



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOZMETİK ÜRÜNLERİNDE KULLANILAN BAZI
KORUYUCULARIN UÇUCU YAĞLAR İLE
KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYEL VE MUTAJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TUĞÇE KOÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. ÜMRAN SOYOĞUL GÜRER

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji
Tez Sahibi : Tuğçe Koçoğlu
Tez Başlığı : Kozmetik ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların uçucu yağlar
ile kombinasyonlarının antimikrobiyel ve mutajenik etkilerinin
araştırılması
Sınav Yeri : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 25/02/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

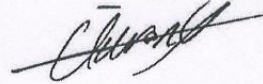
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Ümran Soyoğul Gürer

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza



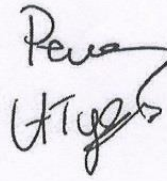
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Yard.Doç.Dr. Pervin Rayaman

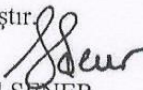
Marmara Üniversitesi

Yard.Doç.Dr. Ayfer Beceren

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.03.2016 tarih ve 32 sayılı kararı ile onaylanmıştır


Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuğçe KOÇOĞLU



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER'e,

Toksikoloji çalışmalarım esnasında bana deney aşamamda yardım ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Ayfer BECEREN'e,

Çalışmamın deney aşamasında ilgi, yardım ve desteklerini gördüğüm çok değerli hocalarım Sayın Yard. Doç. Dr. Erkan RAYAMAN, Öğr. Gör. Dr. Burçak GÜRBÜZ, Ecz. Esra Dalkılıç ve Yard. Doç. Dr. Pervin RAYAMAN'a,

Çalışmamızda kullandığımız koruyucu ürünleri temin ettiğimiz Matilek Medikal Ürünler Ar-Ge Müdürü Sayın Ecz. Hatice SARIYER'e ve çalışmamızda kullandığımız uçucu yağları temin ettiğimiz Florame Türkiye Genel Müdürü Sayın Fatma APAYDIN'a,

Yüksek lisans eğitimime beraber başladığım ve deneylerim sırasında desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Biyolog Bahar KOCA, Biyolog Nurten TETİK, Biyolog Kamile YILDIRIM, Biyolog Ezgi DOĞDUAY ve Biyolog Hatice Merve ALTINDAĞ'a,

Tez çalışmam süresinde yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili iş arkadaşım Biyolog Aydın BULDUR'a,

Hayatımın her anında daima yanımda olan ve beni her konuda destekleyen çok kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: SAG-C-YLP-110215-0024.

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	X
RESİMLER LİSTESİ	XIII
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Kozmetik Ürünlerin Tanımı ve Sınıflandırılması	5
4.2.Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyel Kontaminasyonu	6
4.3.Mikrobiyel Kontaminasyon Kaynakları	11
4.3.1. Su	11
4.3.2. Hammadde	12
4.3.3. Ambalaj	12
4.3.4. Personel	13
4.3.5.Üretim tesisi ve donanım	13
4.3.6.Kullanım sırasında kontaminasyon	14
4.4. Mikrobiyel Kontaminasyona Duyarlı Kozmetik Ürünler	14
4.4.1.Deri ürünleri	14
4.4.2.Göz ürünleri	15

4.4.3.Oral ürünleri	16
4.4.4. Solunum ile ilgili ürünler	17
4.5.Kozmetik Ürünlerde Saptanan Mikrobiyel Flora	18
4.6. Kozmetik Ürünlerde Mikroorganizma Limitleri	19
4.7. Kozmetik Ürünlerde Mikrobiyel Kontaminasyonun Önlenmesi ve Koruyucu Kullanımı	22
4.8. Koruyucu Aktivitesini Etkileyen Faktörler	25
4.8.1.Koruyucunun konsantrasyonu	25
4.8.2.pH	25
4.8.3.Sıcaklık	26
4.8.4.Işık	26
4.8.5.Çözünürlük özelliği	26
4.8.6.Yüzey aktif maddeler	26
4.8.7.Mikroorganizmalar	27
4.8.8.Ambalaj malzemeleri	27
4.9. Kozmetik Ürünlerde Kullanılan Koruyucular	27
4.10 Çalışmada Kullanılan Koruyucular	29
4.10.1.Benzil alkol	29
4.10.2.Benzoik asit	30
4.10.3.Fenoksietanol	30
4.11. Kozmetik Ürünlerin Güvenlik Değerlendirmesi	33

4.12. Kozmetik Ürönlere Koruyucular Dışında İlave Edilen Bitki Bileşenleri	37
4.12.1. Uçucu yağların genel özellikleri	37
4.12.2. Uçucu yağların antimikrobiyel aktivitesi	39
4.12.3. Uçucu yağların kozmetik ürünlerdeki kullanımı	42
4.12.4. Çalışmada kullanılan esansiyel yağlar	45
4.12.4.1.Çay ağacı yağı (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	45
4.12.4.2.Itır yağı (<i>Pelargonium graveolans</i>)	46
4.12.4.3.Palmarosa yağı(<i>Cymbopogon martini</i>)	47
4.13. Ames Testi Esası	48
5. GEREÇ VE YÖNTEM	50
5.1. Gereç	50
5.1.1. Uçucu yağlar	50
5.1.2. Koruyucular	50
5.1.3. Mikroorganizmalar	50
5.1.4. Çözeltiler	50
5.1.5.McFarland standart bulanıklık tüpleri	51
5.1.6. Antibiyotikler	51
5.1.7.Kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri	51
5.1.8. Yöntemde kullanılan araç ve cihazlar	53
5.1.9.Katyon ayarlı MHB besiyerinin hazırlanması	54

5.2. Yöntem	55
5.2.1.Disk difüzyon testi	55
5.2.2.Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) tespiti	55
5.2.3.Ames MPF TM testi	57
5.2.3.1. Yöntemde kullanılan çözeltiler	57
5.2.3.1.1. Metabolik aktivasyon sağlayıcı enzimin (=S9 karışımı) hazırlanması	57
5.2.3.2 Ames testi yapılışı	59
5.2.3.2.1. Pozitif kontrol çözeltilerinin hazırlanışı	59
5.2.3.2.2. Testin yapılışı	59
6. BULGULAR	73
6.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Aktivitesi	73
6.2. Koruyucuların Antimikrobiyel Aktivitesi	77
6.3. Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antimikrobiyel Aktivitesi	81
6.4. Ames MPF Testi Sonuçları	91
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	120
8. KAYNAKLAR	126
9. EK	145
10.ÖZGEÇMİŞ	146

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Ames MPF: Ames Microplate Fluctuation

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CTFA: Cosmetics, Toiletries and Fragrance Association

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

FDA: Food and Drug Administration

gr: Gram

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth

KOB: Koloni Oluşturan Birim

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller Hinton Broth

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MLK: Minimum Lethal Konsantrasyon

MOPS: Morfolino Propan Sülfonik Asit

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

mL: Mililitre

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

USP: United States Pharmacopoeia

WHO: Dünya Sağlık Teşkilatı

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Benzil alkolün kimyasal yapısı	29
Şekil 2. Benzoik asitin kimyasal yapısı	30
Şekil 3. Fenoksietanolün kimyasal yapısı	30
Şekil 4. Bakteri kültürünün homojenize hale getirilmesi.	61
Şekil 5. 96 kuyucuklu mikrolakada seyreltme işlemi.	63
Şekil 6. 96 kuyucuklu seyreltme mikrolakasından 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına aktarım işlemi.	64
Şekil 7. 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına bakteri ekimi	65
Şekil 8. 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakalarına endikatör besiyerinin eklenmesi	67
Şekil 9. 24 kuyucuklu mikrolakadan 384 kuyucuklu mikrolakaya aktarım işlemi	67
Şekil 10. Kuyucukların görünüşü	68
Şekil 11. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Concertrations” çalışma sayfası	70
Şekil 12. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “raw data” çalışma sayfası	71
Şekil 13. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Summary” çalışma sayfası	72
Şekil 14. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Graphs” çalışma sayfası	72
Şekil 15. İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği	106
Şekil 16. İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği	106
Şekil 17. İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	107
Şekil 18. İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	107
Şekil 19. Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği	108
Şekil 20. Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği	108

Şekil 21. Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	109
Şekil 22. Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	109
Şekil 23. Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği	110
Şekil 24. Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği	110
Şekil 25. Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	111
Şekil 26. Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	111
Şekil 27. Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği	112
Şekil 28. Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği	112
Şekil 29. Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	113
Şekil 30. Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	113
Şekil 31. Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği	114
Şekil 32. Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği	114
Şekil 33. Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	115
Şekil 34. Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	115
Şekil 35. Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği	116
Şekil 36. Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği	116
Şekil 37. Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	117

Şekil 38. Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	117
Şekil 39. Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği	118
Şekil 40. Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği	118
Şekil 41. Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği	119
Şekil 42. Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği	119

TABLoların LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Kozmetik Ürünlerin Kategorilerini Gösteren Liste	5
Tablo 2. Su Aktivitesi ve Potansiyel Mikroorganizma Büyümesi	8
Tablo3. Kozmetiklerdeki Kontaminantlar Nedeni ile Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar	10
Tablo 4. Kontamine Kozmetik Ürünlerde Görülebilen Mikroorganizmalar	19
Tablo 5. Kozmetik Ürünlerde İzin Verilen Mikroorganizma Sayısı	20
Tablo 6. Kozmetik Ürünlerde Sık Kullanılan Koruyucular	28
Tablo 7. Genel Kullanım Konsantrasyonlarında ki Antimikrobiyel Aktivite Aralığı	31
Tablo 8. Kozmetik Dermatitlerde En Sık Karşılaşılan Maddeler	34
Tablo 9. Esansiyel Yağların Elde Edilmesinde Kullanılan Başlıca Yöntemler	39
Tablo 10. Cilt Üzerine Uygulanan Kozmetik Ürünlerin Bileşiminde Yer Alan Bazı Bitkiler ve Kullanılış Amaçları	43
Tablo 11. Çay Ağacı Yağının Temel Bileşenleri (ISO 4730-2004)	46
Tablo12. <i>S.typhimurium</i> TA98 ve TA100 Mutant Suşlarının Genetik Özellikleri	49
Tablo 13. S9 Karışımı İçin Gerekli Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları ve Saklama Koşulları	58
Tablo 14. %30'luk S9 Karışımının Hazırlanması	58
Tablo 15. Pozitif Kuyucukların Kayıt Edilmesi	69
Tablo16. Uçucu Yağların Antibakteriyel Aktivite Sonuçları	75
Tablo17. Uçucu Yağların Antifungal Aktivite Sonuçları	76
Tablo18. Koruyucuların Antibakteriyel Aktivite Sonuçları	79
Tablo19. Koruyucuların Antifungal Aktivite Sonuçları	80

Tablo 20. Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antibakteriyel Aktivite Sonuçları	83
Tablo 21. Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antifungal Aktivite Sonuçları	87
Tablo 22. İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	92
Tablo 23. İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	92
Tablo 24. İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 98 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	93
Tablo 25. İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 100 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	93
Tablo 26. Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	94
Tablo 27. Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	94
Tablo 28. Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 98 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	95
Tablo 29. Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 100 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	95
Tablo 30. Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	96
Tablo 31. Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	96
Tablo 32. Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 98+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	97
Tablo 33. Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA 100+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	97
Tablo 34. Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	98

Tablo 35. Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	98
Tablo 36. Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 98+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	99
Tablo 37. Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 100+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	99
Tablo 38. Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	100
Tablo 39. Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	100
Tablo 40. Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 98+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	101
Tablo 41. Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 100+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	101
Tablo 42. Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	102
Tablo 43. Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA 100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	102
Tablo 44. Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	103
Tablo 45. Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	103
Tablo 46. Benzil alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	104
Tablo 47. Benzil alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	104
Tablo 48. Benzil alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	105
Tablo 49. Benzil alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100+ S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu	105

RESİMLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. Palmarosa uçucu yağının <i>Staphylococcus epidermidis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivitesi	73
Resim 2. Çay ağacı uçucu yağının <i>Staphylococcus epidermidis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivitesi	74
Resim 3. Palmarosa uçucu yağının <i>Candida tropicalis</i> 'e karşı antifungal aktivitesi	74
Resim 4. Benzil alkolün <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya karşı antibakteriyel aktivitesi	77
Resim 5. Fenoksietanol + benzoik asidin ve fenoksietanol + kaprilil glikolün <i>Candida parapsilosis</i> 'e karşı antifungal aktivitesi	78
Resim 6. Benzil alkol + ıtır kombinasyonunun <i>Staphylococcus epidermidis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivitesi	81
Resim 7. Benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun <i>Staphylococcus epidermidis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivitesi	82
Resim 8. Benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun <i>Candida guilliermondii</i> 'e karşı antifungal aktivitesi	82

Kozmetik Ürünlerinde Kullanılan Bazı Koruyucuların Uçucu Yağlar ile Kombinasyonlarının Antimikrobiyel ve Mutajenik Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Tuğçe Koçoğlu

Danışmanı: Prof. Dr. Ümran Soyoğul Güner

Anabilim Dalı: Farmasötik Mikrobiyoloji

1.ÖZET

Amaç: Çalışmamızda; kozmetik ürünlerinde kullanılan bazı koruyucular ve uçucu yağların tek başına ve kombinasyonlarının antimikrobiyel ve mutajenik etkileri in vitro araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çay ağacı, ıtır, palmarosa uçucu yağları ile fenoksietanol + benzoik asit, fenoksietanol + kaprilil glikol, fenoksietanol + etilheksilgliserin ve benzil alkol koruyucularının tek başına ve kombinasyonlarının antimikrobiyel etki tayininde disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Ames Microplate Fluctuation (MPF) testi ile mutajenik etki araştırılmıştır. *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşları kullanılmıştır.

Bulgular: Koruyuculardan benzil alkolün bakterilere karşı; fenoksietanol + benzoik asidin ve fenoksietanol + kaprilil glikolün ise mayalara karşı en yüksek antimikrobiyel etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Uçucu yağlardan palmarosa ve çay ağacı bakterilere karşı; palmarosa yağının ise mayalara karşı en yüksek antimikrobiyel etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Benzil alkol + ıtır (32,59 mm/zon; MİK: %0,04) ve benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun (33,46 mm/zon; MİK: %0,09) *Staphylococcus epidermidis*'e en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiği; benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun ise (36,00 mm/zon; MİK: %0,09) *Candida guilliermondii*'ye karşı en yüksek antifungal etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Koruyucu ve uçucu yağların mutajenik etkiye sahip olmadığı ($p \geq 0.05$) belirlenmiştir.

Sonuçlar: Uçucu yağlar koruyucular ile kombine edildiğinde; uçucu yağların koruyucuların antimikrobiyel etkisini arttırdığı görülmüştür. Uçucu yağların ve koruyucuların *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşlarına karşı mutajenik aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Kozmetik ürünler, koruyucular, uçucu yağlar, antimikrobiyel etki, Ames testi

Investigation of Antimicrobial and Mutagenic Effects of Some Preservatives Used in Combination with Essential Oils in Cosmetic Products

Student's Name: Tuğçe Koçoğlu

Supervisor: Prof. Dr. Ümran Soyoğul Gürer

Department: Pharmaceutical Microbiology

2. SUMMARY

Aim: In our study; antimicrobial and mutagenic effects of some preservatives and essential oils alone and in combination were investigated in vitro.

Materials and Methods: The antimicrobial effect of tea tree, geranium, palmarosa essential oils and phenoxyethanol + benzoic acid, phenoxyethanol + caprylyl glycol, phenoxyethanol + ethylhexylglycerin and benzyl alcohol preservatives both alone and in combination with was detected by using disc diffusion and broth microdilution assay. Mutagenic effect was investigated with the test of Ames Microplate Fluctuation (MPF) by using *Salmonella typhimurium* TA 100 and TA 98 strains.

Results: Among the preservatives benzyl alcohol against bacteria; phenoxyethanol + benzoic acid and phenoxyethanol + caprylyl glycol against yeasts showed the highest antimicrobial activity. Palmarosa oil was found the most effective essential oil against yeast; while palmarosa and tea tree essential oils showed the highest antimicrobial activity against the bacteria. It was found that, combinations of benzyl alcohol + geranium (32,59 mm / zone; MIC: 0,04%) and benzyl alcohol + palmarosa (33,46 mm / zone; MIC: 0,09%) showed the highest antibacterial effect on *Staphylococcus epidermidis*; while combination of benzyl alcohol + palmarosa (36,00 mm/zone; MIC: %0,09) showed the highest antifungal activity against *Candida guilliermondii* . It was determined that preservatives and essential oils have no mutagenic effect.

Conclusion: When the essential oils were combined with preservatives; the essential oils were seen to increase the antimicrobial effect of preservatives. The essential oils and preservatives have no mutagenic activity against *Salmonella typhimurium* TA 100 and TA 98 strains.

Keywords: Cosmetics, preservatives, essential oils, antimicrobial effect, Ames test

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Kozmetiklerin oldukça geniş bir kullanım alanına sahip ürünler olduğu göz önüne alındığında bu ürünlerde meydana gelebilecek olan mikrobiyel kontaminasyonun tüketici sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturabileceği görülmektedir. Bu neden ile tüm kozmetik ürünlere geniş spektrumlu, formülasyondaki diğer maddelerle uyumlu ve kullanıcı için alerjik, toksik etkisi olmayan uygun koruyucular ilave edilmektedir (Sasseville, 2004; Bloomfield,2007).

Kozmetik endüstrisinde en çok kullanılan beş koruyucu, metilparaben (%35), propilparaben (%32), imidazolidinil üre (%9), kuaterniyum-15 (%5) ve formaldehit çözeltisi (%4)'dir. Buradan da açıkça görüldüğü gibi parabenler diğer koruyuculardan daha fazla kullanılmaktadır. Teknolojik ve kozmetik alandaki araştırmalar ilerledikçe paraben yerine alternatif birçok koruyucu üretilmeye başlanmıştır. Bu koruyucular arasında 'doğal' olarak tanımlanan koruyucularda bulunmaktadır. Bunların içinde greyfruit çekirdek ekstresi (grapefruit seed extract; GSE), kekikten elde edilen timol, sinnamaldehit, alil isotiyosiyanat, sitrik asit, askorbik asit, *Rubus rosaefolius* ekstresi (hint çiçeği ekstresi) ve *Rosmarinus officinalis* ekstresi (biberiye ekstresi) bulunmaktadır (Kunicka-Styczyńska ve ark.,2009; Manou ve ark.,1998; Ostrosky ve ark.,2011).

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar bitki kimyasının önemli bileşenleridir. Sahip oldukları bakterisidal, virusidal ve fungusidal özellikleri nedeni ile farmasötik ve kozmetik endüstrisinde orta çağlardan beri kullanılmaktadırlar. Son yıllarda ise, kozmetik endüstrilerinde özellikle parfümeri de yoğun biçimde kullanılan uçucu yağların antimikrobiyel, mutajenik ve antimutajenik yönden araştırılması önem kazanmaktadır (Kılıç,2005).

Bazı uçucu yağların tek başlarına veya karışım halinde kullanıldıklarında mikrobiyel bulaşma riskine sahip 'yağ/su' formülasyonu içeren deri kremlerinde antimikrobiyel aktivite gösterebildikleri, koruyucular ile birlikte kullanıldıklarında ise çok düşük konsantrasyonlarda (normalden 200 kez daha az) sinerjik etki gösterdikleri bildirilmiştir (Bloomfield,2007).

Kozmetiklerde kullanılan koruyucular, tipine ve konsantrasyonuna bağı olarak mikroorganizma çoğalmasını durdurabilir, yok edebilir veya mikroorganizma üremesine etkisiz olabilirler (Sivri, 2005). Koruyucuların antimikrobiyel aktivitelerinin saptanması ve koruyucu etkinlik testlerinin yapılmasında, standart test organizmalarının vejetatif üreme şekilleri kullanılmaktadır (Güven ve Onurdağ, 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kozmetik ürün ve dolayısı ile içeriklerinde yer alan kimyasallara maruziyet sonucu lösemi gibi kanser türlerinde artış olduğu bildirilmiştir (Sonia ve ark.,2002; Darbre,2003; Oishi,2002). Kanser vakaları gibi insan sağlığı için önem arz eden bulgulardaki artış antikarsinojen ve antimutajen maddelerin araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir. Kozmetik ürünlerinde kullanılan fenoksietanol, etihexilgliserin ve yeni nesil koruyucu olarak kaprilil glikolün mutajenik etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bir maddenin karsinojenik potansiyeli mutajenik kapasitesi ile yakından ilişkilidir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişki nedeni ile karsinojen maddelerin araştırılmasında kısa sürede sonuç veren ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemi geliştirilmiştir (Vural, 2005). Bu testler içerisinde en yoğun kullanılan kısa zamanlı ve geri mutasyon testi olan Ames / Salmonella / Mikrozomal (mutajenite) testidir (Mumcu, 2005). Bu test sisteminde kimyasalların mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılmak üzere bakterilerin yaşaması için gerekli olan amino asit üretimini yapan histidin geni mutasyonuna uğratılmış olan mutant suşlar kullanılmaktadır. Ames testinde bir kimyasalın mutajenik etki potansiyeli; suşlar, kimyasal test bileşeni ile muamele edildikten sonra *His*⁻suşların davranışının (*his*⁻→*his*⁺) değerlendirilmesi ile ölçülmektedir. (Mortelmans ve Zeiger, 2000; Umbuzeiro, 2010).

