

## Antioksidan Etkili Rutin İçeren Mikroemülsiyon ve Mikroemülsiyon Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Etkinliğinin İncelenmesi

Çiğdem YÜCEL <sup>1</sup>, Tuğba EREN BÖNCÜ <sup>1</sup>, Gökçe ŞEKER KARATOPRAK <sup>2</sup>,  
Rukiye Nur AKPOLAT <sup>1</sup>

### ÖZ

**Amaç:** Çalışmada antioksidan etkili doğal bileşik olan rutinin, mikroemülsiyon (ME) ve mikroemülsiyon jel (MEj) formülasyonlarının geliştirilmesi ve uzatılmış antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Farklı oranlarda yağ/su/yüzey etkin madde:yardımcı yüzey etkin madde kullanılarak hazırlanan ME formülasyonlarının damlacık büyüklükleri, zeta potansiyel değerleri, viskoziteleri ve bekletme, santrifüj ve dondurup çözme işlemleri sonrasındaki stabiliteyi tayin edilmiştir. Altı farklı ME formülasyonu arasından belirlenen stabil formülasyonlar ile MEj formülasyonları, %1'lik (a/h) Karbopol 938 kullanılarak hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları yanı sıra L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak hücre kültüründe toksisite testi, *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışmaları yapılmıştır. Veriler ışığında en iyi belirlenen formülasyonun (F2 ME) antioksidan aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) ve (2,2-Azino-bis3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) radikal süpürücü etki ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Altı farklı mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Toksikite çalışmasına göre, rutin çözeltisi ve rutin ile geliştirilen formülasyonlar toksik bulunmamıştır. Karakterizasyon, *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışması verileri ile en iyi formülasyon olarak belirlenen F2 kodlu ME formülasyonundan salınan rutin miktarının antioksidan etkisi incelenmiş ve DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> radikallerini süpürücü etkisi ispatlanmıştır.

**Sonuç:** Sonuç olarak, bu çalışma ile toksik etkisi bulunmayan, yeni, rutin yüklü ME ve MEj formülasyonları başarıyla geliştirilmiş, uzatılmış antioksidan etkinlik kanıtlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen rutin yüklü ME formülasyonunun topikal uygulama için potansiyel oluşturduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Rutin; mikroemülsiyon; mikroemülsiyon jel; antioksidanlar.

## Development, Characterization and Evaluation of Effectiveness of Microemulsion and Microemulsion Gel Formulations Containing Antioxidant Effective Rutin

### ABSTRACT

**Aim:** In this study, it was aimed to develop microemulsion and microemulsion gel formulations of a natural product (rutin) that possesses antioxidant effect and to evaluate its prolonged antioxidant activity.

**Material and Methods:** The droplet size, zeta potential, viscosity values and stability profiles following the holding, centrifugation and freeze-thawing processes applied to the ME formulations, prepared by using different ratios of oil/water/surfactant and co-surfactant, were determined. The most stable formulations out of the six different ME formulations were selected and then, the ME gel formulations were prepared using 1% (w/v) Carbopol 938. Besides characterization studies, toxicity test on cell culture with using L929 mouse fibroblast cell line, *in vitro* release and cell permeation studies were performed. Antioxidant activity of optimum formulation (F2 coded ME) were measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) ve 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS<sup>•+</sup>) radical scavenging effect.

**Results:** Six different ME formulations were developed and characterized. According to the toxicity study, rutin solution and rutin loaded formulations were not toxic. The antioxidant effect of the rutin released from the F2 coded ME formulation which was determined to be optimum formulation by characterization, *in vitro* release and cell permeation studies data was investigated and the scavenging effects of DPPH and ABTS + radicals were proven.

1 Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD, Kayseri

2 Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD, Kayseri

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Çiğdem YÜCEL, e-mail: [cigdemyucel85@gmail.com](mailto:cigdemyucel85@gmail.com)

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 02.12.2019

**Conclusion:** In conclusion, new, nontoxic, rutin loaded ME and ME gel formulations were successfully developed and prolonged antioxidant activity was proved. It is assumed that the rutin loaded ME formulation developed in this study has a great potential for topical application.

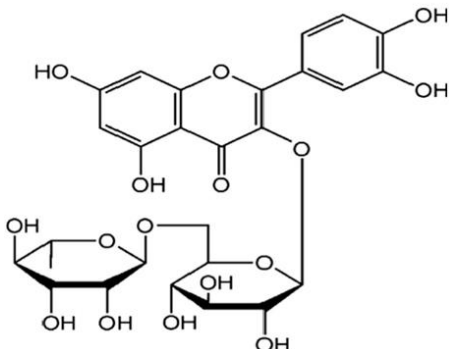
**Keywords:** Rutin; microemulsion; microemulsion gel; antioxidants.

## GİRİŞ

Mikroemülsiyonlar (ME); yağ, su ve yüzey etkin madde (YEM) ve genellikle bir yardımcı YEM içeren izotropik, termodinamik olarak stabil, mikro boyutta küresel damlacıklara sahip, yağ ve su fazları arasında çok düşük ara yüzey gerilimi ile karakterize, saydam veya yarı saydam heterojen kolloidal sistemlerdir (1,2). Yapılarına bağlı olarak su içinde yağ (y/s), yağ içinde su (s/y) ve çok fazlı sistemler (s/y/s veya y/s/y gibi) olarak sınıflandırılabilirler (1-3). Düşük viskoziteli, saydam ve stabil bir ME oluşumu için yağ-su ara yüzünde ara yüzey gerilimini aşan bir ara yüzey basıncı oluşması gerekmektedir. Bu da ideal oranlarda ve uygun YEM ve yardımcı YEM kullanılmasıyla sağlanabilmektedir (4).

