

# Trans-Resveratrol'ün Kitosan Mikroküreler İçerisindeki Kararlılığı

## Stability of *trans*-Resveratrol Incorporated in Chitosan Microspheres

Duygu Altıok<sup>1</sup>, Evren Altıok<sup>1</sup>, Oğuz Bayraktar<sup>1</sup>, Funda Tihminlioğlu<sup>1</sup>

1. Kimya Mühendisliği Bölümü,  
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

{evrenaltiok,duygualtiok,oguzbayraktar,fundatihminlioglu}@iyte.edu.tr

### Özetçe

*trans*-Resveratrol, (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilbene), bazı bitkilerde bulunan fenolik bir bileşen olup antioksidatif, antikanseröjenik ve antitümör özellikleri bildirilmiştir. Ancak bu madde UV ışığına maruz kaldığında *-cis* formuna dönerek biyoaktivitesini kaybettiği bilinmektedir. Bu çalışma, *trans*-resveratrolün kitosan mikrokürelere yüklenerek kararlılığını arttırmayı hedeflemektedir. Bu kapsamda püskürtmeli kurutma yöntemiyle *trans*-resveratrol içeren kitosan mikroküreler üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Mikrokürelerin parçacık boyutu ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), termal özellikleri ise termogravimetrik analizörüyle (TGA) incelenmiştir. *trans*-resveratrol'ün serbest ve mikroküre içerisindeki kararlılığı yüksek performans sıvı kromatografisiyle (HPLC) incelenmiştir. Bu analizle kitosan mikrokürelere yüklenen *trans*-resveratrolün stabilitesini koruduğu saptanmıştır.

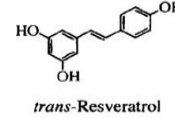
### Abstract

*trans*-Resveratrol, (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilbene), a phenolic compound present in some plant species, have been shown to possess antioxidative, anticarcinogenic and antitumour properties. However, under UV light, it turns into *-cis* form and loses its bioactivity. This study aims to increase the stability of *trans*-resveratrol by loading it into chitosan microspheres. Within this context, the *trans*-resveratrol loaded chitosan microspheres was produced by spray drying and then the resultant microspheres were characterized. The particle size and the surface morphology of resultant microspheres were investigated by scanning electron microscope (SEM) and the thermal properties were determined by thermogravimetry analyser (TGA). The stability of free and that of inside the microspheres was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). It was found that the stability of *trans*-resveratrol incorporated into chitosan microspheres kept constant.

### 1. Giriş

*trans*-Resveratrol, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, bitkiler tarafından mikrobik, fungal ve fiziksel uyarılara karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bir fitoaleksindir. *cis* ve *trans* izomerleri

vardır ancak *trans* formu daha yaygın ve biyolojik olarak daha aktiftir [1].



Şekil 1: *trans*-resveratrol'ün kimyasal yapısı [2]

*trans*-Resveratrol üzüm, ahududu, dut, yabanmersini, kızılçik, yer fıstığı ve bazı çam ağaçlarında bulunmakla birlikte üzüm ve üzümünden üretilen ürünler bu maddenin en önemli besinsel kaynaklarıdır. Bu madde üzümde mikrobiyal enfeksiyon, herpes ve fungusit gibi kimyasal uygulamalar ile stres ve UV ışığına maruz kalma sonucunda sentezlenir. *cis*-Resveratrol üzümün doğal bir bileşeni değildir. Ancak orijin ve uygulanan teknolojiye bağlı olmaksızın incelenen hemen hemen bütün şaraplarda tespit edilmesi, bu maddenin şarap üretimi esnasında *trans* izomerinden *cis* izomerine dönüştüğünü göstermektedir [2].