Çalışmamızda, insanlığın varoluşundan beri kullanılmakta olan kozmetik ürünlerin formülasyonlarında yer alan koruyucuların, tüketicilerde meydana getirdiği mutajenik ve mikrobiyel kaynaklı olumsuz etkileri nedeni ile kozmetik ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların uçucu yağlar ile kombinasyonlarının antimikrobiyel ve mutajenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kozmetik Ürünlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Kozmetik, Yunanca dekore etmek, süslemek anlamındaki “Kosmein” sözcüğünden türetilmiştir. Bu sözcüğün anlamının aynı zamanda, ‘bakmak, bakım, vücut ile aklın harmonisi’ olduğu düşünülebilir (Kışlalıoğlu,2010).

Sağlık Bakanlığı’nın 24 Mart 2005 tarihli ve 5324 sayılı Türk Kozmetik Kanunu’na göre kozmetik ürün “ İnsan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan bütün preparatları veya maddeler” şeklinde tanımlanmaktadır (T.C. Resmi Gazete, 30 Mart 2005, sayı: 25771).

Kozmetik olarak değerlendirilen ürünlerin sınıflandırılması, amaca yönelik (örneğin nemlendiriciler) yapılabileceği gibi, uygulanan yere yönelik (örneğin saça uygulanan kozmetik ürünler) ve taşıyıcı şekiller göz önüne alınarak da (örneğin krem, losyon vb.) yapılabilmektedir (Kışlalıoğlu, 2010). Sağlık Bakanlığı’nın 23 Mayıs 2005 tarihli Resmi Gazete’de yayınlanan Türk Kozmetik Yönetmeliği’ne göre, kozmetik olarak değerlendirilen ürünlerin genel kategorileri Tablo 1’de gösterilmiştir.(T.C. Resmi Gazete, 23 Mayıs 2005, sayı: 25823)

Tablo 1: Kozmetik Ürünlerin Kategorilerini Gösteren Liste

-
- ✓ Cilt için kremler, emülsiyonlar, losyonlar, jeller ve yağlar (el, yüz, ayak v.b. için)
 - ✓ Yüz maskeleri (cilt yüzeyini aşındıranlar/ soyanlar hariç)
 - ✓ Fondötenler (sıvı, pat, toz)
 - ✓ Makyaj pudraları, banyo sonrası kullanılacak pudralar, hijyenik pudralar v.b.
 - ✓ Kozmetik ürün tanımı kapsamındaki tuvalet sabunları, deodorant sabunlar v.b.

Tablo 1: Kozmetik Ürünlerin Kategorilerini Gösteren Liste (Devamı)

-
- ✓ Parfümler, tuvalet suları (eau de toilette), ve kolonyalar (eau de Cologne)
 - ✓ Banyo ve duş ürünleri (tuzlar, köpükler, yağlar, jeller v.b.)
 - ✓ Depilatuvarlar (kıl dökücü ve kıl sökücüler)
 - ✓ Deodorantlar ve ter önleyiciler
 - ✓ Saç bakım ürünleri:
 - Saç boyaları ve açıcılar
 - Dalgalandırma ve düzleştirme ve sabitleştirme amacıyla kullanılanlar
 - Şekillendirme ürünleri
 - Temizleyiciler (losyonlar, pudralar, şampuanlar)
 - Bakım ve şartlandırma ürünleri (losyonlar, kremler, yağlar)
 - Taranıp şekillendirilmesi için ürünler (losyonlar, saç spreyleri, briyantınlar)
 - ✓ Tıraş için kullanılan ürünler (kremler, köpükler, losyonlar v.b.)
 - ✓ Yüz ve göz makyajında ve makyajın temizlenmesinde kullanılan ürünler
 - ✓ Dudaklara uygulanmak üzere hazırlanmış ürünler
 - ✓ Ağız ve diş bakım ürünleri
 - ✓ Tırnak bakımı ve süsü için kullanılan ürünler
 - ✓ Dış genital organlara haricen uygulanmak amacıyla üretilmiş kişisel hijyen ürünleri
 - ✓ Güneş banyosu için ürünler
 - ✓ Güneş olmaksızın cilde yanık ten görünümü vermek üzere kullanılan ürünler
 - ✓ Cilt rengini açmak için kullanılan ürünler
 - ✓ Cilt kırılganlıklarına karşı kullanılan ürünler
-

(T.C. Resmi Gazete, 23 Mayıs 2005, sayı: 25823)

4.2.Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyel Kontaminasyonu

Kozmetik ürünlerin tüketiciler tarafından kullanılmasından sonra gözlenen istenmeyen etkiler ve bunların doğurduğu sonuçların nedenleri araştırıldığında genellikle preparatların mikroorganizmalar ile kontamine olduğu

saptanmıştır.Kozmetik preparatların mikrobiyolojik uygunluğu tüketici sağlığı yönünden önemli olduğu gibi, preparatın stabilitesi ve kalitesi yönünden de önem taşımaktadır (Çevikbaş ve ark.,2011).

Bütün mikroorganizmaların, metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmeleri için çeşitli enerji kaynaklarına ihtiyaçları vardır. Bu enerji kaynaklarını pek çok değişik bileşimin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan ve protoplazma için gerekli olan demir gibi eser elementlerin yanı sıra karbon, hidrojen, nitrojen, fosfor ve sülfür bileşenlerinden sağlamaktadırlar (Rigler ve Schimmel,1957). Kozmetik ürünler de içerisinde yer alan (işlenmemiş) hammaddeler ile gerekli organik ve inorganik bileşikler sağlayarak mikroorganizmaların üremeleri için uygun ortamlar oluşturmaktadırlar (Underwood,1998;Kabara,1997).

Kozmetik formülasyonlarında bulunan ve mikroorganizmalar için substrat görevi gören bu bileşikler; karbonhidratlar, şeker alkolleri, yağ asitleri, proteinler,glikozidler, aminoasitler, yağ alkoller, steroidler, peptidler, vitaminler ve bitkisel hammaddelerdir (Baird, 2004; Rigler ve Schimmel,1957). Krem ve losyon gibi pek çok kozmetik preparatta bulunan bu bileşenlerin mikroorganizmalar tarafından kullanımları farklılık göstermektedir. Örneğin; şekerler osmofilik mayalar, polietilen glikol *Staphylococcus*, gliserol koliform grubu bakteriler tarafından kullanılır iken, setostearil alkol ve protein artıkları *Pseudomonas* tarafından kullanılmaktadır (Özer, 2010). Flores ve arkadaşları, 42 adet kontamine kozmetik ürün ile yapmış oldukları çalışmadan izole ettikleri *Bacillus*, *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türlerinden sadece *B. badius* , *B. circulans* , *B. megaterium* ve *B. pumilus* ' un nişastayı hidrolize ettiklerini göstermişlerdir(Flores ve ark., 1997).

Kozmetik preparatlar sahip oldukları mineraller, su içeriği, sıcaklık, pH ve büyüme faktörleri gibi formülasyon parametreleri ile de mikrobiyel kontaminasyona etki etmektedirler (Russell, 2006). Su kozmetik ürünlerin ve topikal ilaçların en temel bileşeni olduğu gibi bakteri ve mayalar içinde uygun büyüme ortamı sağlamaktadır (Ravita ve ark.2009) Fakat her mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli olan parametre ihtiyacı birbirinden farklılık göstermektedir. Holt ve Carroll yapmış oldukları çalışmada *Alternaria* 'nın % 50'nin altında su içeren krem ve losyonlarda gelişemediğini göstermişlerdir (Rigler ve Schimmel, 1957). Kozmetik

ürünlerin çeşitlerine göre mikroorganizmaların büyümelerinde etkili olan pH değerleri ve su aktivitesi Tablo 2’ de gösterilmiştir.

Tablo 2: Su Aktivitesi ve Potansiyel Mikroorganizma Büyümesi

Su Aktivitesi	pH seviyesi	Mikroorganizma	Kozmetik Ürün
0,98- 1,00	5- 9	Gram pozitif ve Gram negatifler	Şampuanlar ve emülsyonlar
0,95- 0,97	5- 9	Gram pozitif ve Gram negatifler; <i>Pseudomonas</i>	Sıvı makyaj ürünleri; göz çevresi ürünler
	5- 5’in altında	Gram pozitif ve Gram negatifler; <i>Pseudomonas</i>	Saç şekillendiriciler
0,92- 0,95	5- 5’in üstünde	Gram pozitif ve az sayıda Gram negatifler	Preslenmiş tozlar
	5- 5’in altında	Gram pozitif	
0,90- 0,92	5- 9	<i>Lactobacillus</i> ve <i>Staphylococcus</i>	Allıklar
0,80-0,90	5- 9	<i>Staphylococcus</i> , mayalar ve mantarlar	Rujlar
0,70- 0,80	5- 9	Mayalar ve mantarlar	Bazı pudralar
0,65- 0,70	5- 9	Ozmotolerant mayalar	Bazı ter önleyiciler
0,60- 0,65	5- 9	Ozmotolerant küfler	
0,60’ın altında	5- 9	Hiçbir üreme görülmemiştir	

(Brannan, 2006)

Kozmetik ürünlerin mikrobiyel kontaminasyonu ile ilgili ilk kayıtlara 1946 yılında kontamine olmuş talk pudrasının neden olduğu ölümcül *Clostridium tetani* enfeksiyonu ile rastlanmaktadır. Noble ve Savin, 1966 yılında yaptıkları çalışmada, pek çok deri lezyonuna *P. aeruginosa* ile kontamine olmuş betametason kremin neden olduğunu saptamışlardır (Bloomfield,2007). Morse ve arkadaşları ise 1967 yılında yayınladıkları çalışmalarında, *K. pneumoniae* ile kontamine el kreminin pek çok septisemiye neden olduğunu göstermişlerdir (Morse ve ark., 1967). Kallings tarafından 1966 yılında İsveç’te yayınlanan çalışmada 202 hastanın *Salmonella bareilly*, *Salmonella muenchen*,ve diğer fekal organizmaları içeren tiroid

tabletlerinden infekte olduklarını bildirmiştir. Ardından Food and Drug Administration (FDA) New York bölgesine ait kozmetik ürünler üzerine yapmış oldukları çalışmayı yayınlamışlardır. Her iki çalışmadan yayınlanan raporda kozmetik ürünlerdeki kontaminasyon oranının %25 olduğu ve büyük bir kısmının Gram negatif bakteriler tarafından meydana geldiği gösterilmiştir (Baird,2004; Curry ve ark., 2006). Wolven ve Levenstein, likit sürmelerin ciddi göz enfeksiyonlarından sorumlu patojenik bir mikroorganizma olan *P. aeruginosa* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir (Garret ve Orth, 2006). *P. aeruginosa* gibi fırsatçı mikroorganizmalar tarafından meydana gelen nazokomiyal enfeksiyonlarında aynı dönemlerde bildirilmesi ile pek çok ülkede kozmetik ürünler ile ilgili düzenlemeler yapılmıştır (Hiom, 2013).

Kozmetik ürünlerde kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar çeşitli mikrobiyolojik analizler sonucunda belirlenmekte ve tanımlanmaktadır (Sutton,2006). Mikrobiyolojik kontroller ve analizler sonucunda gerekli kriterlere uygun olmayan ürünler marketlerden toplatılmaktadır. Anelich ve Korsten, Güney Afrika'da geri çağırılmış olan kontamine kozmetik ürünler ile ilgili yayınlamış oldukları çalışmada, 58 adet farklı kremin geri çağırıldığını göstermektedirler. Ürünlerde en çok *Pseudomonas* (30%)'ı takiben *Enterobacter* (17%), *Aspergillus* (13%), ve *Staphylococcus spp.* (9%) kontaminasyonu mevcuttur (Anelich ve Korsten,1996). Wong ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Amerika Birleşik Devletleri'nde 25 adet (45%) *P. aeruginosa* ve 19 adet *Burkholderia cepacia* (33%) içeren 56 adet farklı ürünün iade edildiğini bildirmişlerdir (Wong, 2000). Lundov ve Zachariae'ni, 2005-2008 yılları arasında Avrupa ülkelerinde geri çağırılan kozmetik ürünler üzerine yapmış oldukları çalışma, 173 adet ürünün iade edildiğini göstermektedir. Ürünler 24 adet farklı kategoriden oluşmaktadır. Ürünlerin tamamında *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* ve *Candida albicans* gibi patojenik mikroorganizmalara rastlanırken, %40'ndan fazlasında patojenik *P. aeruginosa* 'ya rastlanmaktadır (Lundov ve Zachariae, 2008).

Kozmetik endüstrisinde bitmiş ürünlerde meydana gelen kontaminasyonlar ürün kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum hem üretici firma için maddi ve manevi kayıplara neden olmakta, hem de kullanıcı sağlığını olumsuz etkileyerek bazı

durumlarda hayati tehlikelere neden olabilmektedir (Çevikbaş,2011). Mikrobiyel kontaminantlar, fark edilebilir bir bozulmanın meydana gelmesinden önce biyosentez ve enerji üretiminde gerekli olan substratları sağlayabilmek için formülasyonun içeriğini kullanmaktadırlar (Baird, 2004). Ürün yapısında bulunan maddelerin mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesinin sonucunda ürünün stabilitesi bozulmakta ve emülsiyonlarda ayrışma, istenmeyen tat ve koku oluşumu, renk değişimi, viskozitesinin kaybı ve çökelti oluşumu, pH değişimi ve bunun sonucunda gaz kabarcıklarının oluşumu gibi fiziksel ve kimyasal bozulmalar meydana gelmektedir (Beveridge,1998). Kontaminasyonun meydana geldiği kozmetik ürünler özellikle çatlak, yarık ve kesik gibi bütünlüğü bozulmuş vücut yüzeylerine uygulandıklarında derinin alt tabakalarına kolaylıkla geçerek deride irritasyona veya alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedirler (Özyaral ve ark., 1993). Mikroorganizmalar ile kontamine kozmetik ve dermatolojik preparatların kullanımı sonucunda meydana gelen hastalıklar Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3:Kozmetiklerdeki Kontaminantlar Nedeni ile Ortaya Çıkan İnfeksiyonlar

Mikroorganizmalar	Neden olduğu hastalıklar
Gram-pozitif bakteriler	
<i>Staphylococcus aureus</i>	İltihap, sepsis, toksik şok sendromu
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Sepsis
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanoz
<i>Clostridium perfringens</i>	Gazlı gangren
Gram-negatif bakteriler	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sepsis, otit, konjunktivit
<i>Klebsiella spp.</i>	Konjunktivit
<i>Enterobacter</i>	Enterit
Fungi	
<i>Candida albicans</i>	Dermatit
<i>Candida parapsilosis</i>	Konjunktivit
<i>Aspergillus spp.</i>	Allerji
<i>Fusarium spp.</i>	Allerji, konjunktivit

(Sivri,2005)

Genel olarak kontamine kozmetik ürünlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan infeksiyon riskleri; mikroorganizma tipine, infeksiyona neden olan mikroorganizma dozuna, kullanıcının infeksiyona karşı direncine ve ürünün uygulandığı bölgeye bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bloomfield, 2007).

Baird ve Shooter hastanelerdeki *P. aeruginosa* ile kontamine el kremleri ve dezenfektanların, hastalarda ki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının oluşumunda rol oynadığını göstermişlerdir (Baird ve Shooter,1976). Yoğun bakım ünitesinde kontamine ağız sularının kullanımına bağlı olarak 74 hastada nozokomiyal infeksiyon oluşumu bildirilmiştir. Hopfer ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise kemoterapi gören nötropenik hastalarda, kontamine şampuan kullanımı sonucunda enfeksiyonların yanı sıra ölüm vakaları olduğunu göstermişlerdir (Geis,2006).

4.3.Mikrobiyel Kontaminasyon Kaynakları

Kozmetik preparatlardaki bazı kontaminantlar diğerlerinin aksine patojenik olmakta ve koruyucu madde varlığında bile üremelerine devam ederek ürünlerde kontaminasyona sebebiyet vermektedirler. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kalitesi üretimin gerçekleştiği çevreye, formülasyonunda kullanılan suya, hammaddeye, ekipmana, bitmiş ürünü içeren ambalaj malzemesine ve süreci gerçekleştiren personele bağlı olabileceği gibi ürünün tüketici tarafından kullanımı sırasındaki koşullara da bağlıdır (Underwood,1998).

4.3.1. Su

Su, kozmetik ve farmasötik preparatların formülasyonlarında yer alan en temel hammadde ve en önemli kontaminasyon kaynağıdır. Ürünlerin su ile kontaminasyonu, direkt olarak üretimde kullanılan su ile, dolaylı olarak da temizlik işlemlerinden; lavabo, su giderleri veya zemin üzerinde ki ıslak bölgelerden çapraz kontaminasyon ile olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir (Payne,2007). Bu nedenle üretimde kullanılan suyun mikrobiyolojik kalitesi önemli rol oynamaktadır. Tatlı suda *Pseudomonas* spp.,*Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Chromobacter* spp. and *Serratia* spp. türleri bulunmakta ve düşük sıcaklıkta kolayca üreyebilmektedirler. Endüstriyel amaçlı depolanmış durgun sudaki kontaminantların

%98’ni Gram negatif bakteriler olmak üzere *Micrococcus* spp.,*Cytophaga* spp., maya, maya benzeri mantar ve *Actinomycetes* türlerinin oluşturduğu belirtilmiştir. Ham su üretimden önce; distilasyon,ters ozmos ve de ultroviyole ışınlama ile karbon filtrasyonunu içeren deiyonizasyon işlemlerinden sonra kullanıma hazır hale gelmektedir (Underwood,1998;Payne,2007).

4.3.2. Hammadde

Kozmetik ürünlerin formülasyonunda yer alan ham maddenin iyi bir mikrobiyolojik kaliteye sahip olması hem üründe hem de çevrede meydana gelebilecek kontaminasyon seviyesini kontrol altında tutmak açısından büyük önem taşımaktadır. Doğal kaynaklı işlenmemiş hammaddeler yoğun ve çeşitli mikrobiyel üremeye neden olur iken (10^4 kob.g⁻¹), sentetik hammaddelerde genellikle üreme görülmemektedir. Hammaddeler ile yapılan bir çalışmada, 100 adet hammaddenin 34’ünden istenmeyen veya patojenik mikroorganizmalar izole edilmiş ve bu hammaddelerin doğal kaynaklı olduğu bildirilmiştir.

Jelatin, kurutulmuş tiroid, pankreas gibi hayvansal kaynaklı ürünler hayvansal mikroorganizmalar ile kontamine olabilmektedirler. Arıtılmamış kanalizasyon suyu ile yapılan fertilisasyon işlemi sonucunda *Salmonella* spp. gibi hayvansal kaynaklı mikroorganizmalar izole edilmiştir. Bitkisel kaynaklı hammaddelerin ise *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. ve *Streptococcus* spp. ve *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. gibi küfleri içerebildikleri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre *Bacillus* spp.’nin spor formunun neredeyse bütün hammaddelerde ki baskın mikroorganizma olduğu bildirilmiştir (Underwood,2004;Payne,2007).