Deri, yabancı maddelerin ve UV ışınlarının vücuda girmesini en aza indiren benzersiz ve karmaşık bir bariyerdir. Deriden zararlı bileşiklerin yanı sıra ilaçların geçişi de önlenmektedir (5). ME'lar küçük damlacık boyutları sayesinde çok düşük yüzey gerilimine yol açarak, etkin maddelerin çözünürlük, absorpsiyon ve permeasyon özelliklerini ve terapötik etkilerini iyileştiren sistemlerdir (1). Topikal ve transdermal yolla uygulanan ilaçların terapötik etki göstermesini sağlamak için doku engelini aşılması gerekmektedir. Bu amaçla, eşsiz formülasyon özellikleri, termodinamik stabiliteyi, mükemmel biyouyumlulukları ve hidrofilik ve lipofilik alanların varlığına bağlı olarak hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddelerin ciltten penetrasyonlarını artırma kabiliyetleri nedeniyle ME'lar, lokal etki sağlamak ve deriden ilacın penetrasyonunu arttırmak için topikal ve transdermal ilaç taşıyıcı sistem olarak önerilmektedir (3,5,6).

Rutin, adını rutin içeren *Ruta graveolens* bitkisinden alan, bitkilerde doğal olarak bulunan flavonol yapısına sahip lipofilik bir maddedir (7,8). Rutosid ve quercetin-3-rutinoside olarak da bilinen rutin yapısında flavonolik quersetin ve disakkarit rutinoz bulunmaktadır. Rutinin antioksidan, antiinflamatuvar, östrojenik, sitotoksik, antitümör ve antiviral etkileri olduğu bilinmektedir. Rutinin kimyasal yapısı Şekil 1'deki gibidir (8).



Şekil 1. Rutinin kimyasal yapısı (8)

ME'lar düşük damlacık çapları sayesinde, yağda çözünen etkin maddelerin doğrudan yağ damlacıklarından derinin stratum korneum tabakasına geçişine olanak sağlamaktadır. Bu sayede etkin maddenin deriden penetrasyonunun arttığı düşünülmektedir (9). Çalışmamızda, lipofilik antioksidan bir etkin madde olan rutin ME formülasyonu geliştirilerek deriden penetrasyonunun artırılması amaçlanmıştır. Bununla birlikte, ME'ların düşük viskoziteleri cilde uygulanabilirlik problemi yaratabilmektedir (10). Bu amaçla çalışmamızda, viskozitenin artırılması amacıyla mikroemülsiyon jel (MEj) formülasyonları da hazırlanmıştır. Farklı oranlarda yağ/su/YEM kullanılarak geliştirilen ME'ların damlacık çapları ve zeta potansiyel değerleri değerlendirilerek, ideal çap ve zeta potansiyel değerine sahip rutin yüklü ME ve MEj formülasyonlarının *in vitro* salım, hücre kültürü çalışmaları ile toksisite ve hücreden geçiş özellikleri ve antioksidan etkinlikleri incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamında etkin madde olarak rutin (Sigma, Almanya), YEM olarak Tween 20 (Merck, Almanya), yardımcı YEM olarak Polietilen glikol 400 (Loba Chemie, Hindistan) ve sabit yağ olarak zeytinyağ (Komili, Türkiye) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC® CCL-1™) ve steril hücre kültürü malzemeleri (Corning®) kullanılmıştır.

### Rutin UV Spektrofotometre İle Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Rutin miktar tayini için UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bunun için rutin 100 µg/mL'lik stok çözeltisi (distile su:metanol; 7:3) hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak bir seri (10-80 µg/mL) rutin çözeltisi hazırlanmıştır. 200-550 nm aralığında dalga boyu taraması köre karşı yapılarak,  $\lambda_{max}$  değeri bulunmuştur. Hazırlanan rutin çözeltisi ile belirlenen  $\lambda_{max}$  dalga boyunda ölçümler yapılarak, yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.

### Mikroemülsiyonların Hazırlanması

Çalışmamızda, ME formülasyonları titrasyon yöntemi ile hazırlanmıştır (11). Yağ fazına 2:1 oranında Tween 20:Polietilen glikol (PEG) 400 karışımı ilave edilerek manyetik karıştırıcıda yarım saat süreyle oda sıcaklığında 400 rpm dönüş hızıyla sürekli karıştırılarak üzerine hesaplı miktarda su damla damla ilave edilmiştir. Yağ, YEM ve yardımcı YEM ve suyun farklı oranlarda kullanılmasıyla hazırlanan ME formülasyonlarının içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. ME formülasyonlarının bileşimi

Formülasyon	Zeytinyağ (% a/a)	Tween 20:PEG 400 oranı	Tween 20:PEG 400 (% a/a)	Su (% a/a)
F1	5	2:1	50	45
F2	5	2:1	55	40
F3	7,5	2:1	45	47,5
F4	7,5	2:1	47,5	45
F5	10	2:1	45	45
F6	10	2:1	50	40

PEG: Polietilen glikol, a/a: ağırlık/ağırlık

### Mikroemülsiyonların Karakterizasyonu

Geliştirilen ME'ların karakterizasyonu kapsamında damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel değerleri, dilüsyon testleri ve viskozite ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca santrifüj, bekletme ve dondurup-çözme işlemleri sonrası ME'ların stabilite açısından değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir (11).

### Mikroemülsiyonların Damlacık Büyüklüğü ve Dağılımının Tayini

ME'ların damlacık büyüklüğü ve dağılımı ölçümünde Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Aletin çalışma prensibi; dinamik ışık saçılımı ve foton korelasyon spektroskopisi ile Brown hareketlerin ölçülmesi ve bu ölçüm sonucunun damlacık boyutu ile ilişkilendirilmesine dayanmaktadır. Ölçümler 6 paralel olarak yapılmıştır.