*trans*-Resveratrol çoğunlukla damar tıkanıklığının tedavisinde ve yüksek kolesterolün düşürülmesinde kullanılır. Bununla birlikte, antiviral ve antiinflamatuvar aktivitesi akut mikrobiyal enfeksiyonların ve hepatitin tedavisinde kullanımına olanak sağlar. Bazı bulgular Herpes Simplex ve HIV gibi retrovirüslerle mücadeleyi güçlendirdiği görüşünü desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmalar, yüksek antioksidan aktivitesinin olduğunu ve hafıza kayıplarının azaltılmasında kullanılabileceğini göstermiştir [3,4]. Ancak *trans*-resveratrolün insan ve hayvanlarda absorpsiyon ve metabolizmasıyla ilgili az bilgi bulunmaktadır. Son on yılda, *trans*-resveratrolün antioksidan ve antimikrobiyal özelliğini inceleyen bazı çalışmalar yapılmıştır. Chatterjee ve ark. (2005) antioksidan özellik gösteren vitamin C, vitamin E, garsinol ve Protykin® adlı %50 *trans*-resveratrol içeren ürünün Helicobacter Pylori üzerine antimikrobiyal etkisini incelemişler ve vitamin E dışındakilerin yüksek aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [3,5]. Diğer bir çalışmada ise, H. Pylori'nin konsantrasyonuna edilmiş kırmızı şarap ekstrelerine ve *trans*-resveratrol'e duyarlılığı incelenmiş ve *trans*-resveratrol için minimum inhibisyon konsantrasyonları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> sırasıyla 12.5 ve 25µg/ml olarak bulunmuştur [6].

978-1-4244-3606-4/09/\$25.00 ©2009 IEEE

Kitosan, yengeç, karides, istakoz gibi eklembacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Toksisitesinin bulunmaması, alerji ve iritasyon yapıcı olmaması ve biyoparçalanabilir oluşu farmasötik ve medikal alanda kitosanı önemli ve ilgi çekici bir biyomateryal yapmaktadır. Ayrıca fizyolojik pH'da pozitif yüklü olmasından dolayı biyoyapışkanlık özelliğine sahiptir [7]. Kitosan aynı zamanda önemli biyoaktif özelliklere sahiptir. Bunlar arasında hemostatik, bakteriyostatik, fungistatik, antikanserijen, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve kemik iyileşmesini hızlandırıcı özellikleri sayılabilir [8].

Farmasötik alanda kitosan bazlı jel, film, sünger, tablet ve mikropartiküler sistemler (mikroküre, mikrokapsül vb.) bulunmaktadır [9,10,11]. Mikropartiküler sistemler genellikle etkin maddeyi oksijen, ışık, farklı çevresel koşullar ve kimyasallardan korumak ya da izole etmek için geliştirilir [12]. Kitosan mikrokürelerinde ilaç yüklemeye etkinliğini etkin maddenin özellikleri, kitosan konsantrasyonu, ilaç/polimer oranı gibi faktörlerin etkilediği bildirilmiştir. Kitosan mikrokürelerden etkin madde salınımı etkileyen parametreler arasında kitosanın molekül ağırlığı, konsantrasyonu, mikrokürelerin yüklenen etkin madde miktarı, ilaç/kitosan oranı, çapraz bağlanma oranı ve kullanılan çapraz bağlayıcı olduğu bildirilmiştir [13].

Püskürtmeli kurutma en yaygın kullanılan mikroküre üretme tekniklerindedir. Bu yöntemde aktif madde polimer solüsyonunda çözünür ya da asılı tutulur [13]. Püskürtmeli kurutma işlemi mikrokürelerin ısıya maruz kalma süresi çok kısa olduğundan hem ısıya dirençli hem ısıya duyarlı ilaçlar için ve aynı zamanda hidrofilik ya da hidrofobik polimerler için uygundur. Ayrıca püskürtmeli kurutma işlemiyle üretilen mikrokürelerin parça boyutu dağılımı çok dar bir aralıkta değişir [14].