4.3.3. Ambalaj

Kozmetik ürünlerde kullanılan hammaddeler steril olmak zorunda değildir. Fakat doğru ambalajlama, ürünlerdeki potansiyel mikrobiyel kontaminasyonun azaltılmasında ve mikroorganizmaların ürün ile temasının engellenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mulhall ve ark.,2006).Fakat ambalaj materyali kontaminasyon kaynağı da olabilmektedir. Ambalaj malzemesinin mikroflorası, yapısında yer alan

maddelere ve depolanma koşullarına bağlıdır. Üretim esnasında cam kaplar genellikle sterildirler. Ancak sürekli tozlu ortamlarda saklanmaları ve taşınabilmeleri için karton kutular içerisinde paketlenmeleri nedeni ile *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. türlerinin sporlarının ve *Bacillus* spp. gibi bakterilerin bulunabileceği gösterilmiştir. Selüloz asetat, polietilen, polipropilen, polivinilklorid, metal veya laminat gibi; pürüzsüz, su geçirmez olup, çatlak ve herhangi bir aralık bulundurmeyen ambalaj malzemelerinde ki mikrobiyel kontaminasyon riski düşüktür. Mukavva ve karton ambalajların herhangi bir işleme maruz kalmadan kullanıldıklarında, *Cladosporium* ve *Aspergillus* cinslerine ait türleri ve *Penicillium* sporları ile *Bacillus* ve *Micrococcus* cinslerine ait türleri içerebildiği belirtilmiştir (Underwood,1998; Payne,2007).

4.3.4. Personel

Mikroorganizmalar üretimde çalışan operatörler tarafından da ürünlere bulaşabilmektedirler. Normal deri florasında, özellikle el ve yüz bölgelerinde bulunan ve derinin alt tabakalarına yerleştiği için yıkama ile uzaklaştıralamayan *Staphylococcus aureus* istenmeyen patojen bir mikroorganizmadır. Kozmetik ürünlerde normal deri florasının dışında kötü kişisel hijyen koşullarının sonucu olarak, yaralardan kaynaklanan bakteriler veya anal bölgelerden kaynaklanan fekal organizmalar gibi diğer bakteriler ile de kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Bu neden ile personel hijyeni birincil mikrobiyel kontrol faktörünü oluşturmaktadır. Hijyen eğitiminin yanında üretim alanında görevli olacak personelin giyim materyali konusunda ve hem üretim esnasında hemde bitmiş ürün ile temasında nasıl davranması gerektiği konusunda eğitilmiş olması gerekmektedir (Underwood,1998; Mulhall ve ark., 2006).

4.3.5. Üretim tesisi ve donanım

Üretim tesisinde ki duvarlar, tavanlar, yerler ve pencereler gibi çevresel yüzeylerin toz ve birikintiyi en aza indirecek; temizlik ve sterilizasyona da imkan tanıyacak şekilde dizayn edilmiş olması gerekmektedir (Mulhall ve ark., 2006). Zemin mikroorganizma üremesini engellemek için pürüzsüz, gözeneksiz ve pis suyun kolay temizlenebilmesi için hafif eğimli olmalıdır. Üretim alanlarında zeminlerde

bulunan ufak çatlakların içerisinde ki su birikintisinin ve ıslak zeminlerin *P. aeruginosa*, diğer *Pseudomonas* türleri, *Enterobacter* türleri ve diğer Gram negatif bakterilerin hızlıca üremesine olanak tanıdığı gösterilmiştir. Duvarların kaplamasında vinil, dayanıklı boya ve seramik fayans kullanılmalıdır. İyi bir şekilde havalandırılmamış üretim alanlarının duvar ve tavanlarında ise genellikle *Cladosporium spp.*, *Aspergillus spp.*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium spp.* ve *Aurebasidium (Pullularia) spp.* türlerinin yer aldığı küfler ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Pencereilerin duvar yüzeyi ile boşluk kalmayacak şekilde ve açılmayan tipte tasarlanmış olması gerekmektedir. Ayrıca üretim esnasında, paketleme ve depolama aşamalarında kullanılan ekipmanların da mikrobiyel kontaminasyona neden olabileceği belirtilmiştir (Underwood,1998; Mulhall ve ark., 2006).

4.3.6.Kullanım sırasında kontaminasyon

Kozmetik ürünlerin üretim işlemlerinin uygun bir şekilde gerçekleştirilmesine rağmen, tüketici tarafından kullanımı sırasında kontaminasyona da sık rastlanmaktadır. Krem ve losyonlar, özellikle deri üzerinde bulunan *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.* ve difteroidler gibi kalıcı ve *Pseudomonas gibi* geçici flora ile sürekli temas halinde olduklarından mikrobiyel kontaminasyona daha çok maruz kalmaktadırlar. Şampuan kullanımı sırasında içerisine su ilavesi sonucunda da *Pseudomonas*, *Aerobacter* ve bazı mayaların neden olduğu kontaminasyonlar meydana gelmektedir (Çevikbaş,2011; Baird,1998)

4.4. Mikrobiyel Kontaminasyona Duyarlı Kozmetik Ürünler

4.4.1.Deri ürünleri

Bütünlüğü bozulmamış derinin infeksiyonlara karşı adeta bir bariyer görevi görmesine karşın, hasarlı deri için infeksiyonlar ciddi bir risk oluşturmaktadır. Özellikle pek çok kişi tarafından kullanılan çok dozlu kaplar bireylerde kontaminasyona ve dolayısıyla infeksiyon vakalarına sebebiyet vermektedir. *Pseudomonas* ile kontamine olmuş klorheksidin setrimid dezenfektanının kullanımı sonucunda ameliyat yarası infekte olmuş 9 hastadan *Pseudomonas multivorans* izole edilmiştir (Bloomfield,2007; Spooner,1996). Krem ve losyonlar formülasyonlarında

ki temel bileşenlerin yanı sıra sahip oldukları hayvansal proteinler ve vitaminler gibi doğal içerikleri nedeniyle mikrobiyel kontaminasyona neden olmaktadır. Ayrıca bu maddeler, mikroorganizmaların büyümeleri için gerekli besin kaynaklarını sağlarken, kozmetik ürünlerde bulunan koruyucu maddeleri inaktif hale getirerek kontaminasyona sebep olmaktadır (Sivri, 2005). El losyonları ile yapılan çalışmalardan *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, *K.pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis* izole edilmiştir (Morse, 1968). Güney Afrika, İran, Jordan ve Nijerya’da kozmetik kremler ile yapılan çalışmalardan *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter gergoviae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus flavus*, *Penicilium* ve *Microsporium* türleri bulunmuştur (Anelich ve Korsten, 1996; Behravan ve ark., 2000; Shaqra ve ark., 2012; Okeke ve Lamikanra, 2001; Hugbo ve ark., 2005).

Pudralar, bileşimindeki yüksek absorbant özelliğine sahip talk nedeni ile mikroorganizmalar ile çevresel kontaminantları tutabilmekte ve enfeksiyona neden olabilmektedir(Çevikbaş ve ark., 2011). Talk pudralarının, vücut losyonlarına göre küfler ile daha fazla kontamine olabildikleri bildirilmiştir (Abdelaziz ve ark., 1989).

Şampuanlar, yapılarında yüksek oranda su bulundurmaları nedeni ile özellikle Gram negatif bakteriler başta olmak üzere pek çok bakterinin gelişmesi için uygun ortam oluşturmaktadırlar. Formülasyonlarında ki su oranının fazla olması çoğunlukla *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* gelişimine neden olmaktadır (Sivri, 2005).

Suudi Arabistan’da yapılan bir çalışmada, *Serratia marcescens* ile kontamine bebek şampuanının yoğun bakım ünitesinde kullanımı sonucu 13 bebeğin ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir (Madani, 2011). Tıraş losyonları ve şampuanlar ile yapılan çalışmalardan, traş losyonlarının daha çok kontaminasyona uğradıkları ve bunlarında çoğunlukla *Staphylococcus* türleri tarafından oluştuğu bildirilmiştir (Campana ve ark., 2006; Abdelaziz ve ark., 1989).

4.4.2.Göz ürünleri

Göz ve göz çevresi, enfeksiyonlara karşı hassas bir bölge olduğu için kontamine ürünlerin neden olduğu göz enfeksiyonlarına sık rastlanmaktadır. Bu neden ile oftalmik preparatların steril olmaları gerekmektedir. Literatürde 1960’lardan itibaren

kontamine göz praperatlarının kullanımından kaynaklı göz infeksiyonları bildirilmiş ve bunların korneal ülser ve körlüğe kadar gidebilen *P.aeruginosa* kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Spooner,1996; Bloomfield,2007).

Göz çevresi ürünleri, kullanım sırasında göz infeksiyelerine neden olan veya onları kalıcı hale getiren, *Staphylococcus epidermidis* veya *Fusarium* türleri ile de kontamine olmaktadır (Wilson, 1977). Kontaminasyonun meydana geldiği rimel aplikatörünün tüketiciler tarafından kullanımı sırasında kaza ile epitelin çizilmesi sonucunda ciddi göz infeksiyonlarının meydana geldiği raporlanmıştır (Abdelaziz ve Alkofahi,1989). Yapılan çalışmalarda oftalmik preparatlardan maskaraların genellikle göz farlarına göre daha çok kontamine olduğunu ortaya koymaktadır. Bu örneklerden *P.aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* kontaminantları izole edilmiştir (Wison, 1975; Abdelaziz ve ark.,1989).

Amerika birleşik devletlerinde, kontak lens kullanıcısı olmayanlarda ki bakteriyel göz infeksiyonlarının temel kaynağını *Staphylococcus sp.* türleri oluştururken, kontak lens kullanıcılarında meydana gelen infeksiyonları patojenik *P.aeruginosa* türleri tarafından meydana geldiği bildirilmiştir. (Galentine ve ark., 1984; Pack, 2008)

Templeton ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, *Serratia marcescens* ile kontamine olmuş göz damlalarının kornea iltihabına neden olduğunu göstermişlerdir. Mikroorganizma direkt olarak ürün içeriğinde değil, kapak kısmında bulunmakta ve çoğalması için gerekli nemi sağlamaktadır. Damlalık vasıtası ile hastanın göz içerisine ürünün damlatılması ile de *S. marcescens* kontaminasyonu meydana gelmektedir (Templeton ve ark., 1982).

4.4.3.Oral ürünler

Literatürde çeşitli nedenler ile kontamine olmuş oral ürünlerin kullanımı sonucu meydana gelen pek çok *Salmonella sp.* infeksiyonları yer almaktadır (Spooner,1996; Bloomfield, 2007). *Salmonella sp.*ile kontamine olmuş tabletler, tiroid ve pankreatin ekstratları ve bunların kullanımları sonucu oluşan infeksiyonlar bildirilmiştir (Baird, 2004).

Ağız suları ve diş macunları, formülasyonlarında aktif madde olarak yer alan antimikrobiyel ajanlara rağmen mikrobiyel kontaminasyona maruz kalabilmektedirler (Abdelaziz ve ark., 1989). Diş macunları ve ağız suları ile yapılan çalışmada, diş macunlarının ağız sularına göre hem bakteri hemde maya kontaminasyonuna daha sık maruz kaldıkları bildirilmiştir. Bu kontamine ürünlerden izole edilen mikroorganizmalar ise çoğunlukla *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* ve *E. coli* türleridir (Ashour ve ark., 1987). Stephenson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *P.aeruginosa* ile kontamine timol içerikli ağız suyunun kullanımı sonucu septisemi vakalarına neden olduğu bildirilmiştir (Stephenson, 1984).

Diş macunlarının da düzenli kullanım sırasında mikroorganizmalar ile kontamine olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Saklanma koşullarına bağlı olarak, diş macunları *Streptococcus mutans* gibi patojenik mikroorganizmalar için rezervuar görevi görebilmektedir. Taji ve Rogers, kullanılmış olan diş fırçaları ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında fırçaların tamamından *Staphylococcus sp.* ve *Streptococcus sp.* türlerini izole ederken, %30-50-60 ve 70'lik kısmından ise *Candida sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* ve koliform grubu bakterileri izole etmişlerdir (Taji ve Rogers, 1998).

Mikrobiyel kontaminasyonun meydana geldiği bir diğer oral ürün grubu ise dudak boyalarıdır. Dudak boyalarının kullanılmasının ardından solunum yolu ile meydana gelen nemlenme, küf üremesine neden olmaktadır (Sivri, 2005).

4.4.4. Solunum ile ilgili ürünler

Gram negatif bakteriler ile kontaminasyonun meydana geldiği su fazlı non-steril ürünlerin kullanımının hastanelerdeki pek çok solunum yolu enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Spooner, 1996). *Klebsiella spp.* ve *Serratia marcescens* ile kontamine olan aerosol solüsyonlarının, akciğer enfeksiyonlarına neden olduğu gösterilmiştir (Spooner, 1996; Bloomfield, 2007).

4.5.Kozmetik Ürünlerde Saptanan Mikrobiyel Flora

Kozmetik ürünlerde var olan ve büyüyen mikroorganizmalar, çeşitli mikrobiyolojik analizler ile sayıca ve tür olarak belirlenebilmektedir. Ürünlerde var olan veya bulaşan mikroorganizmalar bazı durumlarda, kontaminasyonun meydana geldiği maskaraların göz çevresine uygulanması sonucu oluşan infeksiyonlarda olduğu gibi hayati risk taşır iken, bazı durumlarda ise sadece ürünün bozulmasına neden olmaktadır. Her iki durumda göz önüne alındığında kozmetik ürünlerde kontaminasyon meydana getiren mikroorganizmaların tespit edilmesi üretici firmaların sorumluluğundadır (Sutton,2006).

Kontaminantlar arasında ki önemli patojenlerin büyük bir çoğunluğu insan veya hayvan vücudunun dışında varlıklarını sürdürememektedirler. Bunun aksine fırsatçı patojenler ise farmasötik ve kozmetik preparatlardaki başlıca kontaminantlar olarak oldukça sık rapor edilmektedirler. *Pseudomonas sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium* ve *Staphylococcus* türlerinin de aralarında bulunduğu bu mikroorganizmalar sağlıklı bireyler için bir tehlike meydana getirmez iken, direnç mekanizmasının bozulması durumunda ortaya çıkan infeksiyonlarda fırsatçı patojen olarak yer almaktadırlar (Bloomfield,2007). Food and Drug Administration (FDA)'nın, 2000 yılında yürütmüş oldukları çalışmadan elde ettikleri raporlarda, kozmetiklerde en sık rastlanan kontaminantın *Pseudomonas sp.* olduğunu, kontamine ürünlerin kullanıma bağlı olarak ortaya çıkan infeksiyonlardan en sık izole edilen patojen mikroorganizmanın ise *Salmonella sp.* olduğunu bildirmiştir (Wong,2000).

Yapılan mikrobiyolojik çalışmalar sonucunda kozmetik ürünlerde belirlenen, patojenik ve patojenik olmayan mikroorganizmaların listesi Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 4: Kontamine Kozmetik Ürünlerde Görülebilen Mikroorganizmalar

Gram negatif nonfermantatif bakteriler	Gram negatif fermantatif bakteriler	Gram pozitif bakteriler	Mayalar	Küfler
<i>Acinetobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Candida</i>	<i>Absidia</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>Torula</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>P. putida</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Citromyces</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>P. paucimobilis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Dematium</i>	<i>P. paucimobilis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>S. maltophilia</i>
	<i>Serratia liquefaciens</i>			<i>Hormodendrum</i>
	<i>S. marcescens</i>			<i>Mucor</i>
	<i>S. odorifera</i>			<i>Geotrichum</i>
	<i>S. rubidaea</i>			<i>Paecilomyces</i>
				<i>Penicillium</i>
				<i>Phoma</i>
				<i>Auerobasidium</i>
				<i>Rhizopus</i>
				<i>Thamnidium</i>
				<i>Trichothecium</i>
				<i>Verticillium</i>

(Branan,2006)

4.6. Kozmetik Ürünlerde Mikroorganizma Limitleri

Kozmetikler ve kişisel bakım ürünlerinin tamamen steril olması beklenmemektedir. Fakat özellikle göz çevresine uygulanan ürünlerin yüksek virülansa sahip patojenik mikroorganizmaları içermemeleri ve toplam mikroorganizma sayısının düşük olması gerekmektedir. Belirtilen bu değerler kullanılan ürünün tipine, uygulandığı bölgeye ve kullanıcıya göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle kozmetik ürünlerde bulunmaması gereken

mikroorganizmalar ile patojenik olmayan mikroorganizma limitleri yönetmelikler ile sınırlandırılmıştır. Bu standardizasyon dünyada Kozmetik ve Tuvalet Koku Birliği (Cosmetics, Toiletries and Fragrance Association, CTFA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) kuruluşlarıyla sağlanmaktadır. Kozmetik endüstrisi mikrobiyel limitler açısından genel olarak CTFA'nın önerilerini takip etmektedir. Genel olarak, göz çevresi ve bebek ürünlerinde 5×10^2 kob/mL/gr, diğer bütün ürünlerde 1×10^3 kob/mL/gr mikroorganizma bulunmasına izin verilmektedir. Amerikan farmakopesine (US Pharmacopeia, USP) göre ise; *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S.typhimurium* gibi bakteriler ile *C. albicans* ve *A. niger* testlerde biyolojik indikatör amacıyla kullanılmakta olup, kozmetik ve farmasötik preparatlarda kesinlikle yer almamalıdır. Ülkemizde ise 'T.C. Sağlık Bakanlığı Kozmetik Yönetmeliği'nin kozmetik ürünler için mikrobiyolojik limit önerileri dikkate alınmaktadır. (Tablo 5) (Steinberg, 2006; Tüysüz,2010; Çevikbaş,2011)

Tablo 5: Kozmetik Ürünlerde İzin Verilen Mikroorganizma Sayısı

	Kategori	İzin verilen mikroorganizma miktarı (gram veya mililitrede)
Sağlık Bakanlığı Kozmetik Yönetmeliği	Bebek ürünleri	1×10^2 kob/mL/gr
	Göz çevresine uygulanan ürünler	1×10^2 kob/mL/gr
	Ağız çevresine uygulanan ürünler	5×10^2 kob/mL/gr
	Diğer ürünler	1×10^3 kob/mL/gr
		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> türleri, <i>Clostridium</i> türleri ve <i>Candida albicans</i> gibi patojen mikroorganizmalar bulunmamalıdır.

Tablo 5: Kozmetik Ürünlerde İzin Verilen Mikroorganizma Sayısı (Devamı)

	Kategori	İzin verilen mikroorganizma miktarı (gram veya mililitrede)
Avrupa Komisyonu Kuralları	Bebek ürünleri (veya 3 yaş altı çocuk ürünleri)	2×10^2 kob/mL/gr (Kategori 1)
	Göz çevresine uygulanan ürünler	2×10^2 kob/mL/gr (Kategori 1)
	Müköz membranlara uygulanan ürünler	2×10^2 kob/mL/gr (Kategori 1)
	Diğer ürünler	1×10^4 kob/mL/gr (Kategori 2)
		Toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı Kategori 1'deki ürünlerin 0,5; Kategori 2'deki ürünlerin 0,1 gramında <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>C. albicans</i> bulunmamalıdır.
CTFA	Bebek ürünleri	5×10^2 kob/mL/gr
	Göz çevresine uygulanan ürünler	5×10^2 kob/mL/gr
	Diğer ürünler	1×10^3 kob/mL/gr
		Patojen veya fırsatçı patojen mikroorganizmalar bulunmamalıdır.
FDA	Göz çevresine uygulanan ürünler	5×10^2 kob/mL/gr
	Diğer ürünler	1×10^3 kob/mL/gr
		<i>P.aeruginosa</i> ve diğer <i>Pseudomonas</i> türleri, <i>S.aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> gibi patojen veya fırsatçı patojen mikroorganizmalar bulunmamalıdır.

(Tüysüz,2010)

4.7. Kozmetik Ürünlerde Mikrobiyel Kontaminasyonun Önlenmesi ve

Koruyucu Kullanımı

Farklı markalara ait çeşitli kozmetik preparatlarda meydana gelen kontaminasyon örnekleri incelendiğinde, üreticiler tarafından iyi imalat uygulamalarının doğru bir şekilde uygulanmaması, üretim sonrası kontaminasyon, uygun olmayan koruyucu sistem kullanımı veya piyasada ki satıcılar tarafından depolama sürelerinin uzatılması gibi pek çok faktörün kontaminasyonda etkin rol oynadığını göstermektedir (Abdelaziz,1989). Kozmetikler ile ilgili hem ulusal hem de uluslararası pek çok düzenlemenin olmasına rağmen, mikrobiyel kontaminasyon tüm dünyada özellikle de gelişmekte olan ülkelerde hala ürünlerin iade edilmesinde gösterilen en önemli nedenlerden birisidir. Bu neden ile kozmetik ürünlerin üretimi, depolanması ve tüketici tarafından kullanımı sırasında, mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonunu önlemek amacı ile ürünlerde koruyucu madde kullanımının geliştirilmesi önemli bir konudur (Okeke ve Lamikanra, 2001).