### Mikroemülsiyonların Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi

ME'ların zeta potansiyel ölçümlerinde de Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer, İngiltere) cihazından yararlanılmıştır. Zeta potansiyel ölçümü elektroforez prensibine dayanmaktadır. Buna göre; ortamda bulunan yüklü partiküllerin elektriksel alandaki hareketi esas alınarak ölçüm yapılır. Bu çalışmada ölçümler 6 paralel olarak yapılmıştır.

### Dilüsyon Testi

ME'lar, emülsiyon tipini belirlemek ve sulu faz ile karışabilirliğini doğrulamak için distile suyla (1:1) oranında seyreltilmiş ve dilüsyon sonrası ME'un oda sıcaklığındaki stabilitesi faz ayrımı olup olmamasına göre değerlendirilmiştir.

### Mikroemülsiyonların Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Geliştirilen ME formülasyonlarının stabilitelerinin belirlenmesi için ME'lar 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (n=3). Ayrıca ME'lar üçer seri halinde 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj (Thermo Scientific) edilerek veya -80 °C'de iki saat dondurulup oda sıcaklığında çözündürülerek; bekletme, santrifüj ve dondurup çözme sonrası ME'lar gözlemlenerek stabiliteleri değerlendirilmiştir.

### Rutin İçeren Mikroemülsiyon ve Mikroemülsiyon Jellerin Hazırlanması

Tablo 1'deki ME formülasyonlarından karakterizasyon çalışmaları sonucunda ideal ME'lar ile rutin etanoldeki çözeltisinin (222 µg/mL) yağ fazına ilavesiyle rutin yüklü ME'lar hazırlanmıştır. Ayrıca bu ME'ların pH'sı, trietanolamin yardımıyla 5,5'e ayarlanmış ve %1'lik (a/h) Karbopol 938 ile MEj formülasyonları da hazırlanmıştır. MEj'ler, dört saat manyetik karıştırıcıda karıştırılan %1'lik (a/h) Karbopol 938 ile, rutin yüklü ME formülasyonlarının 1:1 (h/h) oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (12).

### Formülasyonların Viskozitelerinin Belirlenmesi

ME ve MEj'lerin viskozitesi Brookfield LV Viskozimetre (LV DV-I Prime, ADB) kullanılarak, 20 rpm dönüş hızında oda sıcaklığında 14 numaralı spindle kullanılarak yapılmıştır (n=3).

### İn vitro Salım Çalışması

Seçilen ME ve MEj formülasyonları ile in vitro salım çalışması yapılmıştır (n=3). *In vitro* salım çalışması öncesi diyaliz membran (12 kDa) 24 saat boyunca distile su ile ıslatılmış ve daha sonra diyaliz membran torbası (5

cm) içerisine formülasyonlar 1'er mL konularak, ortam sıcaklığı 37±0,5°C'ye ayarlanmış ve sabit hızda karıştırma deney süresince devam etmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (4. ve 6. saatlerde) örnekler alınarak rutin miktar tayini UV spektrofotometre ile 353 nm'de yapılmıştır.

### Hücre Kültürü Çalışmaları

#### Toksosite Testi

Çalışmamızda, L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki etkin maddemiz rutin bir seri çözeltisi ve geliştirilen rutin yüklü ME formülasyonlarının toksik etkisi sıklıkla kullanılan MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit) testi ile belirlenmiştir. Rutinin 1000-15,625 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çözeltisi ve boş ve etkin madde yüklü ME ve MEj formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler deney yapılıncaya kadar +4°C'de saklanmış ve test için 37±0,5°C'ye getirildikten sonra kullanılmıştır.

Test için kullanılacak L929 hücreleri 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında üretilmiştir. Test maddeleri, hücre ortamı Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ile hazırlandıktan sonra kuyucuklara eklenmiş (100 µL) ve 24 saat 37±0,5 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir. Dört saatin sonunda kaplardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara 100 µL taze hücre kültür ortamı ile 13 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Kültür kapları hemen alüminyum folyoyle sıkıca sarılmış ve dört saat 37±0,5 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir. Dört saatin sonunda etüvden çıkarılan kaplar boşaltılmış ve kuyucuklara 100'er µL DMSO ilave edilmiştir. Oluşan mor rengin absorbans spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edilmiştir. Farklı derişimlerdeki maddeler için farklı absorbans değerleri elde edilmiş ve bu değerlerden hareketle yüzde canlılık hesapları aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (13).

$$\text{Eşitlik 1: \% canlılık} = \left( \frac{[\text{Abs}_{\text{örnek}} \times 100]}{\text{Abs}_{\text{hücrekontrol}}} \right)$$

### Hücre Geçiş Çalışması

Hücre geçiş çalışmalarında L929 hücreleri 0,4 µm por çaplı, altı kuyucuklu özel hücre kapları (Transwell®, Corning, ABD) üzerinde tek tabaka halinde üretildikten sonra deney başlatılmıştır. Hücreden geçiş çalışmaları için hazırlanan rutin çözeltisi ve ideal formülasyon olarak belirlenen ME ve MEj formülasyonları (F2 ve F5) apikal kısma uygulanmıştır. Daha sonra belirlenen süre (4. ve 6. saatler) sonunda bazolateral kısma geçen rutin miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