Bu çalışmadaki amaç, *trans*-resveratrol'ün kararlılığını arttırmak için püskürtmeli kurutma yöntemiyle *trans*-resveratrol yüklü kitosan mikroküreler oluşturmak ve karakterize etmektir. Elde edilen mikroküreler termal, mikroyapı ve parçacık boyutu özellikleri için sırasıyla termogravimetrik analizör (TGA) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) cihazları aracılığıyla karakterize edilmiştir. *trans*-resveratrol'ün kararlılığı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntemler

### 2.1. Materyaller

Kitosan (Düşük molekül ağırlıklı, Aldrich, USA), asetik asit (Merck, Almanya)

### 2.2. Kitosan Mikrokürelerin Üretimi

Püskürtmeli kurutma işlemi, standart 0.5 mm nozül ve paralel akış özelliğine sahip Buchi® Mini Spray Dryer B-290 (Switzerland) püskürtmeli kurutma sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi için besleme akışkanı atomizere pompalanır. Filtreden geçirilen dış ortam havası,

belirlenen kurutma sıcaklığına ayarlanır ve kurutma ortamına verilir. Sıcak hava ve püskürtülen akışkan paralel akışta hareket eder. Atomize edilmiş damlacıklar sıcak hava ile temas ettiklerinde buharlaşma gerçekleşir ve kurutulmuş ürün siklondan geçerek ürün toplama kabında toplanır. Püskürtmeli kurutma işleminde kontrol kitosan mikrokürelerinin üretiminde pompa hızı ve hava giriş sıcaklığının, *trans*-resveratrol içeren kitosan mikrokürelerinin üretiminde ise kitosan konsantrasyonunun üretilen mikrokürelerinin karakteristiği üzerine etkileri incelenmiştir.

Kitosan stok solüsyonu (%2 (w/v)), kitosanın % 2 lik asetik asitte çözülmesiyle elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 3 ve 6 ml/dak besleme hızlarıyla atomizere pompalanmış ve 120 ile 140°C hava giriş sıcaklıklarında kurutma işlemiyle kontrol kitosan mikroküreleri üretilmiştir. *trans*-resveratrol içeren kitosan mikrokürelerinin üretimi için kitosan solüsyonları (%1 ve %2 (w/v)), kitosanın % 2 lik asetik asitte çözülmesiyle elde edilmiş olup, 20 mg *trans*-resveratrol 200 µl etanol içerisinde çözülerek *trans*-resveratrol stok solüsyonu hazırlanmıştır. Her 100 ml kitosan solüsyonuna 100µl *trans*-resveratrol solüsyonu eklenmiş ve 30 dak. karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyon 3 ml/dak besleme hızıyla atomizere pompalanmıştır. Hava giriş ve çıkış sıcaklıkları sırasıyla, 120 ve 67°C dir. Hava çıkış sıcaklığı hava giriş sıcaklığı ve besleme hızı gibi çeşitli faktörlere bağlı bir değişkendir. Aspiratör hızı 24 m<sup>3</sup>/sa olarak ayarlanmıştır.

### 2.3. Kitosan Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Üretilen mikrokürelerin boyutu ve yüzey morfolojisi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi'ndeki Taramalı Elektron Mikroskopuyla (Philips XL 30S FEG, FEI Company, Eindhoven, Hollanda) incelenmiştir. Toz haldeki mikroküreler, numune tutucu tabla üzerine çift taraflı yapıştırıcıyla sabitlenmiş ve 60 s boyunca vakum altında altın ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Mikrokürelerin termal özellikleri ise N<sub>2</sub> gaz akışı (40 ml/dak) altında TGA (Shimadzu TGA-51) ile incelenmiştir. TGA analizinde sıcaklık 10°C/dak hızla 20°C'den 400°C'ye çıkarılmıştır.