Koruyucu maddeler; gıdalara, farmasötik ve kozmetik formülasyonlara, raf ömrü süresince; ürünün kimyasal yapısındaki bozunmaları geciktirmek, küf, maya ve bakteri gibi istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek veya onları elemine etmek amacı ile ilave edilen kimyasal maddelerdir (Sasseville, 2004).

Zorlayıcı nedenler, kozmetik endüstrisini ürünlerin mikrobiyolojik bütünlüğünün sürdürülebilir olmasına yönlendirmiştir. En genel anlamı ile koruyucular bu amacı yerine getirebilecek asıl elementler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Geis, 2006).

Kozmetik ürünlerin korunması genellikle zahmetli olmaktadır. Son üründe güvenilir ve sağlıklı koşulları sağlayabilmek için, hammadde, koruyucu, ambalaj malzemeleri ve ekipmanlar gibi üretim sürecinde yer alan materyallere dikkat edilmeli ve sık sık mikrobiyel içerik olarak kontrol edilmelidir. Aksi takdirde, *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* gibi patojenleri içeren ürünlerin kullanılması durumunda tüketicide çok ciddi hasarlar meydana gelebilmektedir. Yüksek oranda kontaminasyonun meydana geldiği talk pudraları ve vücut losyonlarının kullanımına bağlı olarak kızarıklık, sivilce, piyodermatit, fronkül, stafilokokal haşlanmış deri sendromu gibi cilt infeksiyonlarında artış meydana geldiği bildirilmiştir. Üründe

meydana gelen ciddi boyutlardaki kontaminasyon sebeplerinden birinin de yanlış ve uygun olmayan koruyucu sistem kullanımı olduğu bildirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda hem kullanılacak olan koruyucu sistemleri ürün yapısını dikkate alarak uygun bir şekilde seçmeli hem de koruyucunun etkili olduğu optimum ortam koşullarının iyi bilinmesi gerekmektedir (Ashour ve ark.,1989; Campana, 2006). İdeal bir koruyucunun sahip olması gereken özellikler;

- Ürün içerisinde geniş bir etki spektrumuna sahip olması gerekmektedir. Tercihen hem ürün maliyetini düşürmek hem de formülasyonun potansiyel toksisitesini veya irritasyon etkisini azaltmak için tek bir koruyucu sistem kullanılmalıdır.
- İdeal bir koruyucu, kozmetik ve farmasötik ürünlerdeki değişik pH aralıklarında kimyasal olarak kararlılığını ve etkinliğini korumalıdır. Böylece ürünün raf ömrü boyunca beklenen koruyucu etkisinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır.
- Ürünün formülasyonun da yer alan diğer bileşenler ve ambalaj malzemesi ile geçimli olmalıdır. Böylece herhangi bir etkileşim sonucunda koruyucunun etkisinin azalarak ürünün kontamine olması önlenmiş olmaktadır.
- Koruyucu maddeler ürünün; renk, berraklık, koku, tat, viskozite ve yapısı gibi fiziksel özelliklerini etkilememelidirler. İdeal olanı, koruyucu maddenin hem kendisinin formülasyonda herhangi bir renk, koku ve tat bırakmaması hem de ürünlerdeki diğer bileşenler ile etkileşime girerek formülasyonun performansını, yapısını veya görünüşünü değiştirmemesidir.
- Ürünün su fazında koruyucunun etkin konsantrasyonunu elde edebilmek için uygun su/yağ fazı dağılım katsayısına sahip olması gerekmektedir. Biyolojik reaksiyonlar çoğunlukla ürünlerin su fazında veya su/yağ fazının ara yüzünde meydana gelmektedir. Bu nedenle ürünün uygun bir şekilde korunması için su fazında başarılı bir şekilde aktivitesini yerine getirebilen koruyucuların tercih edilmesi gerekmektedir.
- İdeal bir koruyucunun, kontaminasyon durumunda koruyucu sisteme mikrobiyel adaptasyonu önlemek için mikroorganizmaları hızlı bir şekilde inaktif hale getirmesi gerekmektedir.

- Ürünün amacına uygun şekilde kullanıldığı durumlarda, tüketici üzerine herhangi bir toksik, iritan veya hassasiyet oluşturmamalıdır. Koruyucu sistemin bu anlamda güvenilir olması gerekmektedir.
- Seçilen koruyucuların resmi düzenlemelerde yer alan miktarlarına uygun olması gerekmektedir.
- Koruyucu sistemin düşük maliyetli olması gerekmektedir. Ticari açıdan bakıldığında, bitmiş ürüne etkili konsantrasyonun düşük maliyetli olacak şekilde ilave edilmesi önemlidir (Orth, 2007).

Kozmetik ürünlerde yer alan koruyucular genel olarak mikroorganizmaların hücre duvarlarına, sitoplazma zarına ve sitoplazmasına etki etmektedirler. Sitoplazmik membranda; membran potansiyeline, membran enzimlerine (elektron transport zinciri, adenozintrifosfat ve tiyol gruplarını içeren enzimler) ve membranın genel geçirgenliğini bozarak etkilerini göstermektedirler. Sitoplazma üzerinde ise; genel koagülasyon, ribozomlar, nükleik asitler, tiyol grupları ve amino grupları üzerine etki etmektedirler (Denyer ve Russell, 2004).

İdeal bir koruyucunun hem Gram pozitif bakterilere karşı hem de Gram negatif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olması gerekmektedir. Ancak birkaç tane koruyucu bu özelliklere sahiptir (Denyer, 2007). Hatta pek çok koruyucu çok çeşitli Gram negatif bakteriler tarafından metabolize edilmektedirler (Beveridge,1998). Bunun yanında hem bakterilere karşı hem de mayalara karşı geniş etki spektrumuna sahip olan koruyucularada az rastlanmaktadır. Tek bir koruyucu ile hedeflenen korunmanın gerçekleşemediği böyle durumlarda iki veya daha fazla koruyucu kombinasyonu ile etkin bir korunma sağlanabilmektedir. Eğer kombinasyon sonucunda elde edilen etki, koruyucuların tek başlarına kullanıldıkları hallerinden daha fazla ise ‘sinerjistik etki’ elde edilmiş olmaktadır. Sinerjistik etkinin elde edilmesi ile hem daha geniş bir etki spektrumu sağlanmakta hem de koruyucular tek başlarına kullanıldıkları hallerine göre daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmaktadırlar. Sinerjistik etki ile elde edilen bu başarılı sonuçlara dayanarak günümüzde pek çok koruyucu kombinasyonları ticari olarak kullanılmaktadırlar (Doorne, 2007; English, 2006).

4.8. Koruyucu Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Genel olarak kozmetik formülasyonlarındaki koruyucu aktivitesi sadece kullanılan koruyucuya bağlı olarak görülse de pratikte, ürünlerin koruyucu sistemleri hem spesifik koruyucuları hem de ürünün fizikokimyasal yapısını içermektedir. Kullanılan koruyucu kimyasallar, hiçbir zaman ürünün yapısından bağımsız olarak aktivitesini göstermemektedirler (Orth, 2007). Koruyucu aktivitesi birincil ve ikincil olmak üzere pek çok faktörden etkilenmektedir.

4.8.1.Koruyucunun konsantrasyonu

Geçen yüzyılın başından beri yapılan çalışmalar mikrobiyel ölüm oranı ile antimikrobiyel ajanın konsantrasyonu arasında bir eşitlik olduğunu açıkça göstermektedir. Kullanılan koruyucunun konsantrasyonu ne kadar artar ise o kadar fazla mikroorganizma grubuna karşı daha etkili hale gelmektedir (Denyer, 2007; Rigler ve Schimmel, 1957). Formülasyon içerisindeki koruyucu konsantrasyonu, koruyucunun mikroorganizmalara karşı inhibe edici veya öldürücü etkisinin olup olmasına göre belirlenebilmektedir. Üründeki mikroorganizma büyümesini önlemek veya inhibe etmek için gerekli olan minimum koruyucu konsantrasyonu, ‘Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ’; mikroorganizmalara karşı sidal etki için gerekli olan minimum koruyucu konsantrasyonu ise ‘Minimum Lethal Konsantrasyon (MLK) ’olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, MİK ve MLK değerlerinden elde edilen sonuçlar, koruyucuların ürün içerisindeki kullanım konsantrasyonunun ve antimikrobiyel spektrumunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (English,2006).

4.8.2. pH

Kozmetik formülasyonlarının pH’sı, kullanılan koruyucunun mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyel etkisi ve kimyasal stabilitesi üzerine ciddi şekilde etkili olmaktadır (Rigler ve Schimmel, 1957) Düşük asidik özellik gösteren koruyucular, düşük iyonizasyonun meydana geldiği yerlerde etkin pH değerine ulaşmakta ve iyonize olmayan moleküller içerisinde daha iyi bir şekilde aktivitelerini göstermektedirler. Bu yüzden, benzoik ve sorbik asit gibi koruyucular düşük pH değerlerinde daha iyi antimikrobiyel etki gösterirken, parabenler ve

iyonize olmayan ester grupları nötral pH seviyesinde en iyi etkiyi göstermektedirler (Baird,2004).

4.8.3.Sıcaklık

Koruyucuların değişen sıcaklık değerlerine bağlı olarak aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler farklılık gösterebilmektedir. Bu durum özellikle etkinlik testlerinde ve saklanma koşullarında göz önüne alınmalıdır. Genel olarak diğer bütün kimyasal süreçlerde olduğu gibi sıcaklığın artmasına bağlı olarak koruyucu aktiviteside artmaktadır (Denyer,2007 ve Hiom,2013)

4.8.4.Işık

Kozmetik formülasyonlarında yer alan bazı organik ve inorganik koruyucuların güneş ışığına maruz kalmaları nedeni ile aktivitesinde azalma meydana gelebilmektedir. Bu neden ile kullanılacak ambalaj materyalleri ürünün ultroviyole ışınlarına maruziyetini engelleyecek nitelikte olmalıdır (Çevikbaş ve ark,2011).

4.8.5.Çözünürlük özelliği

Emülsiyon niteliğindeki formülasyonlar su ve yağ fazı olmak üzere iki fazdan oluşmaktadırlar. Mikroorganizma üremesi ise çoğunlukla ürünlerin su fazında meydana gelmektedir. Bu neden ile koruyucuların su ve yağ fazı arasındaki eşit dağılım oranı antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (English,2006; Denyer,2007). Koruyucu sistemlerin su molekülleri arasındaki çözünürlükleri ne kadar artarsa aktivitesi de ona bağlı olarak artış göstermektedir (Rigler ve Schimmel,1957)

4.8.6.Yüzey aktif maddeler

Yüzey aktif maddenin varlığı, koruyucu maddenin antimikrobiyel aktivitesini pek çok açıdan etkilemektedir. Düşük konsantrasyonda ki yüzey aktif maddenin varlığında koruyucunun antimikrobiyel etkisi artarken, yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun artması durumunda tam tersi bir etki meydana gelmekte ve koruyucu madde mikrobiyel yüzeye adsorbe olmaktadır (Rigler ve Schimmel,1957).

4.8.7.Mikroorganizmalar

Koruyucu ürünler genellikle pek çok açıdan değerlendirildiklerinde kontamine mikroorganizmaları inhibe edebilmek için mikrobisidal özellikte olmaları gerekmektedir. Bu açıdan bakıldığında pek çok koruyucunun oda ısısında sporisidal aktivitesi oldukça sınırlandırılmış olmasına karşın mikroorganizmaların vejetatif formlarına karşı oldukça iyi bir etki göstermeleri beklenmektedir. Bütün bu değerler göz önüne alındığında mikroorganizmaların cinsi ve sayısı ortam koşullarına bağlı olarak koruyucu aktivitesini değiştirebilmektedir (Denyer, 2007).

4.8.8.Ambalaj malzemeleri

Ambalaj materyalleri koruyucu maddelerin aktiviteleri üzerine çeşitli nedenler ile etki edebilmektedir. Ambalaj materyalinin kimyasal yapısının kozmetik formülasyonun da yer alan koruyucunun aktivitesini etileyip etkilemediği, ambalaj tipine bağlı olarak tüketicinin kullanımı sırasında koruyucu sistemi baskılayarak mikrobiyel kontaminasyona sebebiyet verip vermediği gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (English, 2006). Örneğin; Kuaternar amonyum bileşiklerinin cam ve plastik yüzeyler tarafından adsorbe olması nedeni ile formülasyondaki miktarları önemli derecede azalmaktadır (Baird, 2004).

4.9. Kozmetik Ürünlerde Kullanılan Koruyucular

Kozmetik formülasyonların da kullanılan koruyucular ve onlara ait limitler, her ülkenin kendisine ait olan mevzuatlar gereğince düzenlenmektedir. Ülkemizde kullanılmasına izin verilen koruyucular ve maksimum kullanım konsantrasyonları, Sağlık Bakanlığı'nın 23 Mayıs 2005 tarihli Resmi Gazete'de yayınlanan Türk Kozmetik Yönetmeliği'nin 'Ek VI – Kısım I' numaralı ekinde yer almaktadır (T.C. Resmi Gazete, 23 Mayıs 2005, sayı: 25823). Kozmetik ürünlerde çoğunlukla kullanılan koruyucuların listesi Tablo 6'da gösterilmektedir.

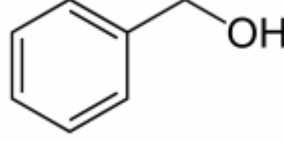
Tablo 6: Kozmetik Ürünlerde Sık Kullanılan Koruyucular

Koruyucu İsmi	Etki Spektrumu	Geçimlilik	İnaktive Edenler	Uygun pH
Benzoik asit esterleri,parabenler: Metil paraben Etil paraben Propil paraben Butil paraben	Mantar, Gram pozitif bakteriler	Katyonik	Anyonik, noniyonik, proteinler	<7
İmidazolinidil üre, Diazolinidil üre	Geniş spektrumlu;ancak mantarlara karşı zayıf spektrum lu	Anyonik, noniyonik, katyonik, proteinler	Seyreltme ile etkisiz	4-9
İzotiazolinonlar (Klorometil izotiyazolinon / metil izotiyazolinon)	Geniş spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik	Ağartıcı maddeler ve yüksek pH	4-8
Formaldehit, Dimetiloldimetil hidantoin (DMDM Hidantoin)	Geniş spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik	T ⁰ > 60°C	4-9
Benzalkonyum klorür	Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili; küflere karşı zayıf spektrumlu	Noniyonik, katyonik	Anyonik, proteinler, sabunlar	4-9
2-bromo-2-nitropropanol, 3-diol	Geniş spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik	Sıcaklık, yüksek pH, sistein, alüminyum	<6

(Siquet ve Devleeschouwer, 2001)

4.10 Çalışmada Kullanılan Koruyucular

4.10.1.Benzil alkol



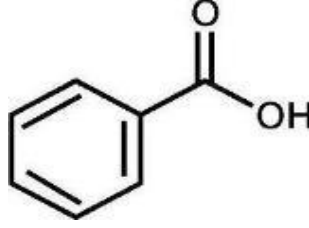
Şekil 1: Benzil alkolün kimyasal yapısı

(Yalçın,2010)

Benzil alkol, $C_6H_5CH_2OH$ formülü ile gösterilen aromatik bir alkoldür. Benzenemetanol, fenilkarbinol ve fenilmetanol isimleri ile de bilinmektedir (Denyer,2007;Nair,2000).

Benzil alkol oldukça sık kullanılan bir koruyucudur. Bunun yanı sıra kozmetik formülasyonlarda viskozite arttırıcı, çözücü ve koku bileşeni olarak da kullanılmaktadır (Godfrey, 2012; Nair,2000). Benzil alkolün sudaki çözünürlüğü azdır (yaklaşık olarak % 2) ve buharlaşarak madde kaybını önlemek için genellikle ürünlere 40°C'nin altındaki sıcaklıklarda ilave edilmektedir. Geniş bir pH aralığında etkilidir (pH3-8). Benzaldehit ile okside olmakta ve düşük pH aralığında dehidrasyona uğramaktadır. Ürünlerdeki kullanım konsantrasyonu genel olarak %1-3 arasındadır. Benzil alkolün tek başına kullanımı az olup genellikle diğer koruyucular ile kombine halde kullanılmaktadır (Godfrey2012; Denyer,2007). Gram pozitif bakterilere karşı etkili iken, gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı etkisi zayıftır (English,2006).

4.10.2.Benzoik asit



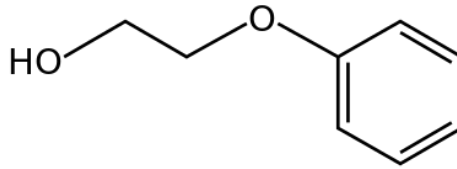
Şekil 2: Benzoik asitin kimyasal yapısı

(Yalçın,2010)

Pek çok kozmetik ürünün formülasyonunda diğer koruyucular ile kombine halde veya tek başına yer alan, C_6H_5COOH formülü ile gösterilen, organik bir asittir (Gorman ve Scott, 2004). Benzen karboksilik asit, fenil karboksilik asit ve sodyum benzoat tuzu olarak da bilinmektedir (Deneyer, 2007).

Benzoik asidin sudaki çözünürlüğü azdır ve noniyonik sürfektanlar, kuaterner bileşikler ve jelatin ile geçimsizdir. Düşük pH aralığında aktiftir. Genellikle farmasötik ürünlerin korunmasında kullanılacağı zaman ürün pH'sının maximum 5 ve mümkünse 4,0'den düşük olması önerilmektedir. Oral ürünler için kullanım konsantrasyonu % 0,05-0,1 iken, genel olarak kullanım konsantrasyonu % 0,1 - 0,5'tir. Mantarlara karşı geniş bir etki spektrumu olmasına karşın bakterilere karşı etkisi zayıftır (Gorman ve Scott,2004; English 2006).

4.10.3.Fenoksietanol



Şekil 3: Fenoksietanolün kimyasal yapısı

(Yalçın,2010)

Fenoksietanol, $C_8H_{10}O_2$ formülü ile gösterilen oldukça fazla kullanılan bir koruyucudur. Etilen glikol monnofenil eter, 2- fenoksietanol ve β - fenoksietil alkol olarak da bilinmektedir. Renksiz, hafif viskoz ve yağlı bir yapısı; gül kokusuna benzer hoş bir kokusu vardır. Su içerisinde az miktarda çözünürken alkol ve eter içerisinde kolayca çözünmektedir. Geniş bir pH aralığına sahiptir (pH 3-9) ve genellikle kullanım konsantrasyonu % 0,4-1,0'dir (Godfrey, 2012).

Geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Ancak diğer bakterilere göre *P. aeruginosa*'ya karşı daha etkilidir ve antimikrobiyel aktiviteyi genişletmek için genellikle hidroksibenzoat gibi diğer koruyucular ile kombine halde kullanılmaktadırlar (Gorman ve Scott, 2004).

Kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucuların geniş bir antimikrobiyel spektruma sahip olmaları istenilmesine rağmen çok az koruyucu bu özelliğe sahiptir. Tablo7'de formülasyonlarda ki kullanım konsantrasyonlarında bazı koruyuculara ait olan antimikrobiyel spektrum gösterilmektedir.

Tablo 7: Genel Kullanım Konsantrasyonlarında ki Antimikrobiyel Aktivite Aralığı

Bakteriler				
Koruyucu Madde	Gram Pozitif	Gram Negatif	Maya	Küf
Benzelkonyum klorid	++	(++)*	(++)	+
Benzetinyum klorid	++	(++)*	(++)	+
Benzoik asit ve tuzları	++	+	+	+
Benzil Alkol	++	+	+	+
Bronopol	(++)	++	+	+
Bütil hidroksianisol	(++)	+	(++)	(++)
Setrimid	++	(++)*	(++)	+
Klorbutanol	++	++	(++)	+
Klorhekzidin	++	(++)*	(++)	+
Klorokrezol	++	(++)	+	+
Kresol	(++)	+	+	+
Diazolidinil üre	++	(++)	+	+
EDTA	+	+	+	+

Tablo 7: Genel Kullanım Konsantrasyonlarında ki Antimikrobiyel Aktivite Aralığı (Devamı)

Bakteriler				
Koruyucu Madde	Gram Pozitif	Gram Negatif	Maya	Küf
Etanol	++	++	(++)	(++)
İmidiazolidinil üre	(++)	(++)	+	+
Parabenler(metil,etil,propil,butil)	(++)	+*	(++)	(++)
Fenol	(++)	+	+	+
Fenoksietanol	(++)	++	+	+
Fenilmerkürük tuzları	++	+++*	(++)	+
Propiyonik asit tuzları	+	+		++
Propilen glikol	++	++	(++)	+
Sorbik asit tuzları	+	+	++	(++)
Tiyomersal	++	(++)	(++)	+

++,Aktif; (++) ,orta derecede aktif;,+ zayıf aktif; *, *Pseudomonas spp.*’ye karşı zayıf aktif

(Denyer,2007)

Kozmetik ürünlere koruyucuların yanı sıra, koruyucu antimikrobiyel aktivitesini arttırabilen, sinerjistik maddeler de ilave edilebilmektedir. Bu koruyucu alternatiflerin kullanımı ile üretici firmalar ürünün antimikrobiyel aktivitesini, koruyucu konsantrasyonunu arttırmadan yükseltebilmektedirler. Propilen glikolün kozmetik formülasyonlar da kullanımı sonucu koruyucuların sudaki çözünürlüğünü arttırdığı bildirilmiştir.