### Antioksidan Etki Tayini

Altı farklı geliştirilen ME formülasyonları arasından ideal formülasyon olarak belirlenen F2 kodlu ME'un *in vitro* salım çalışması sonunda elde edilen rutin miktarı belirlenmiş ve antioksidan etkisi tayin edilmiştir. Antioksidan aktivite için Gyamfi ve ark. uyguladığı metod kullanılarak 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (14). 50 µL örnek; 450 µL Tris-HCl tamponu (50 nM, p.H 7,4) ve 1mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış ve DPPH• çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Analizler üç paralel yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

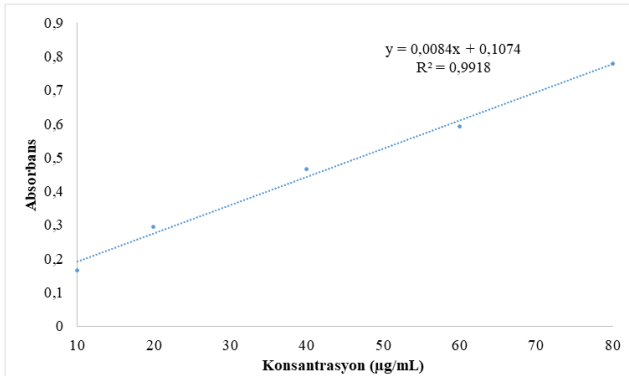
**Eşitlik 2:** % inhibisyon =  $[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$

Bir diğer test modeli olan ABTS<sup>•+</sup> radikal süpürücü aktivite tayini, Re ve ark. uyguladığı metod ile belirlenmiştir (15). ABTS<sup>•+</sup> radikali (7 mM) ABTS'in sulu çözeltisi ile K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiş ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0,700 (±0,030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) örnek (10 µL) ile karıştırılmış ve 734 nm'de bir dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Trolox'a eşdeğer olarak (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) hesaplanmıştır.

## BULGULAR

### Rutin Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi

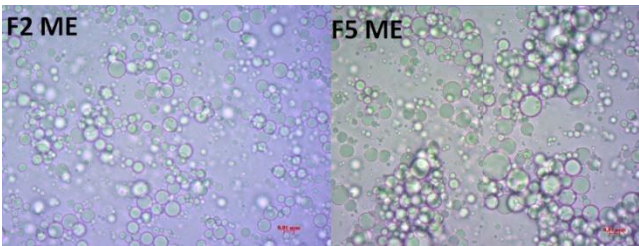
Rutin miktar tayininde kullanılan UV spektrofotometrede yapılan dalga boyu taramasında maksimum dalga boyu literatürle uyumlu şekilde 353 nm olarak saptanmıştır (16). Bir seri hazırlanan rutin çözeltisi (10-80 µg/mL) ile 353 nm'de ölçümler yapılarak yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir (n=6). Rutinin distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu Şekil 2'de verilmiştir.



**Şekil 2.** Rutinin distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=6) µg/mL: mikrogram/mililitre

### Mikroemülsiyonların Hazırlanması

Tablo 1'de verilen titrasyon yöntemiyle üretilen y/s tipi ME'lar, genel olarak şeffaf ve homojen bir görüntüye sahiptir. ME'lara ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 3'te verilmiştir.



**Şekil 3.** F2 ve F5 kodlu ME'ların optik mikroskop görüntüleri (40x)

### Mikroemülsiyonların Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Değerlerinin Tayini

ME'ların damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyelleri Tablo 2'de görülmektedir. ME'lar 1,0-2,1 µm arasında damlacık büyüklüğüne ve (-13,5) – (-35,7) arasında zeta potansiyel değerlerine sahip olarak bulunmuştur. En küçük damlacık büyüklüğüne sahip olan formülasyon en düşük yağ ve en yüksek YEM:yardımcı YEM kullanılarak hazırlanan F2 ME olmuştur. Bu ME'lardan en küçük damlacık büyüklüklerine ve stabil olduklarını gösteren uygun zeta potansiyellere sahip olmaları nedeniyle F2 ve F5 kodlu formülasyonları ideal formülasyonlar olarak belirlenmiştir.

**Tablo 2.** ME formülasyonlarının damlacık büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri (n=3)

Formülasyon	Damlacık büyüklüğü (µm±SS)	Zeta Potansiyel (mV±SS)
F1	1,335±0,02	-20,0±0,2
F2	1,002±0,01	-33,6±0,3
F3	2,142±0,04	-13,5±0,2
F4	2,060±0,05	-21,3±0,4
F5	1,247±0,02	-35,7±0,4
F6	1,880±0,03	-21,3±0,3

\*Veriler ortalama değer±standart sapma (SS) kullanılarak ifade edilmiştir, µm: mikrometre, mV: milivolt

### Mikroemülsiyonların Stabilitelerinin Belirlenmesi

ME'ların bekletme, dondurup çözme ve santrifüj işlemleri sonrası homojen yapılarını koruma durumlarına göre stabiliteleri belirlenmiştir. Tablo 3'te görüldüğü gibi düşük damlacık büyüklüğüne ve -30 mV değerinin altında zeta potansiyel değerlerine sahip F2 ve F5 kodlu mikroemülsiyonların bekletme, dondurup çözme ve santrifüj işlemleri sonrası homojen, tek fazlı yapılarının bozulmadığı, stabilitelerini korudukları görülmüştür.

**Tablo 3.** ME'ların stabilitelerinin değerlendirilmesi

Formülasyon	Bekletme	Santrifüj	Dondurup çözme
F1	Bifazik	Bifazik	Bifazik
F2	Stabil, homojen	Stabil, homojen	Stabil, homojen
F3	Bifazik	Bifazik	Bifazik
F4	Bifazik	Bifazik	Bifazik
F5	Stabil, homojen	Stabil, homojen	Stabil, homojen
F6	Bifazik	Bifazik	Bazik

### Rutin İçeren Mikroemülsiyonların ve Mikroemülsiyon Jellerin Hazırlanması

Hazırlanan ME'lardan stabilite, damlacık boyutları ve zeta potansiyelleri göz önüne alınarak ideal olarak belirlenen F2 ve F5 kodlu formülasyonlara toksisite testinde belirlenen konsantrasyonda rutin ilave edilerek, rutin yüklü ME ve MEj'ler hazırlanmıştır.