### 2.4. Kararlılık Testi

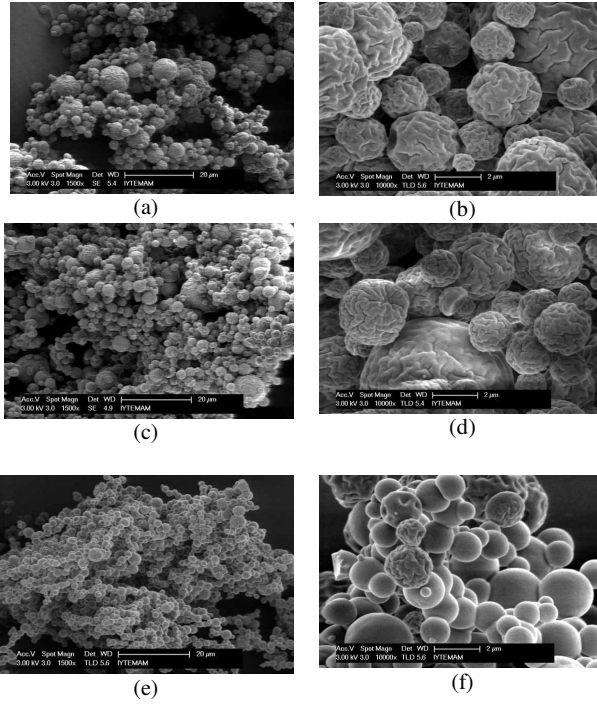
Trans- ve cis- resveratrol miktarları HPLC (Agilent 1100) ile C18 kolonu kullanılarak DAD dedektörü ile sırasıyla 306nm. ve 310 nm dalga boylarında elde edilen kromatogramlardan hesaplanmıştır. Mobil faz A %5.5 asetik asit çözeltisi, mobil faz B ise asetonitril içerisinde %20 A olacak şekilde ayarlanmıştır. Programa göre, %83.5 mobil faz A ile analize başlanmış 21 dakikada %70'e lineer olarak düşürülmüştür.

## 3. Sonuçlar ve Tartışma

### 3.1. Parçacık Boyutu ve Yüzey Morfolojisi

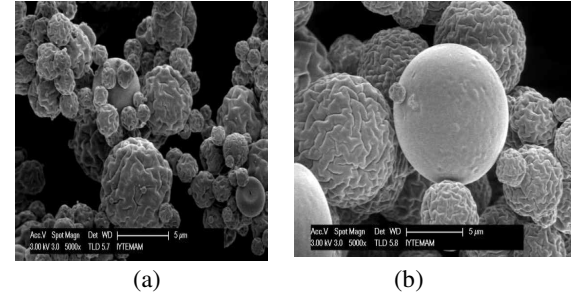
Püskürtmeli kurutma yöntemiyle farklı kurutma koşullarında elde edilen kontrol kitosan mikrokürelerinin taramalı elektron mikroskopu görüntüleri Şekil 2. de verilmiştir. SEM görüntülerine göre mikrokürelerin küreselliği oldukça yüksektir. Kontrol mikrokürelerinin yüzeyi oldukça buruşuk olup aralarında

boşluklar bulunmaktadır. Bu buruşukluğun sebebi tam olarak açıklanamamakla birlikte başka çalışmalarda da benzer morfolojiler gözlenmiştir [14,15]. Yüzey morfolojisindeki bu farklılık kuruma hızı, solüsyonun kompozisyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Yine de yüksek sıcaklık ve besleme hızında daha pürüzsüz bir görünüm vardır. Daha genel görünümü SEM resimleri (Şekil 2. a, c ve e) incelendiğinde ortalama parçacık boyutunun besleme hızıyla ters orantılı olarak değiştiği, hava giriş sıcaklığından ise etkilenmediği görülmüştür. Yine de bütün durumlarda, parçacık boyutu 1-10 µm arasında değişmiştir. Aynı zamanda parça boyutu dağılımını çok dar bir aralıkta değiştiği gözlenmiştir. 120°C'nin altındaki hava giriş sıcaklığında yeterli kuruma sağlanamamış olup nemli mikroküreler kurutucu çeperine yapışmıştır.



Şekil 2: Kontrol kitosan mikrokürelerin SEM resimleri. (a), (b): hava giriş sıcaklığı 120°C, besleme hızı 3 ml/dak (c), (d): hava giriş sıcaklığı 140°C, besleme hızı 3 ml/dak ; (e), (f): hava giriş sıcaklığı 140°C, besleme hızı 6 ml/dak ve sırasıyla 1500x, 10000x büyütme oranlarıyla.

trans-Resveratrol içeren kitosan mikrokürelerin SEM resimleri Şekil 3'te verilmiştir. Kitosan konsantrasyonunun mikrokürelerin karakteristiği üzerine etkileri incelenmiştir. SEM resimlerine göre, ortalama parçacık boyutu kitosan konsantrasyonu arttıkça artmıştır.