Gram negatif bakterilerin lipofilik özellikli hücre zarı, katyonik bağlar ile peptidoglikan tabakaya bağlanmıştır. Formülasyonda kelatinik ajanlardan Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)’i kullanarak, gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki katyonik bağlar çözünmekte ve hücre zarı geçirgenliği oluşmaktadır. Bakterilerden özellikle *Pseudomonas spp.* EDTA tarafından gerçekleştirilen bu kelatlaşma aktivitesine karşı oldukça duyarlıdır (English, 2006).

Kombine kullanım sonucunda antimikrobiyel etkiyi arttıran bir diğer içerik ise kaprilil glkol'dür. Güneş koruyucu ürünlerde fenoksietanolün antimikrobiyel aktivitesini artırdığı bildirilmiş ve günümüzde oldukça sık kullanılan patentli kombinasyonlardan biri haline gelmiştir. Bir gliserol monoarkileter olan etilheksilgliserin, cilt yumuşatıcı ve hafif nemlendirici özelliğe sahip bir hammaddedir. Suda az miktarda çözünmesine rağmen ($\%<0,1-25^{\circ}\text{C}$), bilinen kozmetik alkoller, glkoller ve yağlardaki çözünürlüğü yüksektir. Etilheksilgliserinin de sinerjistik etki göstererek fenoksietanol, metilizotiazolinon ve metilparaben gibi koruyucuların aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (English,2006; Leschke,2006).Ayrıca kozmetik ürünlere koruyucu aktivitesini arttırmak için ilave edilen bu maddelerin herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı yapılan Ames testleri ile gösterilmiştir (Johnson W Jr ve ark, 2013).

4.11. Kozmetik Ürünlerin Güvenlik Değerlendirmesi

Koruyucular, ürün içerisindeki mikrobiyel varlığı limitler içerisinde tutmak amacı ile ilave edilen içeriklerdir. Bu amaç doğrultusunda kontaminantlar üzerinde çeşitli biyolojik ve hücresel süreçleri içeren olumsuz etkileri vardır. Ancak, ürünü korumaya yönelik kullanılan bu kimyasalların mikroorganizmalar üzerine olduğu kadar tüketici üzerine de olumsuz etkileri olabilmektedir (Heid, ve ark, 2006). Dermatoloji kliniklerine kontakt dermatit nedeni ile başvuran hastaların bulguları değerlendirildiğinde bu reaksiyonların çoğunlukla kozmetik ürünlere karşı oluşan hassasiyetten kaynaklandığı görülmüştür (Yim ve ark,2014; Öztaş ve Önder,2010). Kozmetik ürünlere bağlı istenmeyen etkiler; kozmetik intolerans sendromu (hassas-reaktif deri), kontakt - temas dermatitler (irritan ve alerjik kontakt dermatitler), fotokontakt dermatit (fotosensitivite), kontakt ürtiker, akne/folikülit, deri ve eklerinde renk değişikliği, diğer lokal yan etkiler, sistemik yan etkiler olmak üzere sınıflandırılabilir (Kaymak ve Tırnaksız, 2007). Başta cilt bakım kremleri olmak üzere saç bakım ve tırnak ürünleri kullanımı sonucunda pek çok kozmetik alerji meydana gelmektedir. Kozmetik ürünlerdeki en temel alerjen kaynakları; koruyucular ve koku bileşenleridir (Biebl,2006). Tablo 8'de kozmetik reaksiyona neden olabilen maddeler gösterilmektedir.

Tablo 8: Kozmetik Dermatitlerde En Sık Karşılaşılan Maddeler

Koku maddeleri
Koruyucu maddeler
Parafenilendiamin
Lanolin ve türevleri
Gliseril tiyoglikolat
Propilen glikol
Toluen sülfonamid / Formaldehit reçinesi
Güneşten koruyucu maddeler ve diğer ultraviyole ışınlarını emen maddeler
Metakrilat
Diğerleri

(Öztaş ve Önder,2010)

Günlük yaşantımızın pek çok anında çeşitli koruyucular ile temas halinde bulunmaktayız. Yazar ve arkadaşları, 2010 yılında tüketiciler tarafından kullanılan deterjan ve kozmetik ürünlerde var olan koruyucular ve koku bileşenlerini tespit etmek üzere yapmış oldukları çalışmada; şampuanları, saç şekillendiricilerini, ıslak mendillerini, sıvı sabunlarını, sıvı bulaşık deterjanlarını ve çok amaçlı temizlik ürünlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda kozmetiklerin %44'nün parabenleri, % 25'nin formaldehit salan koruyucuları ve %23'nün ise izotiazolinonları içerdiğini bildirmişlerdir (Yazar ve ark., 2011).

Parabenlerin neden olduğu ilk alerjik kontakt dermatit bulgusu Bonnevie tarafından Danimarka'da 1940 yılında raporlanmıştır. Ardından Schorr yapmış olduğu çalışmada, Amerika'da ki paraben kaynaklı ilk alerjik kontakt dermatit bulgusunu bildirmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar ile formaldehit ve formaldehit salanlar grubundaki koruyuculara ait alerjik reaksiyonlar bildirilmiştir. Kullanım sıklığına bağlı olarak kuaterniyum-15'in diğer formaldehit salan koruyuculara göre daha sık hassasiyet oluşturduğu gösterilmiştir (Sasseville,2004).

Chang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, metilizotiazolinon içeren ıslak mendillerinin kullanımı sonucunda, 6 çocukta kontakt dermatit oluştuğunu bildirilmiştir (Chang ve ark., 2014).

İsveç’te, 1992,2000 ve 2009 yıllarına ait olan test sonuçlarından yararlanılarak yapılan geriye dönük çalışmada, özellikle genç bayanlarda potasyum dikromat reaksiyonlarının artmış olduğu gösterilmiştir (Fall ve ark, 2015).

Sağlık Bakanlığı’nın 23 Mayıs 2005 tarihli Resmi Gazete’de yayınlanan Türk Kozmetik Yönetmeliği’nin 6. Maddesine göre ‘Piyasaya arz edilen bir kozmetik ürün, normal ve üretici tarafından öngörülebilir makul kullanım şartları altında uygulandığında veya ürünün sunumu, etiketlenmesi, kullanımına dair açıklamalara veya üretici tarafından sağlanan bilgiler dikkate alınarak önerilen kullanım şartlarına göre uygulandığında, insan sağlığına zarar vermeyecek nitelikte olmalıdır (T.C. Resmi Gazete, 23 Mayıs 2005, sayı: 25823, Kozmetik Yönetmeliği Madde 6). Bu niteliklere sahip ve Kozmetik Mevzuatına uygun ürünler “güvenli” olarak kabul edilir.

30 Mart 2005 tarihinde yürürlüğe giren 5324 Sayılı Kozmetik Kanununu gereğince hazırlanan ve 23 Mayıs 2005 tarihli Resmi Gazetede yayımlanan Kozmetik Yönetmeliğinin 12.Maddesine göre kozmetik ürün için “Bitmiş ürün güvenlik değerlendirmesi” yapılması zorunludur. (Kozmetik Ürünlerde Güvenlik Değerlendirmesi Kılavuzu,22 Mart 2012,Rev:01)

Bu neden ile yeni bir ürün piyasaya çıkmadan önce mutlaka tüketici üzerine toksik veya iritan bir etkiye sahip olmadığını gösteren gerekli testlerin üretici firma tarafından yapılması gerekmektedir. Fakat her ürün tipine uygulanması gereken güvenlik testleri farklılık göstermektedir. Laboratuvar ortamında ve hastalar üzerinde uygulanan bu testlerden başlıcaları; Draize tavşan testi, göz irritasyon testi, Repeat Insult Patch Test (RIPT), yama testi (patch test), fotoyama testi’dir. Kozmetik ürünlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin belirlenebilmesi içinde uygulanan testler mevcuttur. Mutajenik etkinin belirlenmesinde ise en sık kullanılan test yöntemi, Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan, *Ames testi (Salmonella testi)*’dir (Öztaş ve Önder,2010; Heid, 2006).

En çok kullanılan p-hidroksibenzoik asit esterleri olan metilparaben, etilparaben, n-propilparaben, n- butilparaben ve izobutilparabenin yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar ile östrojenik aktiviteye sahip olduğu ve bu aktivitenin de artan lineer alkil

zinciri grubuna bağı olduğu bildirilmiştir (Routledge ve ark,1998). Ayrıca parabenlerin normal dışı östrojenik aktiviteleri nedeni ile göğüs kanseri oranını arttırdığı bildirilmiştir (Darbre,2006)

Soni ve arkadaşlarının, 2005 yılında yayınladıkları derlemede *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA1535 ve TA1537 suşlarını kullanarak geçmiş yıllarda yapılmış olan Ames testi ile metil ve propil parabenin her ikisinde mutajenik etkilerinin olmadığını göstermişlerdir (Soni ve ark.,2005).

Potasyum sorbat ve sorbik asitin *S. typhimurium* suşları kullanılarak yapılan Ames testi ile mutajenik bir aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir (Elder,1988).

Connor ve arkadaşlarının, iki heterosiklik izotiazolinon olan; metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon (MI/MCI)karışımını içeren kozmetik ürünlerin Ames testi ile *S. typhimurium* TA 100 suşunun üzerine mutajenik etkilerini araştırmışlar ve bu ürünlerden 5'nin *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerine direkt mutajenik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Coonor,1996). Ancak metilizotiazolinon'un farklı konsantrasyonları ile yapılan Ames testinde mutajenik bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Burnet ve ark,2010).

Formaldehit salan koruyucular sınıfında yer alan diazolidinil üre ile yapılan Ames testi'nde, koruyucunun TA98, TA 100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları üzerine mutajenik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Liebert,1990).

Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 ve TA100 suşlarına karşı gerçekleştirilen Ames deneyi ve *Esherichia coli* DNA-polimeraz eksikliği deneyi ile fenetil alkolün mutajenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Brandt,1990).

Deri üzerine uygulanan testlerde, fenoksietanolün teratojenik, embriyotoksik ve fetotoksik etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. Ayrıca metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100,TA1535 ve TA1537 suşlarına karşı mutajenik etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Scognamiglio, 2012; Poudrier,1990). Benzoik asit, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100,TA1535, TA1537 ve TA 1538 suşlarını içeren pek çok

Ames testinde non-mutajenik bulunmuştur (Becker ve ark, 2012; Kubo ve ark.2002; Zeiger ve ark. 1988; Ishidate ve ark.1984; McCann ve ark.,1975). Ancak bu iki koruyucunun kombinasyonunun mutajenik bir etkiye sahip olup olmadığını gösteren bir çalışma literatürde mevcut değildir. Benzer şekilde etilheksilgliserinin de Ames testi ile *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşlarına karşı mutajenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (<http://www.cir-safety.org/sites/default/files/ethylh122011finalx.pdf>, Erişim tarihi: 29.10.2015).

Kozmetik ürünlerinde kullanılan fenoksietanol ve etilheksilgliserin kombinasyonunun mutajenik veya non mutajenik olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır. Yeni nesil koruyucu olarak pek çok kombinasyonda yer alan kaprilil glikolünde mutajenik veya non-mutajenik etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir.

4.12 Kozmetik Ürünlere Koruyucular Dışında İlave Edilen Bitki Bileşenleri

Koruyucuların, bir yandan kozmetik ürünlerin raf ömrü süresince korunmasını sağlar iken diğer yandan neden olduğu istenmeyen etikleri tüketicilerin büyük bir çoğunluğu tarafından güvenirliliğini tartışılır hale getirmiştir. Daha doğal ve koruyucu içermeyen ürünlere talebin giderek artması teknolojik ve kozmetik alanlarda yapılan araştırmaların hız kazanmasına neden olmuş ve sonuçta sentetik koruyucuların antimikrobiyel aktiviteye sahip uçucu yağlar ile yer değiştirdiği ürünler üretilmeye başlanmıştır (Varvaesou ve ark., 2009).17,500 tane yüksek yapılı aromatik bitki arasından 300 tanesinin kozmetik, farmasötik ve parfüm endüstrisi için ticari öneme sahip olduğu bilinen yaklaşık olarak 3000'den fazla esansiyel yağa sahip bitki grubu bulunmaktadır (Dreger ve Wielgus,2013).

4.12.1. Uçucu yağların genel özellikleri

Uçucu yağlar; bitkilerin çiçekleri, tohumları, yaprakları, gövde, kabuk ve kökleri gibi çeşitli kısımlarından distilasyon yolu ile elde edilen, oda ısısında sıvı formda bulunan, ancak kolay bir şekilde kristalleşebilen, genel olarak renksiz bir formda veya açık sarı renkte uçucu, hoş kokulu aromatik bileşiklerdir (Varvaesou ve ark., 2009). Esansiyel yağlar tam anlamıyla 'yağ' yapısında olmamalarına ve sabit

yağlardan farklı yapıda olmalarına rağmen, sudaki çözünürlüklerinin az olmasından dolayı bu şekilde anılmaktadırlar (Gediya ve ark., 2011).

Esansiyel yağlar, genellikle terpenoidler ile terpenlerden ve ayrıca düşük molekül özelliğine sahip olan aromatik ve alifatik bileşiklerden oluşan, doğal bileşiklerin kompleks ve çeşitli bir grubudur. Esansiyel yağların bileşiminde oldukça fazla çeşitlilik gösteren yapısı ile en fazla bulunan (%90) molekül monoterpenler iken, aromatik bileşikler genellikle eser miktarda yer almaktadırlar. Genellikle esansiyel yağların bileşimlerinde 100 veya daha fazla sayıda çeşitli moleküller bulunmaktadır. Sahip oldukları antimikrobiyel aktivite bileşiminde yer alan moleküller kadar konsantrasyonları tarafından da belirlenebilmektedir. Uçucu yağların sahip oldukları bu bileşimlerin miktarı ve niteliği bitkinin yaşına, iklimsel ve çevresel şartların yanı sıra hasat zamanına ve distilasyon yöntemine göre çeşitlilik göstermektedir (Dreger ve Wielgus, 2013).

Uçucu yağ içeren bitki gruplarına *Apiaceae* (Maydonozgiller), *Asteraceae* (Papatyagiller), *Brassicaceae* (Turpgiller), *Chenopodiaceae* (Sirkengiller), *Compositaceae* (Bilesikgiller), *Cupressaceae* (Servigiller), *İridaceae* (Süsengiller), *Lamiaceae* (Ballıbabagiller), *Lauraceae* (Defnegiller), *Myrtaceae* (Mersingiller), *Pineaceae* (Çamgiller), *Poaceae* (Bugdaygiller), *Rosaceae* (Gülgiller), *Rutaceae* (Sedefotugiller), *Zingiberaceae* (Zencefilgiller) örnek olarak verilebilir (Evren ve Tekgüler, 2011).

Uçucu yağların elde edilmesinde kullanılan yöntemler bitkinin cinsine ve kullanılacak olan bitki kısmına göre farklılık göstermektedir. Yağların elde edilmesinde kullanılan yöntemler Tablo 9'da gösterilmektedir (Bayaz, 2014; Toroğlu ve Çenet, 2006)

Tablo 9: Esansiyel Yağların Elde Edilmesinde Kullanılan Başlıca Yöntemler

1. Damıtma (destilasyon) yöntemi: Bileşenleri kaynama noktaları arasındaki farklardan yararlanarak ayırma işlemidir.	a) Su ile damıtma (Hydro distillation) b) Su buharında damıtma (Steam distillation) c) Vakum altında damıtma (Vacuum distillation)
2. Ekstraksiyon yöntemi: Uçucu yağın bir çözücü içerisinde çözündürülerek alınması işlemidir.	a) Çözücü ekstraksiyonu (Solvent extraction) b) Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction) c) Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon (Microwave-assisted extraction) d) Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu (Pressurised solvent extraction) e) Katı faz mikro ekstraksiyon (Solid phase microextraction) f) Çok yönlü ekstraksiyon (Simultaneous distillation extraction)
3. Presleme yöntemi (mekanik ekstraksiyon): Ürünün bez torba içerisinde hidrolik pres altında sıkılmasıyla uçucu yağlarının alınması işlemidir.	

(Bayaz, 2014; Toroğlu ve Çenet, 2006)

4.12.2. Uçucu yağların antimikrobiyel aktivitesi

Esansiyel yağlar yapılarında bulunan sekonder uçucu metabolitler sayesinde antimikrobiyel aktivitelerinin yanı sıra antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik ve anti-kanser özelliklerine sahiptirler. Bu neden ile çeşitli geleneksel tedavi yöntemlerinde ve aromaterapide oldukça fazla kullanılmaktadırlar (Seow ve ark., 2014).

Geçmiş yıllara ait çalışmalar esansiyel yağların antimikrobiyel aktivitesine ait pek çok mekanizma olduğunu göstermektedir. Ancak, lipofilik bileşenleri sayesinde hücre zarında hasar meydana getirmeleri bilinen en iyi antimikrobiyel mekanizmalarındandır. Diğer etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış ve daha

detaylı çalışmalar gerektirmektedir. Lipofilik nitelikteki bileşiklerden olan terpenler ve terpenoidler, mikroorganizmaların hücre duvarından ve hücre zarından geçerek yapısal hasar meydana getirmektedirler. Bazı terpenoidler fonksiyonel grupları ile hücre zarı enzimlerine müdahale ederek, onları inaktif hale getirmekte ve hücrenin hayati fonksiyonlarına etki etmektedirler. Efluks pompalama sistemi bozulmuş olan mutant *P.aureginosa* 'nın *Melaleuca alternifolia* (Çay ağacı) esansiyel yağına ve bazı monoterpenlere karşı, aktif bir efluks pompalama sistemine sahip olan bakterilerden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir(Dreger ve Wielgus,2013). Ayrıca mantarların genel olarak uçucu yağların etkilerine karşı bakterilerden; bakteriler içerisinde de Gram pozitif bakterilerin, Gram negatif bakterilerden daha duyarlı oldukları bilinmektedir (Ceylan ve Fung,2004).

Uçucu yağların sahip oldukları antimikrobiyel aktiviteleri; konsantrasyonuna ve çözünürlülüğüne, temas süresine, ortamın pH'sına, mikroorganizmanın varlığını sürdürdüğü ortam koşullarına (örneğin, oksijen gereksinimine), sıcaklığa, mikroorganizmanın türüne ve sayısına, dispersiyon veya emülsifiye edici ajanların varlığına, sinerjistik etki ile aktivitenin artmasına neden olabilecek bileşiklerin (NaCl, Ca⁺² ve Mg⁺² gibi katyonlar) varlığı gibi faktörlerden etkilenmektedir (Seow ve ark.,2014).

Uçucu yağların hem antibakteriyel hemde antifungal aktivitesinin belirlenebilmesi için kullanılan iki temel yöntem vardır. Bunlardan birincisi, agar difüzyon metodu (disk difüzyon ve oluk difüzyon), ikincisi ise dilüsyon metodu (sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon)'dur (Kalemba ve Kunicka,2003).

Saraç, yapmış olduğu bir çalışmada, *Lamiaceae* familyasından 22 cinse ait 35 tür ve 2 varyeteye dahil olmak üzere toplam 48 bitki örneğinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların ve etanolik ekstratlarının antimikrobiyel aktivitelerini araştırmış ve çalışmada kullanılan uçucu yağların tümünün *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *P. fluorescens* MU 87 dışındaki çoklu dirençli suşları da içeren gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle *Origanum onites*, *Origanum vulgare ssp. hirtum*, *Satureja thymbra* ve *Thymbra spicata* var. *intricata* uçucu yağlarının, dirençli suşlardan *Stenotrophomonas maltophilia* MU 64, *Stenotrophomonas maltophilia* MU 99 ve

Chryseomonas luteola MU 65'ya karşı oldukça etkili olduğunu göstermişlerdir (Saraç,2005).