Rutin yüklü ME'lar rutin etanoldeki çözeltisi yağ fazına ilave edilerek, Tablo 1'deki yağ:su:YEM:yardımcı YEM oranları kullanılarak hazırlanmıştır. MEj'ler ise, rutin yüklü ME ile 1:1 (h/h) oranında %1'lik (a/h) Karbopol 938 çözeltisi ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Üretilen bu rutin yüklü ME ve MEj'lerin damlacık büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve viskoziteleri Tablo 4'te verilmiştir.

Beklenildiği gibi; MEj'lerde viskozite artmıştır. MEj'lerde zeta potansiyel değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, damlacık büyüklüklerinde de ME formülasyonlarına göre artış gözlenmiştir.

**Tablo 4.** Rutin yüklü ME ve MEj'lerin damlacık büyüklükleri, zeta potansiyel değerleri ve viskoziteleri (n=3)

Formülasyon	Damlacık büyüklüğü ( $\mu\text{m}\pm\text{SS}$ )	Zeta Potansiyel ( $\text{mV}\pm\text{SS}$ )	Viskozite (cP)
F2ME	1,10±0,04	-32,1±0,3	76,2±0
F2MEj	2,56±0,14	-30,2±0,5	156,2±2,0
F5ME	1,32±0,05	-34,5±0,6	37,1±2,0
F5MEj	3,12±0,18	-31,0±0,2	167,9±3,9

\*Veriler ortalama değer±standart sapma (SS) kullanılarak ifade edilmiştir,  $\mu\text{m}$ : mikrometre, mV: milivolt, cP: centipoise

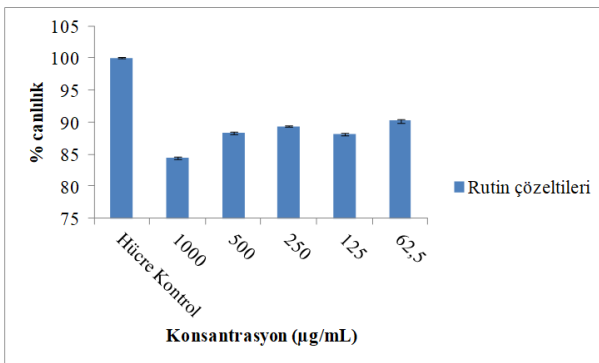
### İn vitro Salım Çalışması

Rutin içeren F2 ve F5 kodlu ME ve MEj'lerin *in vitro* salım çalışması, yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Dördüncü ve altıncı saatte alınan numuneler, 353 nm'de UV spektrofotometrede absorbans ölçülerek, salınan etkin madde miktarı hesaplanmıştır. 6. saat sonunda rutin çözeltisinin sadece %20,3±1,51'i salınmışken, hazırlanan F2 kodlu ME'da salınan rutin miktarı %67,5±2,01'e, F5 kodlu ME'da ise %43,9±1,85'e kadar artmıştır. MEj'lerde ise rutin salımı sırasıyla %32,7±1,48 ve %25,4±1,03 olarak belirlenmiştir. Bu salımdaki azalmanın jel yapısında viskozitenin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 4).

### Hücre Kültürü Çalışmaları

#### Toksosite Testi

Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde yapılan MTT testi sonucu elde edilen yüzde canlılık değerleri, Şekil 4'te gösterilmiştir. Rutinin farklı konsantrasyondaki çözeltilerinde %84,4-90,2 arasında değişen hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 4). Rutin ME ve MEj formülasyonlarının Şekil 5'te görülebileceği gibi, hücre canlılığı üzerindeki etkileri %50'nin üzerindedir.

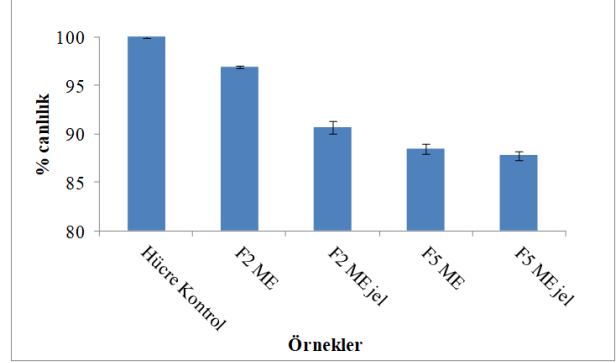


**Şekil 4.** Farklı konsantrasyondaki rutin çözeltilerinin L929 fare fibroblast hücre hattındaki toksisitesi (n=8) ( $\mu\text{g/mL}$ : mikrogram/mililitre)

### Hücre Geçiş Çalışması

ME ve MEj formülasyonlarının deriden geçişinin tahmin edilebilmesi amacıyla *in vitro* hücre geçiş çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, F2 ME'dan %43,4±1,41 rutin geçerken, F2 MEj'de bu oran %18,2±1,08'e kadar azalmıştır. Aynı şekilde F5 ME'da %41,3±1,21 rutin geçişi gözlenirken, F5 MEj'de bu oran

%14,90±0,98'e kadar azalmıştır. Bu sonuçlar jel yapısının hücre hattından rutin geçişini kısıtladığını göstermiş ve F2 kodlu ME formülasyonunun deriden en fazla rutin geçişine olanak sağlayan formülasyon olması sebebiyle ideal formülasyon olarak seçilmiştir. F2 kodlu ME'undan salınan rutin miktarının antioksidan etkisi tayin edilmiştir.