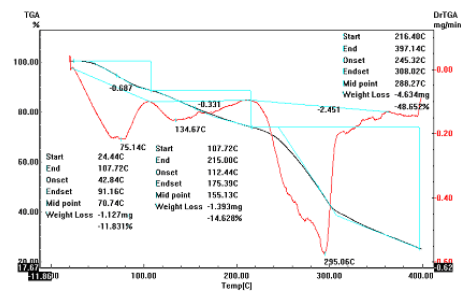


Şekil 3: trans-resveratrol içeren kitosan mikrokürelerin SEM resimleri. (a) %1 (w/v) kitosan solüsyonu (b) %2 (w/v) kitosan solüsyonu

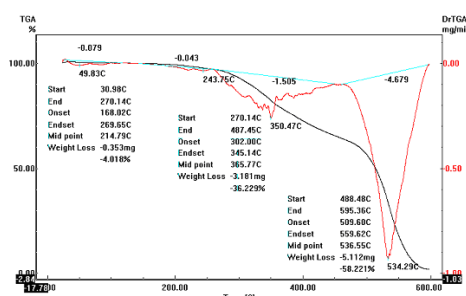
İki durumda da mikrokürelerin küreselliği yüksektir. Benzer şekilde pürüzsüz, az buruşuk ve buruşuk olmak üzere 3 farklı morfoloji gözlemlenmiştir. Kontrol kitosan mikrokürelerle karşılaştırıldığında benzer yüzey morfolojileri görülmektedir.

### 3.2. Termal Analiz

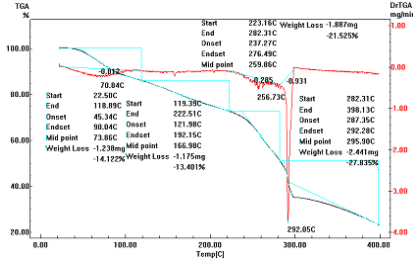
Üretilen mikrokürelerin TGA termogramları Şekil 4-7'da verilmiştir. Termogravimetrik analiz sonucunda oluşan ağırlık kaybı 3 aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada 40-90°C arasında serbest su ve asetik asitin buharlaşmasından kaynaklanan ağırlık kaybı görülmüştür. İkinci aşamada 110-175°C de görülen ağırlık kaybı bağlı sudan dolaydır. Üçüncü aşama ise 250-350°C arasında ana bozunmadan meydana gelmiştir ve ağırlık kaybının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır.



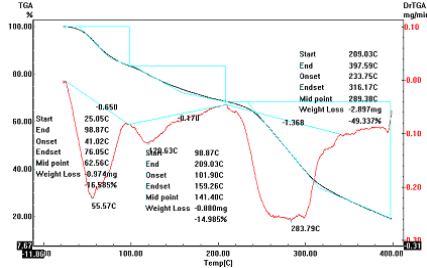
Şekil 4: Kontrol kitosan mikrokürelerin TGA ve DTG eğrileri



Şekil 5: trans-resveratrolün TGA ve DTG eğrileri



Şekil 6: *trans*-resveratrol içeren kitosan mikrokürelerin (1% w/v kitosan) TGA ve DTG eğrileri



Şekil 7: *trans*-resveratrol içeren kitosan mikrokürelerin (2% w/v kitosan) TGA ve DTG eğrileri

Kontrol kitosan mikrokürelere ait termograma göre (Şekil 4) kitosanın ana bozunma sıcaklığı 250-290°C arasındadır ve bu bozunma polisakarit zincirlerinin ve deasetilasyon birimlerinin bozunmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte saf *trans*-resveratrolün termogramına göre %36'lık kütle kaybı 300-350° C arasında görülmüştür. *trans*-Resveratrol içeren kitosan mikrokürelerin termogramları Şekil 6 ve 7'de verilmiştir. Buna göre üçüncü aşamada meydana gelen kütle kaybı kitosanın ve *trans*-resveratrolün bozunmasından kaynaklanmaktadır. Bozunmanın 240°C de başlaması, bu sıcaklığın kontrol kitosan mikrokürelerinkinden düşük olmasından dolayı termal dayanımın biraz düştüğünü göstermektedir.