Mert ve arkadaşları, *Alcea rosea* L. (*Malvaceae*) (Hatmi çiçeği) çiçeklerinden hazırlanan ekstrelerin antimikrobiyel ve sitotoksik aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, test edilen bitki ekstratlarının, test mikroorganizmalarından *Escherichia coli* ATCC 29998, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ve *Salmonella typhimurium* CCM 5445'a karşı antimikrobiyel aktivitelerinin bulunduğunu göstermişlerdir (Mert ve ark.,2010).

Lamiaceae familyasına ait *Origanum vulgare subsp. hirtum*, *Origanum onites* L. ve *Origanum marjorana* L türlerinin esansiyel yağları ile yapılan çalışmada mercan köşkü bitkisinden elde edilen uçucu yağın *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Listonella anguillarum*'un yanısıra *Vibrio* sp. türlerine karşı da etkili olduğu bildirilmiştir (Stefanakis ve ark.,2013).

Prabuseenivasan ve arkadaşları, 21 adet esansiyel yağın dört adet gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) ve iki adet gram pozitif (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) bakteriye karşı dört farklı konsantrasyondaki (1:1, 1:5, 1:10 ve 1:20) antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Yağlar arasından tarçın, karanfil ve misket limonuna ait esansiyel yağların hem gram negatif hem de gram pozitif bakterileri inhibe ettiklerini bildirmişlerdir (Prabuseenivasan,2006).

Beş adet aromatik bitki bileşenin (sineol, sitral, geraniyol, linalol ve mentol) Gram pozitif kok - basil ile Gram negatif basillerden oluşan 18 adet bakteriye ve 12 adet mantara karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin test edildiği çalışmada; linalollun 17 adet bakteriyi inhibe ederek en etkili antibakteriyel etkiyi gösterirken, sitrol ve geraniyolün mantarların tümünü inhibe ederek en iyi antifungal aktiviteyi gösterdikleri bildirilmiştir (Pattnaik ve ark.,1997)

4.12.3. Uçucu yağların kozmetik ürünlerdeki kullanımı

Oldukça fazla uygulama alanının olmasından dolayı uçucu yağ üretimi ve tüketimi devamlı olarak artmakta ve kozmetik endüstrisinde, farmasötik endüstrisinde, gıda-baharat endüstrisinde, içecek endüstrisinde ve parfümeride oldukça geniş bir kullanım alanı bulmaktadır.

Esansiyel yağlar kozmetik endüstrisinde çeşitli amaçlar için kullanılabilir. Kullanım amaçlarından bazıları aşağıda özetlenmiştir;

- **Koruyucu:** Pek çok esansiyel yağ antibakteriyel özelliğinden dolayı kozmetik preparatlara sentetik koruyucuların aktivitesini arttırmak amacı ile ilave edilmektedir
- **Koku verici:** Sentetik koku verici maddelerin daha uzun ömürlü ve kalıcı olmasına rağmen, parfümeri uçucu yağların kozmetik sektöründeki en temel kullanım alanıdır.
- **Saç bakımı:** Esansiyel yağlar saç ürünlerinde kondisyonlama maddesi ve kepeğe karşı önleyici olarak kullanılmaktadır.
- **Cilt bakımı:** Esansiyel yağlar deri hücre membranına kolayca bağlanıp deriden geçebildikleri için ideal bir topikal krem bileşenidirler. Bu neden ile esansiyel yağlar deri üzerinde daha uzun süre etkili olabilmektedirler (Gediya ve ark., 2011).

Esansiyel yağların cilt bütünlüğü ile uyumlu ve sentetik bileşenlere göre tüketici sağlığı açısından daha güvenilir olmaları nedeni ile kozmetik ürünlerden özellikle cilt bakım kremlerinin içeriğinde yer almaktadırlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu; 2013). 2010 yılında piyasada bulunan yaşlanma karşıtı kremlerin bitkisel içerikleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu kremlerin bitki içeriklerini *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği ekstresi), Sitronel, Limonen, *Oenothera biennis* (akşam çuha çiçeği), *Glycyrrhiza glabra* (meyan kökü ekstratı), *Aframomum angustifolium* tohum ekstratı'nın oluşturduğu gösterilmiştir (Cronin ve Draelos;2010). Cilt üzerine uygulanan kozmetik ürünlerin bileşiminde yer alan bazı bitkiler ve kullanılış amaçları Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10: Cilt Üzerine Uygulanan Kozmetik Ürünlerin Bileşiminde Yer Alan Bazı Bitkiler ve Kullanılış Amaçları

Latince Bitki Adı (Türkçesi)	Kozmetikte kullanılış amacı
Aloe vera (Sarısabır)	Nemlendirici, yumuşatıcı
Aloe ferox Mill. vb. türler	UVB'ye karşı koruyucu, nemlendirici, cilt gerginliğini azaltıcı
Anthemis nobilis (Alman papatyası)	Rahatlatıcı, canlılık verici
Matricaria chamomilla L. Ekstre(Papatya)	Rahatlatıcı, temizleyici
Cucumis sativus L. Özsu (Salatalık)	Yumuşatıcı, canlılık verici
Fucus vesiculosus L. Ekstre (Esmer su yo sunu)	Yumuşatıcı, rahatlatıcı
Camellia sinensis ekstre (Çay)	Yumuşatıcı, nemlendirici, koruyucu
Melaleuca alternifolia (Çay ağacı yağı)	Tonik, temizleyici
Vitis vinifera L.(Asma)	Yumuşatıcı, koruyucu
Calendula officinalis L. Ekstre (Kandil çiçeği)	Yumuşatıcı, koruyucu, yara iyi edici
Centella asiatica L.ekstre (Gotu Kola bitkisi)	Temizleyici
Hamamelis virginiana L. Ekstre (Güvercin ağacı)	Astrenjan

(Çomoğlu,2012)

Pek çok esansiyel yağ bilinen antimikrobiyel özellikleri nedeni ile kozmetik ürünlerde etkili bir korumanın sağlanması için koruyucu sistem olarak kullanılmaktadır. Son dönemlerde kozmetik formülasyonlarında koruyucu amacı ile kullanılan bitki gruplarından bazıları; *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*,

Pteronia incana, *Artemisia afra*, *Thymus vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis* ve *Melaleuca alternifolia* 'dır (Papageorgiou ve ark., 2010).

Papageorgiou ve arkadaşları, *Lonicera caprifolium* ve *Lonicera japonica* türlerinin ekstratlarının koruyucu etkinliğini belirlemek amacı ile yapmış oldukları çalışmada, *Lonicera* ekstratlarının doğal koruyuculu kozmetik ürün hazırlanmasında kullanılabilecek kadar iyi bir antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (Papageorgiou ve ark.,2010)

Artemisia afra, *Pteronia incana*, *Lavandula officinalis* ve *Rosmarinus officinalis* esansiyel yağlarının su bazlı krem formülasyonundaki mikrobiyel kontaminasyonu azalttığı bildirilmiştir. En yüksek etkiyi *Artemisia afra* esansiyel yağının gösterdiği ve şelatlayıcı ajan olarak EDTA kullanımının hem bakteri hem de mantarlara karşı olan antimikrobiyel etkiyi arttırdığı belirtilmiştir (Muyima ve ark.,2002).

Maccioni ve arkadaşlarının *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus* ve *Salvia officinalis*'in esansiyel yağlarının tek başlarına ve sentetik koruyucular ile kombinasyonlarının antimikrobiyel aktivitelerini göstermek üzere yapmış oldukları çalışmada, yağların özellikle Gram pozitif bakterilere karşı sinerjistik etki oluşturduğu belirtilmiştir (Maccioni ve ark., 2002). *Calamintha officinalis* esansiyel yağının EDTA ile kombinasyonunun krem formülasyonlarında iyi bir koruyucu aktivitesi gösterdiği koruyucu etkinlik testleri ile bildirilmiştir (Nostro ve ark.,2002).

Esansiyel yağları ve sentetik koruyucuları veya sürfektanları içeren kompleks koruyucu sistemlerinin antimikrobiyel aktiviteleri de çalışılmıştır. Vücut losyonlarındaki lavanta, çay ağacı ve limon esansiyel yağlarının sentetik koruyucular ile kombinasyonlarının yanı sıra tek başlarına olan etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada, kompleks koruyucu sistemlerindeki sinerjistik etkinin ürünlerdeki koruyucu seviyesini 8.5 kez azalttığı açıkça görülmüştür (Kunicka-Styczynska ve ark., 2009).*Matricaria chamomilla*, *Aloe vera* ve *Calendula officinalis* ekstratları ile *Lavandula officinallis*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum zeylanicum* esansiyel yağlarının ve de metilparabenin antimikrobiyel aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, kozmetik emülsiyonlarında esansiyel yağların bitki ekstratları ve

metilparebenden daha güçlü bir inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Herman ve ark., 2013).

4.12.4. Çalışmada kullanılan esansiyel yağlar

4.12.4.1.Çay ağacı yağı (*Melaleuca alternifolia*)

Çay ağacı yağı, Avustralya'ya özgü *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) bitkisinin yapraklarından buhar distilasyonu yöntemi ile elde edilmektedir. *Melaleuca alternifolia* yaklaşık 7 metre boyuna kadar uzanabilen, çalılar ile kaplı kağıt kadar ince beyazımsı bir gövdesi ve geniş şeritli yaprakları olan küçük bir ağaçtır (Hammer,2015).

Monoterpenlerce zengin lipofilik bir yapıya sahip olan çay ağacı yağı 100'den fazla bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerin en büyük kısmını, yağın antimikrobiyel özelliğinde önemli rol oynayan ve minimum % 30 oranında bulunan 'terpinen-4-ol' oluşturmaktadır. Yapılan pek çok çalışma monoterpenlerin antimikrobiyel aktivitesini hücre membranına etki ederek gösterdiğini belirtmektedir (SCCP/1155/08; Cox ve ark.,2000). Çay ağacı yağının (terpinen-4-ol tip) kimyasal kompozisyonu Uluslar arası Standart (ISO 4730) tarafından iyi bir şekilde karakterize edilmiş olup; 15 bileşenin maximum ve minimum ön görülen yüzde değerlerini belirten bir kromatografik profile sahiptir (Hammer ve ark., 2003). Tablo 11'de ISO 4730'a göre çay ağacı yağının temel bileşenleri gösterilmektedir.

Tablo 11:Çay Ağacı Yağının Temel Bileşenleri (ISO 4730-2004)

BİLEŞENLER	Minimum (%)	Maximum (%)
α -pinen	1	6
Sabinen	Eser	3.5
α -terpinen	5	13
Limonen	0.5	1.5
p-simen	0.5	8
1,8, sineol	Eser	15
γ -terpinen	10	28
Terpinolen	1.5	5
terpinen-4-ol	30	48
α -terpineol	1.5	8
Aromadendren	Eser	3
Leden	Eser	3
δ -kadinen	Eser	3
Globulol	Eser	1
Viridiflorol	Eser	1

(SCCP/1155/08)

Yapılan klinik çalışmalar, çay ağacı yağının topikal antimikrobiyel ajan olarak kullanımının uçuk, akne, mantar, onikomikoz ve oral kandidiyazis gibi infeksiyonların tedavisinde ve metisiline direçli *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının azaltılmasında etkili olduğunu göstermektedir (Hammer ve ark.,2003). Bunun yanı sıra çay ağacı yağı sahip olduğu güçlü antibakteriyel, antiseptik, antiviral ve antifungal özellikleri ile farmasötik ve kozmetik endüstrisinde doğal koruyucu olarak da kullanılmaktadır (Aburjai ve Natsheh,2003).

4.12.4.2.İtır yağı (*Pelargonium graveolans*)

Gül esanslı ıtır uçucu yağı, Çin, Mısır, Cezayir, Fas, Reunion Adası'nda büyüyen Geraniaceae ailesi üyesi *Pelargonium graveolens* L. Her. ex Ait. bitkisinden elde edilmektedir. *Pelargonium graveolens* dikenli, 1.3 m boyuna kadar uzanabilen

ve 1 metreye kadar yayılabilen bir bitkidir. İtır uçucu yağı parfümeri, kozmetik, farmasötik ve de gıda alanında önemli yer tutan; bitkinin yapraklarından, çiçeklerinden ve bitki sap kısımlarından buhar distilasyonu veya hidrodamıtma yöntemleri ile elde edilen bir esansiyel yağdır (Verma ve ark.,2010; Boukhris ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, ıtır uçucu yağı yapısında bulunan 30'dan fazla bileşen ile karakterize edilmektedir. Yağın biyolojik aktivitesinde rol oynayan bu temel bileşenler; sitronel (%33.6), geraniol (%26.8), linalol (%10.5), sitronel format (%9.7) ve p- menton (%6.0)'dir (Boukhris ve ark.,2013).

4.12.4.3.Palmarosa yağı (*Cymbopogon martini*)

Palmarosa uçucu yağı, Poaceae ailesi üyesi olan *Cymbopogon martini* bitkisinden elde edilmektedir.Poaceae ailesi üyeleri, Hindistanın; Maharashtra, Madhya Pradesh ve Uttar Pradesh gibi daha kuru bölgelerinde yetişmektedir (Kumaran ve ark.,2003). Palmarosa yağının kimyasal bileşimi; monoterpenler, seskiterpenler ve geraniyol, farnesol, nerolidol, limonen, terpinen, mirsen, karyofilin, humulen,linalol gibi alkollerden oluşmaktadır.

Yapılan pek çok çalışma ile palmarosa esansiyel yağının ve bileşenlerinin antimikrobiyel, antiparazitik, anti-inflamatuvar, antikonvülsan ve antioksidant aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Sinha ve ark.,2011).

4.13. Ames Testi Esası

Salmonella- mikrozom test sistemi olarak da bilinen Ames testi Bruce Ames tarafından 1970’li yılların başında geliştirilmiş olan mutajenite testleri içerisinde en yoğun kullanılan kısa zamanlı ve geri mutasyon testidir. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Organizasyonu (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) tarafından standardize edilmiş bir test sistemi olan Ames testinin geçerliliği, mutajen-karsinojen etkisinin olduğu bilinen kimyasallar ile kabul edilmiştir.

Bu test sisteminde kullanılan kimyasal maddelerin olası mutajenik etkileri araştırılır iken kullanılmak üzere yapay olarak mutasyona uğratılmış olan *Salmonella typhimurium* (bakterilerin yaşaması için gerekli olan amino asit üretimini yapan histidin geni mutasyonuna uğratılmış) suşları geliştirilmiştir. Ames testinin temeli, mutasyona uğratılarak histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan suşların kimyasal madde ile bir araya getirilmesi ve bunun sonucunda mutant suşların ikincil bir mutasyon ile histidin üreten hale geri dönmeleri esasına dayanır.

His amino asidini sentezleme yeteneğine sahip olan prototrofik suşlar , *His* operonunda yapay olarak oluşturulan nokta mutasyonu nedeni ile mutant (oksotrofik) suş formuna dönüşmektedirler. Bu suşlar *His* amino asidini sentezleme yeteneklerini kaybettiklerinden dolayı ortamda hazır halde *His* amino asidi bulunmadığı durumlarda çoğalamazlar ve koloni formu oluşumu gözlemlenemez. Mutajenik bir durum söz konusu olduğunda *His* geninde çerçeve kayması veya baz çifti mutasyonu olur ve meydana gelen bu geri mutasyon *His*⁻ suşların *His*⁺ suşlar haline dönmesine neden olmaktadır.

Bu amaç ile Ames test sisteminde *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA 1538, TA 97, TA 102 gibi çeşitli mutant suşları kullanılmaktadır.

Mevcut mutant suşlar *His* operonunda yapay olarak oluşturulan mutasyona ek olarak, test edilen kimyasalların mutajenitelerini ortaya çıkarma yeteneklerini arttıracak olan ‘Rfa mutasyonu’ ve ‘UvrB mutasyonu’ gibi başka mutasyonları

içermektedirler. Ames test sisteminde sıklıkla kullanılan *S.typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarının genetik özellikleri Tablo 12’de gösterilmiştir (Mortelmans ve Zeiger, 2000; Umbuzeiro; 2010).

Tablo 12:*S.typhimurium* TA98 ve TA100 Mutant Suşlarının Genetik Özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	Mutasyon Tipi	Hedef	Hücre Duvarı	Onarım	pKM101	R-faktör
TA 98	<i>HisD-3052</i>	Çerçeve kayması	GCGCGCGC	rfa	D uvr B	+	+
TA100	<i>HisG-46</i>	Baz çifti Süstitisyonu	GGG	rfa	D uvr B	+	+

(Ames MPF™ 98/100, 2012).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Uçucu yağlar

- Çay Ağacı (*Melaleuca alternifolia*)(Florame)
- Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) (Florame)
- İtır (*Pelargonium graveolens*) (Florame)

5.1.2. Koruyucular

- Fenoksietanol + Benzoik asit (Kemiteks)
- Fenoksietanol +Kaprilil glikol(Kemiteks)
- Etilheksilgliserin + Fenoksietanol (Kemiteks)
- Benzil Alkol(Kemiteks)

5.1.3. Mikroorganizmalar

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ,	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028,
<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 14028 ,	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030,
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ,	<i>Candida guilliermondii</i> KUEN 998,
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228,	<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1021,
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922,	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018 ,
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315,	<i>Candida krusei</i> ATCC 62582 ,
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 4352 ,	

5.1.4. Çözeltiler

% 0.9 NaCl

% 1 BaCl₂.2H₂O

% 1 H₂SO₄

5.1.5.McFarland standart bulanıklık tüpleri

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarımızda hazırlanan McFarland 0,5 standart tüpü esas alınmış olup; 0,05 ml %1,175 BaCl₂ 9,95 ml %1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır.(Rayaman,2010)

5.1.6. Antibiyotikler

- Meropenem (Koçak Farma)
- Amfoterisin B (Bristol-Myers Squibb)

5.1.7.Kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri

TA98 (Yarı Katı)	Xenometrix, A10-210-S1-P
TA100 (Yarı Katı)	Xenometrix, A10-210-S1-P
2-Aminoantransen	Xenometrix, A10-210-S1-P
2-Nitrofluoren	Xenometrix,A10-210-S1-P
4-Nitroquinolin-N-oksit	Xenometrix, A10-210-S1-P
Ampisilin	Xenometrix, A10-210-S1-P
Glukoz-6-Fosfat (Na tuzu)	Sigma, G7250
Maruziyet Besiyeri	Xenometrix, A10-210-S1-P
Büyüme Besiyeri	Xenometrix, A10-210-S1-P
İndikatör Besiyeri	Xenometrix, A10-210-S1-P
Mueller Hinton Agar (MHA)	HIMEDIA, M173
Mueller Hinton Broth (MHB)	Merck, VM235893

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)	Merck, VM 626215 407
Tween 80	Merck S4137887 429
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck, AM 2381
Morfolino Propan Sülfonik Asit (MOPS)	AppliChem, A1076
RPMI 1640 (Sodyum bikarbonat ilavesi içermeyen fakat L-glutamin ilaveli)	Sigma-Aldrich, 6504
Meropenem Antibiyotik Diski (10µg)	Oxoid, CT 774B
Antibiyotik Test Diski, Çapı;6 mm	Sigma, 2017-006
MgCl ₂ .6H ₂ O	Merck, M 2670
NaH ₂ PO ₄	Merck, 106566
BaCl ₂ .2H ₂ O	Riedel-de Haen, 32610
NaCl	Riedel-de Haen, 13423
H ₂ SO ₄	Carlo Erba, 306657
NADP (Na tuzu)	N0505-500MG
Potasyum Klorür (KCl)	Merck, 529552.1000
Liyofilize S9	Xenometrix, A10-210-S1-P
Steril enderford tüpleri (0,5-1,5 mL)	Lot No: M0404A
Steril Mavi, Sarı ve Beyaz Pipet Uçları	Brand, 6125614
Filtre Kağıtlı Steril Kültür Tüpü	Xenometrix , PPW-1018

96 Kuyucuklu Steril Mikroplaka	Nest,701101
24 Kuyucuklu Seyreltme Plakası	Nest, 702001
384 Kuyucuklu Geri Döner Koloni Seçim Plakası	Nest ,761001
Reaktif kabı	Corning, 4870

5.1.8. Yöntemde kullanılan araç ve cihazlar

Çalkalamalı inkübatör	Biosan Type Es-20
Derin dondurucu	Beko D9459NM
Hassas Terazı	Shimadzu AX120
İnkübatör	Binder BD 115
Laminar flow	Esco Class II Typ A2
Otoklav	Hirayama HV-50L
Derin Dondurucu	Uğur
Kaba terazı (0,001 g)	Mettler
Hassas terazı (0,001 g)	Precisa
Vortex	IK Minishaker
Pastör fırını	Electro-Mag
Buzdolabı	Arçelik AR 5034
UV-Visible Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601
Mikropipetler	Brand 0,5-5 µL / 100 µL, Rainin 20-200 µL

5.1.9.Kasyon ayarlı MHB besiyerinin hazırlanması

Besiyerinin kasyon ayarı için magnezyum (Mg) ve kalsiyum (Ca) stok çözeltileri hazırlanmıştır.

