenen kersetin miktarının düşük konsantrasyonda olduğu ve salım yüzdeleri düşünüldüğünde inhibisyonu sağlayan konsantrasyonun %50 inhibisyona ulaşmakta düşük kaldığı sonucuna varılmaktadır. Yapılan bir çalışmada kersetin ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerinde yüklenen antioksidan bileşik kersetinin miktarı arttıkça gösterdiği % inhibisyon değeri de artmaktadır. Ayrıca standart olarak kullanılan kersetin çözeltileri ile anlamlı olarak yakın DPPH radikalini süpürücü etki göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, kersetin yüklü kitosan nanopartiküllerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak artan % inhibisyon değeri gözlenmiş olup bizim çalışmamızdaki % inhibisyon değerleri benzer çıkmıştır (3).

Çalışmamızdaki örneklerin 24 saat boyunca gösterdiği yüzde inhibisyon değerleri değerlendirildiğinde çalışmanın amacına uygun olarak uzatılmış salım elde edildiği düşünülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyon çalışmaları, elde edilen salım profilleri ve antioksidan aktivite tayini sonucu elde edilen tüm verilere bakıldığında kersetin gibi güçlü antioksidan bir bileşiğin amacına uygun şekilde ilaç taşıyıcı sisteme yüklenebileceği ve gösterdiği antioksidan aktivitenin 24 saat sürdürülebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Pool H, Quintanar D, Figueroa JD, et al. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *J Nanomater* 2012; 2012: 1-12.
2. Dhawan S, Kapil R, Singh B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63: 342-351.
3. Zhang Y, Yang Y, Tang K, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Appl Polym Sci* 2008; 107: 891-897.
4. Wu TH, Yen FL, Lin LT, et al. Preparation, physicochemical characterization and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int J of Pharm* 2008; 346: 160-168.
5. Zırh Gürsoy, A. Kontrollü salım sistemleri 1. Bas-

- ki, İstanbul: Kontrollü Salm Sistemleri Derneği 2002; ss 82-88, 113-117.
6. Qi L, Xu Z, Jiang X, et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004; 339 (16): 2693-2700.
 7. Wu Y, Yang W, Wang C, et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int J Pharm* 2005; 295: 235-245.
 8. Fan W, Yan W, Xu Z, et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloid Surface B* 2012; 90: 21-27.
 9. Aktas Y, Andrieux K, Alonso MJ, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int J of Pharm* 2005; 298: 378-383.
 10. Bennet D, Kim S. Transdermal delivery system to enhance quercetin nanoparticle permeability. *J Biomat Sci-Polym E* 2013; 24(2): 185-209.
 11. Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Contr Rel* 2006; 115: 216-225.
 12. Gymafi MA, Yoko A. Antioxidant properties of thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. *Biochem. Pharmacol* 2002; 63: 1725-1737.
 13. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull* 2010; 58(11): 1423-1430.
 14. Quan Gan Q, Wang T, Cochrane C, et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surfaces B* 2005; 44: 65-73.
 15. Çelebi N. Modern Farmasötik Teknoloji 2. Baskı, Ankara: TEB Eczacılık Akademisi 2009; ss 271.
 16. Grau MJ, Kayser O, Müller RH. Nanosuspensions of poorly soluble drugs — reproducibility of small scale production. *Int J Pharm* 2000; 196: 155-157.
 17. M. De Campos A, Sa´nchez A, J. Alonso M. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm* 2001; 224: 159-168.
 18. El-Shabouri MH. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm* 2002; 249: 101-108.
 19. Nathia S, Durga M, Devasena T. Preparation, physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of quercetin loaded chitosan nanoparticles and its novel potential to ameliorate monocrotophos induced toxicity. *Dig J Nanomater Bios* 2014; 9(4): 1603-1614.