### 3.3. Kararlılık Testi

*trans*-resveratrol, biyolojik olarak cis formuna kıyasla daha aktiftir ve doğal formu trans halidir. Fakat *trans*-resveratrolün vücutta biyo kullanılabilirliği düşüktür ve hızla degede olarak kanda kısa süre sonra tespit edilememektedir. Biyo kullanılabilirliğinin artırılması için *trans*-resveratrolün kitosan gibi doğal polimerlere hapsedilerek hedef odaklı ve kontrollü salınımı mümkün olabilir. Gösterdiği sitotoksik (göğüs, prostat, akciğer gibi kanserli hücelere metastas etki göstermektedir) etkiler, antioksidan ve antimikrobiyel etkilerden dolayı hedef odaklı taşınımı önem kazanmaktadır. *trans*-Resveratrol 12 saat UV ışığına maruz bırakıldığında %83 oranında cis- formuna dönüşmektedir. Mikrokürelere yüklenen örneklerde ise *trans*- resveratrolün bu süre içerisinde kararlılığını koruduğu görülmüştür.

## 4. Kaynakça

[1] King, R.E., Bomser, J.A. and Min, D.B., "Bioactivity of Resveratrol", *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*. Vol. 5, pp. 65-70, 2006.

[2] Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I.A. and Spanos, M. "trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties", *Food Control*. Vol. 17, pp. 700-706, 2006.

[3] Chatterjee, A., Bagchi, D., Yasmin, T. and Stohs, S.J. "Antimicrobial effects of antioxidants with and without clarithromycin on *Helicobacter pylori*", *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 270, pp. 125-130, 2005.

[4] Nikfardjam, M.S.P., Ma'rk, L., Avar, P., Figler, M. and Ohmacht, R., "Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villa'ny region", *Food Chemistry*. Vol. 98, pp. 453-462, 2006.

[5] Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D. and Stohs, S.J. "The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protokin® compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*", *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 243, pp. 29-35, 2003.

[6] Mahady, G.B. and Pendland, S.L. "Resveratrol Inhibits the Growth of *Helicobacter pylori* in Vitro", *American Journal of Gastroenterology*. Vol. 95(7), pp. 1849, 2000.

[7] Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A., Gurny R., "Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 57, 19-34, 2004

[8] Gobin A.S., Froude V.E., Mathur A.B., "Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 74A, 465-473, (2005),

[9] Polnok A, Verhoef J C, Borchard G, Sarisuta N, Junginger H E, "In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels", *International Journal of Pharmaceutics*, (2004), **269**, 303-310

[10] Rujiravanit R., Krueykitanon S., Jamieson A. M., Tokura S., "Preparation of Crosslinked Chitosan/Silk Fibroin Blend Films for Drug Delivery System", *Macromolecular Bioscience*, (2003), **3**, 604-611

[11] Gouin S, "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends", *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 15, 330-347, 2004

[12] Shikov A N, Pozharitskaya O N, Makarov V G, Kvetnaya A S, "Antibacterial Activity of *Chamomilla recutita* Oil Extract against *Helicobacter pylori*", *Phytotherapy Research*, Vol. 22, 252-253, 2008

[13] Gonzalez, AG., Igea, S.A., Espinar, F.J.O. and Mendez, J.B. "Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 48, pp. 149-155, 1999.

[14] Desai, K.G.H. and Park, H.J. "Preparation And Characterization of Drug-Loaded Chitosan-Tripolyphosphate Microspheres By Spray Drying", *Drug Development Research*. Vol. 64, pp. 114-128, 2005.

[15] Kosaraju, S.L., Dath, L. and Lawrence, A. "Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery", *Carbohydrate Polymers*. Vol. 64, pp. 163-167, 2006.