**Şekil 5.** F2 ve F5 kodlu ME ve MEj'lerin L929 fare fibroblast hücre hattındaki toksisitesi (n=8)

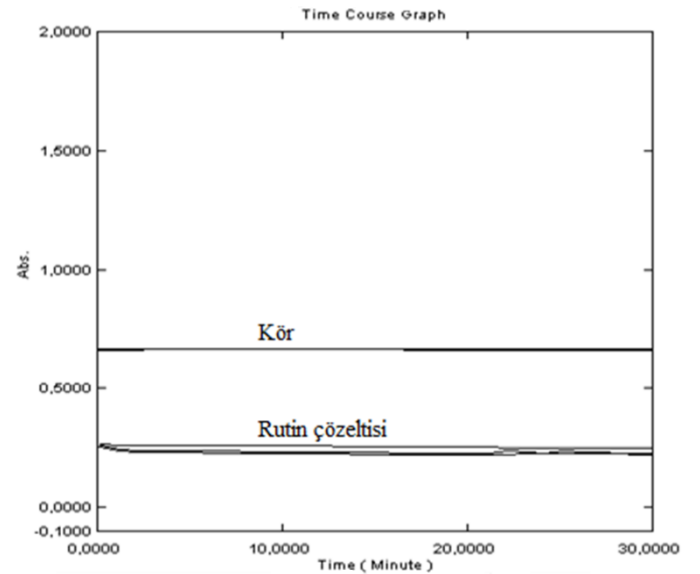
### Antioksidan Aktivite

Salım örneğinin, DPPH ve ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürücü özelliği incelendiğinde, altı saatin sonunda DPPH radikalinin %33,6'sını süpürebildiği tespit edilmiştir. ABTS<sup>•+</sup> radikali süpürücü aktivite tayininde ise Troloksa eşdeğer hesaplanan TEAC değeri 1,79±0,02 mmol/L/Trolox bulunmuştur (Tablo 5 ve Şekil 6).

**Tablo 5.** Salım örneğinin antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar (n=3)

	TEAC (mmol/L/Trolox)	DPPH (%İnhibisyon)
Rutin	1,79±0,02	33,63±2,90

\*Veriler ortalama değer±standart sapma (SS) kullanılarak ifade edilmiştir, mmol/L: milimol/litre, TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)



**Şekil 6.** Salım örneğinin 30 dakika boyunca ABTS+• radikalini süpürücü aktivitesi (ABTS+•: 2,2-Azino-bis3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)

## TARTIŞMA

ME'lar, termodinamik açıdan kararlı, çözeltilere nazaran ilaç emilimini önemli ölçüde arttıran formülasyonlardır. Özellikle biyoadeziv jel ile kombinasyonu topikal tedavi uygulamada umut verici bulunmaktadır (10). Çalışmamızda, antioksidan etkili lipofilik bileşik olan rutin ile ME ve MEj formülasyonlarının geliştirilmesi, *in vitro* karakterizasyonu, hücre canlılığı üzerindeki etkinliği ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Literatürde kanser tedavisinde kullanılmak üzere üretilen rutin yüklü nano/mikroemülsiyon çalışmaları bulunsa da, sağlıklı hücre üzerinde antioksidan etkinliğin değerlendirildiği rutin yüklü nano/mikroemülsiyon çalışması bulunmamaktadır (17,18).

Farklı yağ/su/YEM:yardımcı YEM oranları kullanılarak geliştirilen ME'ların damlacık büyüklüğü sonuçları değerlendirildiğinde, formülasyondaki yağ oranı en düşük ve YEM/yardımcı YEM (Tween20:PEG400) miktarı en yüksek olan F2 kodlu formülasyonun en düşük damlacık boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir. F2 ve F5 kodlu ME'ların damlacık büyüklükleri sırasıyla 1,002±0,01 µm ve 1,247±0,02 µm, zeta potansiyelleri ise sırasıyla -33,6±0,3 mV ve -35,7±0,4 mV olarak tayin edilmiştir. Zeta potansiyel, koloidal sistemlerin stabilitesinin değerlendirilmesinde etkilidir. Zeta potansiyel değeri +30 mV'tan büyük ve -30 mV'tan küçük olan koloidal sistemlerin kararlı olduğu bilinmektedir (19). Damlacık büyüklüğü en küçük formülasyonlar olan F2 ve F5 kodlu ME'ların -30 mV'tan küçük zeta potansiyele sahip olması her iki formülasyonun da stabil olduğu sonucuna ulaştırmıştır.

ME'ların stabilite çalışmaları kapsamında bekletme, santrifüj ve dondurup-çözme işlemleri yapılmış ve formülasyonlar gözlenmiştir. Bekletme, santrifüj ve dondurup-çözme işlemleri sonrasında F2 ve F5 kodlu formülasyonlarda faz ayrımının gözlenmemiş olması da bu formülasyonların stabil olduklarını göstermiştir.

Yağ/su tipinde hazırlanan ME'lar, distile su ile yapılan dilüsyon testi sonrasında, homojen ve tek fazlı yapılarını korumuştur.