- **Magnezyum stok çözeltisinin hazırlanması;**

8,36 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mL distile suda çözülmüş ve 10 mg/mL Mg^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

- **Kalsiyum stok çözeltisinin hazırlanması;**

3,68 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mL distile suda çözülmüş ve 10 mg/mL Ca^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Stok çözeltiler 2-8 °C’de saklanmıştır.

Besiyerinde istenilen Ca^{++} iyonu miktarı 20-25mg/mL, Mg^{++} iyonu miktarı 10-12,5mg/mL’dir. Bu iyon miktarlarını sağlamak için 1 litre MHB besiyerine Ca^{++} stok çözeltisinden 2,1 mL, Mg^{++} stok çözeltisinden 1,1 mL ilave edilmiştir.

5.2. Yöntem

Çalışmamızda kullanılan uçucu yağlar ile koruyucuların tekli halleri ve kombinasyonlarının antimikrobiyel aktiviteleri disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Mutajenik etkileri ise Ames Microplate Fluctuation (MPF) testi ile araştırılmıştır.

5.2.1.Disk difüzyon testi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın 18-24 saatlik agar plağındaki tek düşmüş kolonilerden serum fizyolojik içerisinde McFarland 0,5 bulanıklığı (1×10^8 kob / mL) standardına eşdeğer süspansiyon yapılarak inokülüm hazırlanmıştır. İnokülüm süspansiyonunun bulanıklığı ayarlandıktan sonra süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek bakteriler için Mueller Hinton Agar (MHA), mayalar için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) yüzeyine inoküle edilmiştir. Takiben 20µL uçucu yağ, koruyucu ve uçucu yağ ile koruyucu kombinasyonu örneklerinin emdirilmiş olduğu diskler (disk çapı 6 mm) steril bir pens yardımı ile agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha sonra besiyerleri bakteriler için 16 - 20 saat süreyle 35 ± 2 °C'de, mayalar için 48 saat süreyle 35 ± 2 °C'de inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonlarının çapı bir kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Yöntemin pozitif kontrolü için antibakteriyel etkinlik testinde meropenem (10µg/disk), antifungal etkinlik testinde ise amfoterisin B (20µg/disk) diskleri kullanılmıştır. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. (CLSI,2012; Naeini ve ark.,2009)

5.2.2.Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) tespiti

Antibakteriyel etkinlik testinde, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın 18-24 saatlik Mueller Hinton Agar (MHA) plağındaki; tek düşmüş kolonilerden serum fizyolojik içerisinde McFarland 0.5 bulanıklığı (1×10^8 kob / mL) standardına eşdeğer süspansiyon yapılarak inokülüm hazırlanmıştır. Mikroplağın her kuyucuğa %0,5 oranında Tween 80 ilaveli 0,1 mL Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) konulmuştur. Ardından test edilecek olan örnekten

ilk kuyucuğa 100 µL konulup uçucu yağların %3,125- %0,001; koruyucuların %50- %0,02; uçucu yağ ile koruyucu kombinasyonlarının %3,125- %0,001 aralığında ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır. Serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğerde hazırlanan bakteri süspansiyonu 1:10 oranında seyreltilerek, 10^7 kob/mL inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Hazırlanan inokulum, içerisinde test edilecek maddelerin bulunduğu tüm mikrodilüsyon plakalarına (negatif kontrol hariç) 5 µL ekilerek final konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olan inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 64- 0,03125 µg/mL konsantrasyon aralığında meropenemin ikişer kat azalan seri seyreltileri; negatif kontrol olarak Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) ve bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Mikrodilüsyon plakaları 35 ± 2 °C’de 16-20 saat inkube edilmiştir (CLSI,2012; Tepeve ark.,2006)

Antifungal etkinlik testinde ise Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) yüzeyinde 24 saatte üreyen maya kolonilerinden serum fizyolojik içerisinde McFarland 0,5 bulanıklığı ($1 - 5 \times 10^6$ kob/ml) standardına eşdeğer süspansiyon yapılarak inokülüm hazırlanmıştır. Ardından her kuyucuğa % 0.001 oranında Tween 80 ilaveli Morfolino Propan Sülfonik Asit (MOPS) ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyerinden 0.1 mL konulmuştur. Daha sonra test edilecek olan örnekten ilk kuyucuğa 100 µL konulup uçucu yağların %3,125- %0,001; koruyucuların %50- %0,02; uçucu yağ ile koruyucu kombinasyonlarının %3,125- %0,001 konsantrasyon aralığında ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır. Serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğerde hazırlanmış olan maya süspansiyonu ilk olarak 1:100 daha sonra 1:20 oranında, 0,165 M MOPS kullanılarak pH’sı 7,0’e ayarlanmış L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek, final konsantrasyonu 0,5-2,5 x 10^3 kob/mL olan inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Ardından 100’er µl uçucu yağları, koruyucuları ve uçucu yağ ile koruyucu kombinasyonu örneklerini içeren mikrodilüsyon plakalarının uygun kuyucuklarına maya süspansiyonundan 100 µL aktarılmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak 32-0,015 µg/mL aralığında amfoterisin B’nin ikişer kat azalan seri seyreltileri; negatif kontrol olarak RPMI-1640 besiyeri ve maya süspansiyonu kullanılmıştır. Mikrodilüsyon plakaları 35°C de 48 saat inkübe edilmiştir (CLSI,2008; Ergin ve Arıkan,2002).

Mikrobiyel üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri olarak değerlendirilmiştir.

5.2.3. Ames MPF™ testi

Çalışmamızda uygulanan Ames MPF™ testi Xenometrix'ten temin edilen kit içeriğindeki yöntem esas alınarak yürütülmüştür.

5.2.3.1.Yöntemde kullanılan çözeltiler

5.2.3.1.1. Metabolik aktivasyon sağlayıcı enzimin (=S9 karışımı) hazırlanması

Tüm bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames ve *Umu*-testlerinde eksik olan unsur, memelilerdeki detoksifikasyon/biyoaktivasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin bakterilerde olmayışıdır. Pek çok kimyasal biyotransformasyon ile reaktif olmayan metabolitlere dönüşürken bir kısmı DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik/karsinojenik olan metabolitlerine dönüşebilmektedirler. Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir kimyasalın biyotransformasyon enzimlerinin aktivasyonu ile nasıl bir potansiyele sahip olacağının belirlenmesi kaçınılmazdır. Bu sebeple deney hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstresi bakteriyel sisteme dahil edilerek testler prosedüre uygun hale getirilir.

En yaygın kullanılan enzim preparatı, sıçanların enzim aktivasyonunun kimyasal ile uyarılmış haldeki karaciğer dokularından homojenize edilen ve S9 fraksiyonu olarak isimlendirilen mikrozomal enzim fraksiyonudur. Hücre homojenize edilirken endoplazmik retikulum membranı “mikrozom” denilen kürecikler haline dönüşür. Bu kürecikler biyotransformasyonda görev alan enzimlerin oldukça önemli bir kısmını içerir.

Kimyasalların biyoaktivasyonunu etkili bir şekilde arttırmak için, insan karaciğerine oranla daha kolay elde edilmelerinden dolayı, fenorbital/5,6-benzoflavon veya aroklor 1254 ile muamele edilmiş sıçan karaciğerinden elde edilen S9 fraksiyonu rutin uygulamalarda sıklıkla kullanılır.

Testlerde %30'luk S9 karışımı kullanılır. S9 karışımının hazırlanması için gerekli kofaktör çözeltilerinin hazırlanışları ve saklama koşulları Tablo 13'de, test için gerekli miktarları ise Tablo14'de belirtilmiştir. S9 karışımı taze olarak steril tüp içerisinde hazırlanmıştır, deney süresince buz içerisinde bekletilmiştir.

Tablo 13: S9 Karışımı İçin Gerekli Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları ve Saklama Koşulları

Stok konsantrasyon	Kimyasal madde	Toplam hacim	Miktar	Saklama koşulu
1,00 M	KCl ^a	50 ml	3,728 g	4°C
0,25 M	MgCl ₂ x6H ₂ O ^a	50 ml	2,541 g	4°C
0,20 M	Glukoz-6-fosfat (Na tuzu) ^b	10 ml	0,564 g	-20°C
0,04 M	NADP (Na tuzu) ^b	10 ml	0,306 g	-20°C
0,20 M	NaH ₂ PO ₄ tamponu ^{a*}	100 ml	3,120 g	4°C

^aotoklav ile sterilizasyon^bfiltre ile sterilizasyon

*3,12 g NaH₂PO₄x2H₂O'ya 75 ml distile su eklenir. NaOH ile pH' sı 7,4'e ayarlanır ve hacmi 100 ml' ye tamamlanır.

Tablo 14: %30'luk S9 Karışımının Hazırlanması

Stok konsantrasyon	Kimyasal madde	Ames testi için kullanılan miktarlar
1,00 M	KCl	0,083 ml
0,25 M	MgCl ₂ x6H ₂ O	0,080 ml
0,20 M	Glukoz-6-fosfat (Na tuzu)	0,063 ml
0,04 M	NADP (Na tuzu)	0,250 ml
0,20 M	NaH ₂ PO ₄ tamponu	1,270 ml
	S9 fraksiyonu	0,750 ml

5.2.3.2 Ames testi yapılışı

5.2.3.2.1 Pozitif kontrol çözeltilerinin hazırlanışı

Bakterilere karşı mutajenik etkileri bilinen standart maddeler pozitif kontrol olarak her deneyde yapılmıştır. Test ortamına S9 karışımı ilave edilmesi (+S9) veya edilmemesi (-S9) durumları için farklı pozitif kontroller kullanılmıştır.

-S9'lu testler için:

- ✓ NF stok çözeltisi: 100 µg 2-NF 1mL DMSO içinde çözündürülmüştür.
- ✓ 4-NQO stok çözeltisi: 5 µg 4-NQO 1 mL DMSO içinde çözündürülmüştür..
- ✓ 40'ar µl NF ve 4-NQO çözeltisinden oluşan karışım 96 kuyucuklu mikropalkanın ilgili kuyucuklarına konulmuştur.
- ✓ Kuyucuktaki pozitif kontrol konsantrasyonu 2-NF için 50 µg/ml, 4-NQO için 2,5 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. *S. typhimurium* TA 100 ve TA 98 ilave edilerek 1/25 oranında seyrelme gerçekleştiğinde son konsantrasyonlar 2-NF için 2 µg/ml, 4-NQO için 0,1 µg/mL şeklinde olmuştur.

+S9'lu testler için :

- ✓ 2-AA stok çözeltisi: 125 µg 2-AA 1 mL DMSO içinde çözündürülmüştür.
- ✓ Stok çözeltisinin 10 µL'si 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasının ilgili kuyucuklarına direkt tatbik edilmiştir. 2-AA için son konsantrasyon 5 µg/mL oranında olmuştur.

5.2.3.2.2. Testin yapılışı

Test süresince düzenlenecek ve kullanılacak olan mikropalaklar aşağıda kısaca listelenmiştir;

Test maddelerinin sitotoksik konsantrasyonlarının belirlenmesinde;

- Test maddelerinin seyreltilmesi işlemi için seyreltme mikropalakası olan 96'lık mikropalaka (1 adet),

- Bakterinin test maddelerine maruziyeti için maruziyet mikrolakası olan 24'lük mikrolaka (4 adet; TA 98-S9, TA98+S9, TA100-S9, TA100+S9) kullanılmıştır.

Ames testinde;

- Test maddelerinin seyreltilmesi ve pozitif kontrol ilavesi için seyreltme mikrolakası olan 96'lık mikrolaka (1 adet),
- Bakterinin test maddelerine maruziyeti için maruziyet mikrolakası olan 24'lük mikrolaka (4 adet; TA 98-S9, TA98+S9, TA100-S9, TA100+S9),
- Maruziyet kültürlerinin mutajenik aktivitelerinin tespiti için 384'lük mikrolaka (12 adet; TA 98-S9, TA98+S9, TA100-S9, TA100+S9 maruziyet mikrolakalarının her biri için 3'er adet olmak üzere) kullanılmıştır.

Bakteri kültürünün hazırlanması

Bir gecelik kültürün hazırlanması:

- ✓ TA 98 ve TA 100 olarak etiketlenen 50 mL'lik iki ayrı steril falkon tüpüne 10'ar mL büyüme besiyeri konulmuştur.
- ✓ Negatif kontrol olarak etiketlenen 50 mL'lik steril falkon tüpüne de 5 mL büyüme besiyeri konulmuştur.
- ✓ TA 98 ve TA100 tüplerine -20°C'den çıkarılan ve oda sıcaklığında çözünmeye bırakılan ampicilin çözeltisinden % 0,1 oranında (10 µL) eklenmiştir.
- ✓ -80°C'den çıkarılan bakteri kültürü oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir ve üzerine 200 µL büyüme besiyeri ilave edilmiştir. Yarı katı pellet halindeki bakteriler steril pipet ucu ile mekanik olarak parçalanmıştır. İşleme homojen görünüm sağlanıp, içerik pipetlenebilir hale gelene kadar devam edilmiştir. Bakteri kültürünün homojenize hale getirilmesi şekil 4'de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



Şekil 4. Bakteri kültürünün homojenize hale getirilmesi.

- ✓ Homojen hale getirilmiş bakteri karışımının 25 μL 'si ampisilinli büyüme besiyeri içeren “TA100” ve “TA98” olarak etiketlenen falkon tüplerine ilave edilmiştir
- ✓ Tüplerin kapakları gevşekçe kapatılarak bakterilerin büyümeleri için gerekli havalandırma sağlanmıştır (Filtreli kapak kullanılması durumunda kapak sıkıca kapatılsa dahi yeterli havalandırma sağlanabilir).
- ✓ Falkon tüpler, etüvde 37°C ve 250 rpm’de 14-16 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir.

Bir gecelik kültürlerin OD₆₀₀ değerlerinin ölçülmesi:

- ✓ Bir gecelik bakteri kültürünü içeren falkonlar çalkalanıp ve her birinden 100’er μL alınarak içinde 900 μL büyüme besiyeri (ampisilin içermeyen) bulunan spektrofotometre küvetine ilave edilip, içerik iyice karıştırılmıştır.
- ✓ Blank (kör) olarak 1000 μL büyüme besiyeri (ampisilin içermeyen) kullanılmıştır.
- ✓ Negatif kontrol ve bakteri kültürlerinin (TA98 ve TA100 suşları) OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür.
- ✓ Elde edilen sonuçlar seyreltme faktörü (10) ile çarpılarak bir gecelik kültürlerin optik yoğunluğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda TA 98, TA 100 ve negatif kontrol olarak etiketlenen bir gecelik bakteri kültür tüplerinin optik yoğunluğu OD₆₀₀ değerleri negatif kontrolün 0,014

(≤ 0.05), TA98 için OD₆₀₀ değeri 2,36 ve TA100 için OD₆₀₀ değeri 2,45 olarak bulunmuştur.

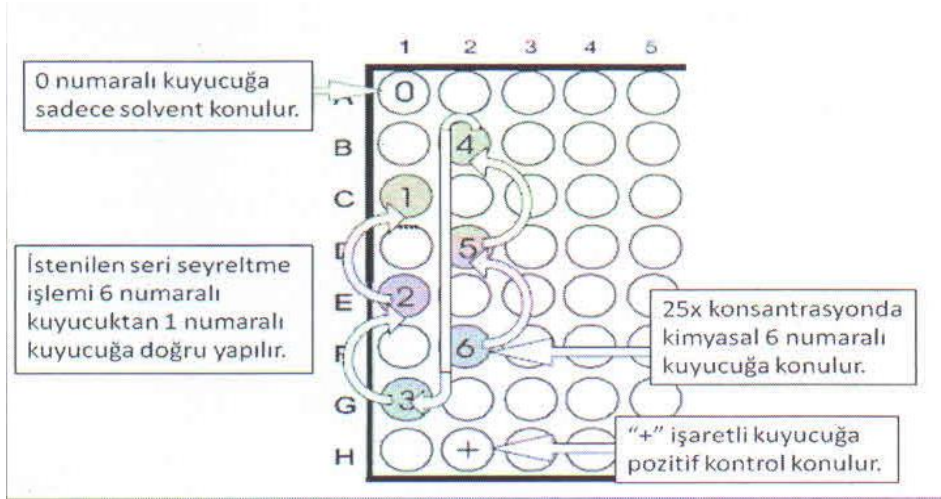
Bakteri kültürünün test maddelerine maruz bırakılması

Test maddelerinin sitotoksik konsantrasyonlarının belirlenmesi:

Ames testine başlamadan önce tayin edilecek örneğin test ortamındaki çözünürlüğü ve çalışılacak konsantrasyon aralığının bakteri suşu üzerine sitotoksik etkisi ön deneyle incelenmelidir. Test prosedüründe olduğu gibi, öncelikle 96 kuyucuklu mikropalakada test maddeleri için seyreltme işlemi yapılmıştır ve 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasına aktarılmıştır. Maruziyet besiyeri ve bir gecelik bakteri kültürü eklendikten sonra, 37°C ve 250 rpm'de 90 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar incelendiğinde bulanık olan kuyucuklar sitotoksik etkisi olmayan dozları, berrak olan kuyucuklar ise yüksek sitotoksik etkili olan dozları göstermektedir. Buna göre yapılan inceleme sonrasında, sitotoksikite gösteren en düşük doz, testte kullanılan en yüksek konsantrasyon olarak seçilmiştir.

Test maddelerinin stok çözeltilerinden gerekli seyreltilmelerin yapılması:

- ✓ Deney sonunda mikropalaka kuyucuğundaki test maddesi 25 kat oranında seyrelmiş olacağı için test maddesinin deneydeki en yüksek konsantrasyonunun 25 kat konsantre çözeltisi hazırlanmıştır.
- ✓ Test maddelerinin stok çözeltilerinden gerekli seyreltmeler 96 kuyucuklu mikropalakada Şekil 5'de verilen plana uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu mikropalakada seyreltme işlemi şekil 5'de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).

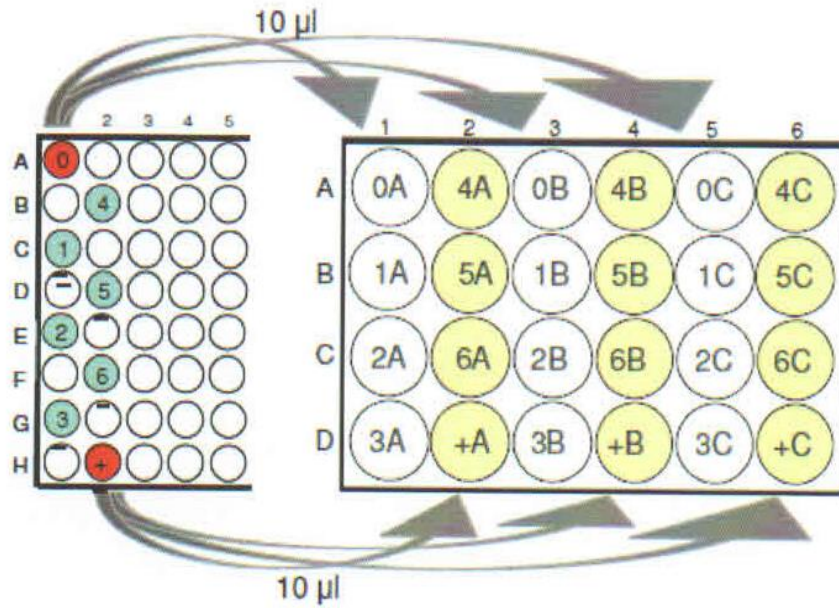


Şekil 5: 96 kuyucuklu mikropalakada seyreltme işlemi.