Yapılan *in vitro* karakterizasyon ve stabilite testleri sonrası altı farklı formülasyon arasından seçilen F2 ve F5 kodlu ME'lar ile rutin yüklü ME ve MEj formülasyonları hazırlanmıştır. Rutin yüklü F2 ve F5 kodlu ME'ların damlacık büyüklükleri sırasıyla 1,10±0,04 µm ve 1,32±0,05 µm, zeta potansiyelleri ise sırasıyla -32,1±0,3 mV ve -34,5±0,6 mV olarak belirlenmiştir. Rutin yüklü MEj'lerde ise zeta potansiyel değerleri hala -30 mV civarında iken, damlacık büyüklüklerinde ME'lara göre artış gözlenmiştir. Rutin yüklü MEj'lerde damlacık büyüklükleri F2 MEj'de 2,56±0,14µm iken F5 MEj'de 3,12±0,18 µm'ye kadar artmıştır. Zeta potansiyel değerleri ise F2 MEj'de -30,2±0,5 mV ve F5 MEj'de -31,0±0,2 mV olarak tayin edilmiş ve belirgin bir fark gözlenmemiştir (Tablo 4).

F2 ve F5 kodlu ME'ların viskoziteleri sırasıyla 76,2±0,0 ve 37,1±2,0 cP'dir. MEj'lerde ise beklenildiği gibi, viskozitede artış gözlenmiş olup, sırasıyla 156,2±2,0 cP, 167,9±3,9 cP olarak ölçülmüştür (Tablo 4). F2 kodlu formülasyonun viskozitesinin daha fazla olması ve damlacık büyüklüğünün daha küçük olması sayesinde uygulanan bölgede formülasyonun kalış süresinin ve rutin deriden absorpsiyonunun artmasını sağlayacaktır.

Bu durum, F2 kodlu formülasyonun F5'e kıyasla daha fazla *in vitro* etkin madde salımına ve yüksek hücre geçişine sahip olmasını da açıklamaktadır.

Rutin çözeltisi ve geliştirilen formülasyonlar ile ortam sıcaklığı 37±0,5°C'ye ayarlanmış distile su içinde *in vitro* salım çalışmalarında, altıncı saatin sonunda rutin çözeltisinin %20,3'ünün diyaliz membrandan (12 kDa) geçtiği belirlenmiştir. F2 kodlu ME ve MEj'den salınan rutin miktarı sırasıyla %67,5±1,21 ve %32,7±0,98 olarak, F5 kodlu ME ve MEj'de ise %43,9±1,05 ve %25,4±1,30 olarak tayin edilmiştir. Rutinin çözeltisine kıyasla ME ve MEj formülasyonlarında 6. saatin sonunda salınan rutin miktarı artmıştır. Damlacık büyüklüğündeki azalma, yüzey alanında ve dolayısıyla etkin madde salımında artışa neden olmaktadır (11). Bu durum daha küçük damlacık büyüklüğüne sahip F2 ME'ununda etkin madde salımının daha yüksek olması ile açıklamaktadır. Ayrıca MEj'lerde rutin salımı, ME'lara göre oldukça düşüktür. Bunun sebebinin, MEj formülasyonlarının viskozitesindeki artış olduğu düşünülmektedir. Literatürde, rutin ile hazırlanan ME formülasyonuna rastlanmamıştır. Farklı etkin maddelerle geliştirilen ME'lerden formülasyon parametrelerinin değişimiyle etkin madde salımının modifiye edilebildiği görülmüştür (20,21). Yapılan bir çalışmada, antioksidan etkili doğal bir bileşik olan kersetinle hazırlanan farklı ME formülasyonlarından 6. saatin sonunda ~%10-50 arasında kersetin salındığı görülmüştür (21).

Hücre kültür çalışmalarında, formülasyon geliştirme aşamasında kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkilerini incelemek, deneylerde kullanılacak etkin ve yardımcı madde miktarları belirlemek amacıyla toksisite testi yapılmaktadır. Toksikite testi sonucunda hücre canlılık oranları %50'nin üzerinde olmalıdır (22). Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metodlardan biri MTT testidir. MTT testi kolorimetrik bir yöntem olmakla birlikte esaslı, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir. Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

MTT testinde fare fibroblast hücre hattı L929 hücreleri kullanılmıştır. Rutin çözeltisi ve yeni geliştirilen formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 4'te görüldüğü gibi, değişen konsantrasyonlardaki rutin çözeltileri ile hücre canlılığı %84-90 arasında değişmiştir. Formülasyonlarda ise; F2 ve F5 ME'larda sırasıyla %97 ve %88 olarak bulunan hücre canlılığı, F2 ve F5 MEj'lerde sırasıyla %91 ve %88 olarak bulunmuştur (Şekil 5). Hem ME hem de MEj formülasyonlarının hücre hattı üzerinde yüksek canlılık göstermesi, formülasyonların ve formülasyonda kullanılan rutin miktarının (222 µg/mL) güvenle kullanılabileceği sonucuna ulaştırmıştır.

Hücre geçiş çalışmalarında da L929 hücre hattı kullanılmış ve *in vitro* salım deneyinde belirlenen süre sonunda formülasyonların hücreden geçişi incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, F2 ve F5 kodlu ME'ların hücreden geçişi %43,4±1,41 ve %41,3±1,21 iken MEj'lerin rutin hücre geçişi %18,2±1,08 ve %14,9±0,98

olarak belirlenmiştir. Yüzdelere baktığımızda, jel yapısının yüksek viskozitesi nedeniyle hücre hattından rutin geçişini kısıtladığı görülmüştür. F2 kodlu ME formülasyonu, hücre hattından en fazla rutin geçişine olanak sağlayan formülasyondur. Deriden penetrasyonu artırmada, küçük damlacık çapının tercih edilen bir özellik olması nedeniyle (23), F2 kodlu ME formülasyonu daha yüksek geçiş göstermiştir. *In vitro* salım çalışmasıyla birlikte değerlendirildiğinde, hücre hattından daha fazla rutin geçişine izin veren F2 kodlu formülasyondan salınan etkin madde miktarının daha fazla olması, sonuçlar arası korelasyon sağlamaktadır. Hem hücre geçiş çalışmasında en yüksek rutin geçişi sağlayan hem de sitotoksitesite çalışmasında % canlılık değeri kontrol grubuna en yakın olan F2 kodlu ME ideal formülasyon olarak belirlenmiş ve bu formülasyondan altı saat sonunda salındığı tespit edilen rutin miktarının antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir.

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla örneklerin antiradikal etkilerinin ölçülmesinde azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH• radikali ve mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS<sup>+</sup> radikali katyonu kullanılmıştır. Salım örneği ile yapılan çalışmalar sonucunda fizyolojik pH'da DPPH radikalini süpürücü etki belirlenmiştir. ABTS<sup>+</sup> radikali katyonu süpürücü aktivite tayini ile flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların radikal süpürücü özellikleri belirlenebilmektedir. Salım örneğinin, ABTS<sup>+</sup> radikalini DPPH radikalinden daha güçlü süpürücü aktivite sergilemesi rutin lipofilik yapısından kaynaklanmaktadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak rutin ile yeni geliştirilen ve antioksidan etkinliği kanıtlanmış ME formülasyonlarının başarıyla hazırlandığı, elde edilen veriler ışığında topikal uygulamaya yönelik rutin ME'lerinin potansiyel taşıdığı ve bu çalışmanın literatüre önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada, araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

**Yazarların Katkıları:** Fikir/Kavram: Ç.Y., T.E.B., R.N.A.; Tasarım: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K., R.N.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K., R.N.A.; Analiz ve/veya Yorum: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K., R.N.A.; Literatür Taraması: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K., R.N.A.; Makale Yazımı: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K., R.N.A.; Eleştirel İnceleme: Ç.Y., T.E.B., G.Ş.K.

## KAYNAKLAR

1. Talegaonkar S, Azeem A, Ahmad F, Khar R, Pathan S, Khan Z. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2008; 2(3): 238-57.
2. Katiyar BS, Katiyar SS, Mishra PS, Sailaja DL. Microemulsions: a novel drug carrier system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013; 20(2): 138-48.

3. Ezrahi S, Aserin A, Garti N. Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. *Adv Colloid Interface Sci*. 2019; 263: 95-130.
4. Schulman JH, Stoeckenius W, Prince LM. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry*. 1959; 63(10): 1677-80.
5. Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*. 2014; 6(1): 52-77.
6. Hajjar B, Zier K-I, Khalid N, Azarmi S, Löbenberg R. Evaluation of a microemulsion-based gel formulation for topical drug delivery of diclofenac sodium. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2017; 48(3): 351-62.
7. Morishita T, Hajika M, Sakai S, Tetsuka T. Development of simple spectrophotometric assay for the rutin-degrading enzyme in buckwheat. *Current Advances in Buckwheat Research*. 1995; 6: 833-7.
8. Saklani R, Gupta SK, Mohanty IR, Kumar B, Srivastava S, Mathur R. Cardioprotective effects of rutin via alteration in TNF-alpha, CRP, and BNP levels coupled with antioxidant effect in STZ-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2016; 420(1-2): 65-72.
9. Chen H, Chang X, Du D, Li J, Xu H, Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 315(1-2): 52-8.
10. Mali KK, Dhawale SC, Dias RJ. Microemulsion based bioadhesive gel of itraconazole using tamarind gum: in-vitro and ex-vivo evaluation. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017; 21(3): 688-700.
11. Sumedha P, Narayana CR, Sandeep D, Ravi G, Anoop NV. Microemulsion based gel of sulconazole nitrate for topical application. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020; 17(3): 259-64.
12. Khalil Y, Khasraghi A, Mohammed E. Preparation and evaluation of physical and, rheological properties of clotrimazole emulgel. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 20(2): 19-27.
13. Yücel Ç, Şeker Karatoprak G, Değim IT. Anti-aging formulation of rosmarinic acid-loaded ethosomes and liposomes. *Journal of Microencapsulation*. 2019; 36(2): 180-91.
14. Gyamfi M, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *General Pharmacology*. 1999; 32(6): 661-7.
15. Re R, Pellegrini NP, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26(9-10): 1231-7.
16. Abualhasan MN, Mansour J, Jaradat N, Zaid AN, Khadra I. Formulation and development of a validated UV-spectrophotometric analytical method of rutin tablet. *Int Sch Res Notices*. 2017; 2017: 1-7. doi: 10.1155/2017/2624947
17. Ahmad M, Sahabjada -, Akhtar J, Hussain A, Badaruddeen -, Arshad M, et. al. Development of a new rutin nanoemulsion and its application on prostate carcinoma PC3 cell line. *EXCLI Journal*. 2017; 16: 810-23.

18. Savale SK. Formulation and evaluation of intranasal microemulsion containing rutin. *Asian Journal of Biomaterial Research*. 2017; 3(6): 25-7.
19. Pate K, Safier P. Chemical metrology methods for CMP quality. In: Babu S, editor. *Advances in chemical mechanical planarization (CMP)*. Newyork: Woodhead Publishing; 2016. p. 299-325.
20. Songkro S, Lo NL, Tanmanee N, Maneenuan D, Boonme P. In vitro release, skin permeation and retention of benzophenone-3 from microemulsions (o/w and w/o). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2014; 24(6): 703-11.
21. Kajbafvala A, Salabat A, Salimi A. Formulation, characterization, and *in vitro/ex vivo* evaluation of quercetin-loaded microemulsion for topical application. *Pharm Dev Technol*. 2018; 23(8): 741-50.
22. Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 232(1-2): 183-92.
23. Cui Y. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of ligustrazine phosphate. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011; 5(14): 1674-81.