- ✓ 150µL ($\frac{1}{2}$ oranında seyreltme için) solvent (DMSO) 0'dan 5'e kadar numaralandırılmış kuyucuklara konulmuştur.
- ✓ 6 numaralı kuyucuğa 25 kat konsantre test maddesinden 300 µL konulmuştur.
- ✓ 6 numaralı kuyucuktan 150 µL alınıp, 5 numaralı kuyucuğa aktarılıp iyice karıştırılmıştır.
- ✓ Tekrar 5 numaralı kuyucuktan 150 µL alınıp, 4 numaralı kuyucuğa aktarılıp iyice karıştırılmıştır.
- ✓ Seyreltme işlemine bu şekilde 1 numaralı kuyucuk da dahil olmak üzere devam edilmiş ve en son 1 numaralı kuyucuktan 150 µL dışarı atılmıştır.
- ✓ 0 numaralı kuyucuk "solvent kontrolü" içindir (sadece solvent içermektedir).
- ✓ -S9'lu test için gerekli pozitif kontrol çözeltisi "+" ile işaretlenmiş kuyucuğa bölüm 5.2.3.2.1 de belirtildiği şekilde konulmuştur. +S9' lu test için gerekli pozitif kontrol çözeltisi ise direkt olarak 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasına konulmuştur.

Test maddelerinin 96 kuyucuklu seyreltme mikrolakasından 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına aktarılması:

- ✓ 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakaları her bir suş için ve S9 karışımının olup olmamasına göre etiketlenmiştir. Örneğin TA100+S9, TA100-S9 gibi.
- ✓ 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakaları aşağıda belirtilen plana göre düzenlenmiştir. 96 kuyucuklu seyreltme mikrolakasından 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına aktarım işlemi şekil 6'da sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



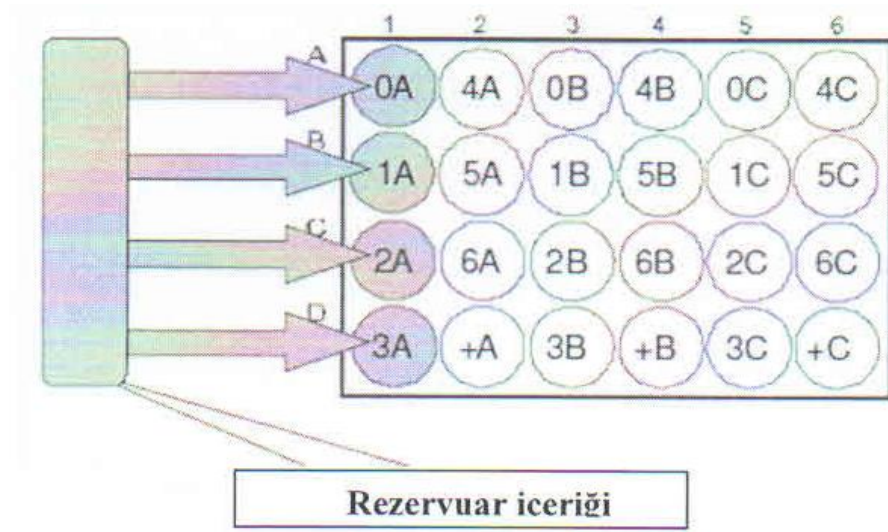
Şekil 6: 96 kuyucuklu seyreltme mikrolakasından 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına aktarım işlemi.

- ✓ Birer tane boşluk bırakmak üzere 8 kanallı pipete 4 adet pipet ucu takılmıştır.
- ✓ 96 kuyucuklu mikrolakanın birinci sütunundaki 4 kuyucuktan (A, C, E, G sırasındaki) 10'ar µL alınıp, 24 kuyucuklu mikrolakanın 1, 3 ve 5 numaralı sütunlarına aktarılmıştır.
- ✓ Ardından 96 kuyucuklu mikrolakanın ikinci sütunundaki 4 kuyucuktan (B, D, F, H sırasındaki) 10'ar µL alınıp, 24 kuyucuklu mikrolakanın 2, 4 ve 6 numaralı sütunlarına aktarılmıştır.

- ✓ Bu işlem TA98 ve TA100 için +S9'lu ve -S9'lu olmak üzere 4 adet mikrolaka için tamamlanmıştır.
- ✓ Pozitif kontrol kuyucuklarına (S2, D4 ve D6) 10'ar µL pozitif kontrol çözeltileri eklenmiştir.

24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasinda maruziyetin gerçekleştirilmesi:

24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına bakteri ekimi şekil 7'de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



şekil 7: 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasına bakteri ekimi.

✓ “TA98+S9” maruziyet mikrolakası için:

- Bir rezervuar içerisine 6,0 mL maruziyet besiyeri, reinkübe edilmiş *S. typhimurium* TA98 suşundan 0,8 mL ve 1,2 mL S9 karışımı eklenip iyice karıştırılmıştır..
- 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasının her bir kuyucuğuna hazırlanan karışımdan 240 µL aktarılmıştır.

✓ **“TA98-S9” maruziyet mikrolakası için:**

- Bir rezervuar içerisine 7,2 mL maruziyet besiyeri, reinkübe edilmiş *S. typhimurium* TA98 suşundan 0,8 mL eklenip iyice karıştırılmıştır.
- 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasının her bir kuyucuğuna hazırlanan karışımdan 240 µL aktarılmıştır.

✓ **“TA100+S9” maruziyet mikrolakası için:**

- Bir rezervuar içerisine 6,4 mL maruziyet besiyeri, reinkübe edilmiş *S. typhimurium* TA100 suşundan 0,4 mL ve 1,2 mL S9 karışımı eklenip iyice karıştırılmıştır.
- 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasının her bir kuyucuğuna hazırlanan karışımdan 240 µL aktarılmıştır.

✓ **“TA100-S9” maruziyet mikrolakası için:**

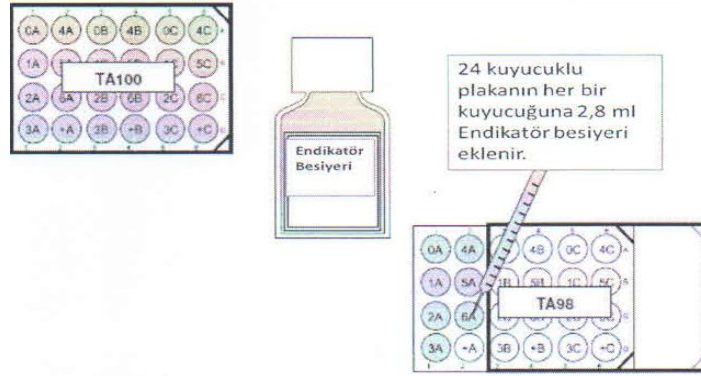
- Bir rezervuar içerisine 7,6 mL maruziyet besiyeri, reinkübe edilmiş *S. typhimurium* TA100 suşundan 0,4 mL eklenip iyice karıştırılmıştır.
- 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasının her bir kuyucuğuna hazırlanan karışımdan 240 µL aktarılmıştır.

Hazırlanan tüm 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakaları 37°C ve 250 rpm’de 90 dakika çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır.

Mutajenik aktivitenin tespiti

Maruziyet mikrolakalarına endikatör besiyerinin ilave edilmesi

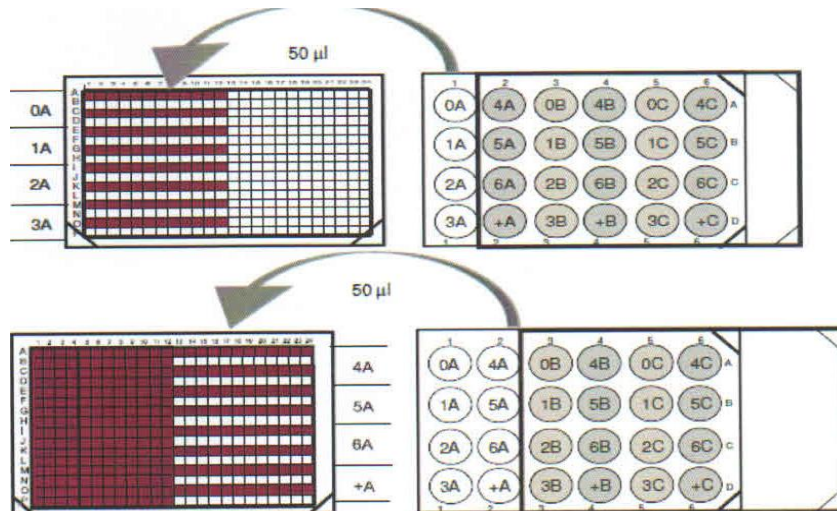
- ✓ 90 dakikalık inkübasyonun ardından inkübatörden çıkarılan 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakalarının her bir kuyucuğuna 2,8 mL endikatör besiyeri eklenmiştir. 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakalarına endikatör besiyerinin eklenmesi Şekil 8’de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



Şekil 8: 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakalarına endikatör besiyerinin eklenmesi.

24 kuyucuklu maruziyet mikrolakasındaki maruziyet kültürlerinin 384 kuyucuklu mikrolakaya aktarılması:

- ✓ Her bir 24 kuyucuklu maruziyet mikrolakası için 3'er adet 384 kuyucuklu mikrolaka hazırlanmış ve uygun şekilde etiketlenmiştir. Örneğin *S. typhimurium* TA100 suşunun -S9'lu 3 tekrarlı testi için; TA100-1, TA100-2, TA100-3 ya da +S9'lu 3 tekrarlı test için; TA100+1, TA100+2, TA100+3 gibi.
- ✓ 24 kuyucuklu mikrolakadaki içeriğin 384 kuyucuklu mikrolakaya aktarılması aşağıdaki şekil 9'daki gibi yapılmıştır (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).

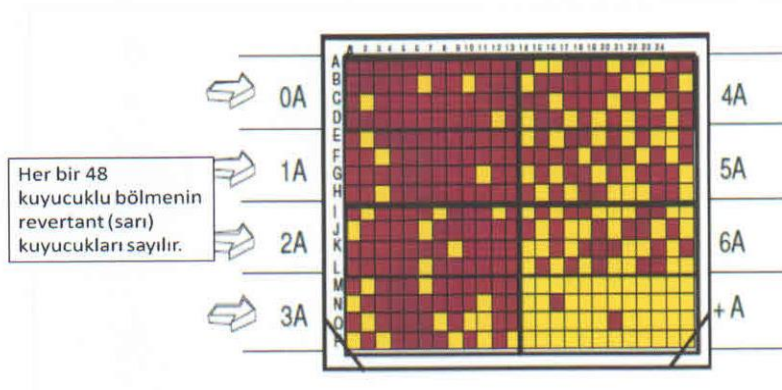


Şekil 9: 24 kuyucuklu mikrolakadan 384 kuyucuklu mikrolakaya aktarım işlemi.

- 24 kuyucuklu mikrolakadan alınan karışım 384 kuyucuklu mikrolakanın 1'den 12'ye kadar olan sütunlarına (A, C, E, G, I, K, M, O sıralarına) 50'şer µL olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Uçlar değiştirilmeden 384 kuyucuklu mikrolakanın aynı yarısında bulunan diğer sıralarına (B, D, F, H, J, L, N, P sıralarına) da aynı karışımdan 50'şer µL dağıtılmıştır.
- Her bir suş için aynı işlemler tekrarlanmıştır.

384 kuyucuklu mikrolakaların inkübe edilmesi:

- ✓ 384 kuyucuklu mikrolakalar kilitlenebilir plastik poşet içerisinde 37°C'lik inkübatörde 2 gün boyunca (çalkalanmadan) inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ 384 kuyucuklu mikrolaka üzerinde yer alan her bir 48 kuyucuklu alandaki pozitif kuyucuklar (mor renkten sarı renge dönen veya gözle görülebilir bakteri kolonileri içeren kuyucuklar) sayılmıştır. Kuyucukların görünüşü şekil 10'de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



Şekil 10: Kuyucukların görünüşü.

- ✓ Sayım önceden hazırlanmış olan çizelgedeki ilgili bölüme kayıt edilmiştir. Pozitif kuyucukların kayıt edilmesi tablo 15'de sunulmuştur.

Tablo 15: Pozitif Kuyucukların Kayıt Edilmesi

TA98 -S9 / Pozitif kuyucuklar

Kons.	Mikroplaka 1	Mikroplaka 2	Mikroplaka 3
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
+			

TA98 +S9 / Pozitif kuyucuklar

Kons.	Mikroplaka 1	Mikroplaka 2	Mikroplaka 3
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
+			

TA100 -S9 / Pozitif kuyucuklar

Kons.	Mikroplaka 1	Mikroplaka 2	Mikroplaka 3
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
+			

TA100 +S9 / Pozitif kuyucuklar

Kons.	Mikroplaka 1	Mikroplaka 2	Mikroplaka 3
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
+			

Sonuçların değerlendirilmesi

- ✓ Test sonunda elde edilen veriler Xenometrix tarafından düzenlenen excel formatına aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir;
- Deney tarihi, kullanılan suş, test edilen örneğin adı, çalışılan konsantrasyonlar (S9 karışımının kullanılıp (+S9) kullanılmaması (-S9) göz önünde bulundurularak) excelde “Concentrations” çalışma sayfasında ilgili kısımlara girilmiştir. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Concertrations” çalışma sayfası şekil 11’de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).

Excel spreadsheet titled "Concentrations" for Ames test results. The spreadsheet includes the following fields and data:

- Date: 01.01.2007
- Select Strain from Dropdown List in Box Below: TA 100
- Enter compound 1 in Box Below: Compound 1
- Enter compound 2 in Box Below: (Empty box)
- Enter compound 3 in Box Below: (Empty box)
- Enter Concentration used: (Empty box)
- Choose Units for Compound 1: µg/ml
- Table of Concentrations used for Compound 1:

Cpd 1: Compound 1	Concentration	Units
1	4	µg/ml
2	20	µg/ml
3	100	µg/ml
4	500	µg/ml
5	2000	µg/ml
6	5000	µg/ml

The bottom navigation bar shows: Concentrations / raw data / Summary / Graphs /

Şekil 11: Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Concertrations” çalışma sayfası.

- Tablo 15'deki veriler “raw data” çalışma sayfasında ilgili yerlere girilmiştir. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “raw data” çalışma sayfası şekil 12’de sunulmuştur(Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).

Enter the raw data (triplicate) into all colored fields

Enter the negative (solvent) control data into yellow colored fields

Compound: Compound 1
TA 100-S9

Conc. (µg/ml)	Replicate #1	Replicate #2	Replicate #3
4	3	4	1
20	6	4	9
100	12	9	10
500	19	18	17
2500	37	30	32
5000	39	40	45
Pos. Control	48	47	46

Spontaneous
TA 100-S9

Enter positive control data

Compound: Compound 1
TA 100+S9

Conc. (µg/ml)	Replicate #1	Replicate #2	Replicate #3
4	4	5	5
20	4	6	7
100	6	8	9
500	15	17	21
2500	26	30	25
5000	31	30	34
Pos. Control	47	44	46

Spontaneous
TA 100+S9

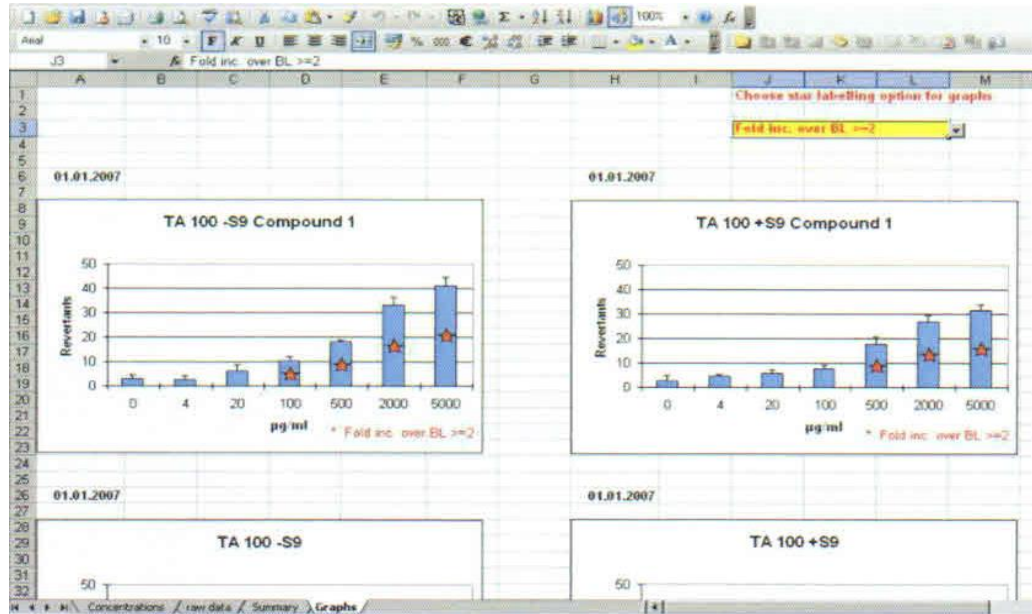
Spontaneous

- **Şekil 12:** Ames testi sonuç değerlendirme exceli “raw data” çalışma sayfası.
- Test bileşeninin mutajen olup olmadığının değerlendirilmesi 2 kriter göz önünde bulundurulur;
 - (i) Test bileşeninin oluşturduğu revertant koloni sayısı çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2 kattan fazla artış meydana gelmesi,
 - (ii) Test bileşeninin oluşturduğu revertant koloni sayısında doza bağlı bir artış meydana geliyorsa ve bu dozların oluşturduğu revertant koloni sayıları çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en az 1 doz için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmesi.
- Karşılaştırma “Student-t testi” ile yapılmış ve $p \leq 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek değerlendirilmiştir. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Summary” çalışma sayfası şekil 13’de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).

Definitions and Explanations									
'n' = number of replicates 'Baseline' = Mean + 1 SD 'Fold increase (zero value)' = fold increase over mean pos. wells of zero dose control. Values ≥ 3.0 will appear in red. → If 'mean # pos wells' of zero dose control is less than 1, value will appear in grey and will be set to 1 in the column 'Corr. mean' Fold increase (zero value) will be then be calculated from the corrected mean. Baseline values < 1 will be set to 1. 'Fold increase (baseline)' = fold increase over baseline. Values ≥ 2.0 will appear in bold red. 't-test' p-values, 1-sided, based on unpaired data. Values ≤ 0.05 appear red, values ≤ 0.01 bold red. It is suggested to use 'Fold increase (over baseline)' and 't-test' to evaluate results									
Compound 1									
TA 100 -S9									
Assay Date: 01.01.2007									
Conc. (µg/ml)	n	mean # pos. Wells	Corr. mean	SD	Base-line	Fold increase (over zero value)	Fold increase (over baseline)	t-test p-value (unpaired, 1-sided)	
0	6	3.00		1.79	4.79	0.89	0.56	0.3959	
4	3	2.67		1.53		2.11	1.32	0.0263	
20	3	6.33		2.52		3.44	2.16	0.0003	
100	3	10.33		1.53		6.00	3.76	0.0000	
500	3	18.00		1.00		11.00	6.89	0.0000	
2000	3	33.00		3.61		13.76	8.63	0.0000	
5000	3	41.33		3.21					
Pos. Control	3	47.67		0.58					
Compound 1									

Şekil 13: Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Summary” çalışma sayfası.

- Excelde sonuçlar ayrıca grafik (revertant sayısı-konsantrasyon) olarak da gözlenebilmektedir. Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Graphs” çalışma sayfası şekil 14’de sunulmuştur (Ames MPF™ 98/100, 2012; Sarıkaya, 2014).



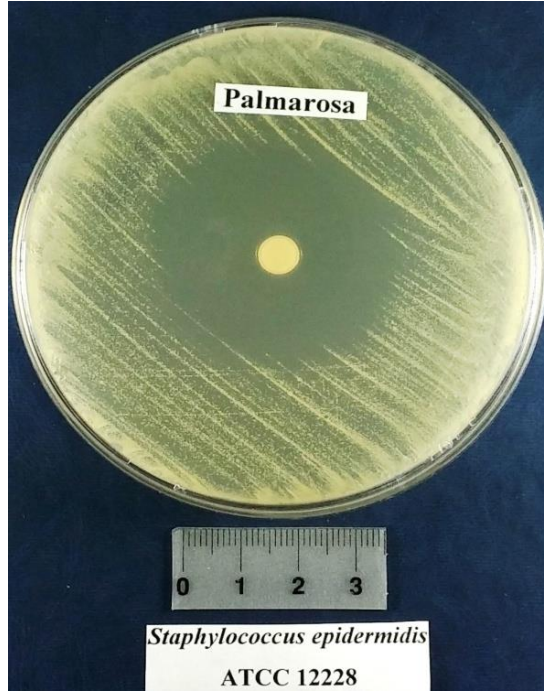
Şekil 14: Ames testi sonuç değerlendirme exceli “Graphs” çalışma sayfası.

6. BULGULAR

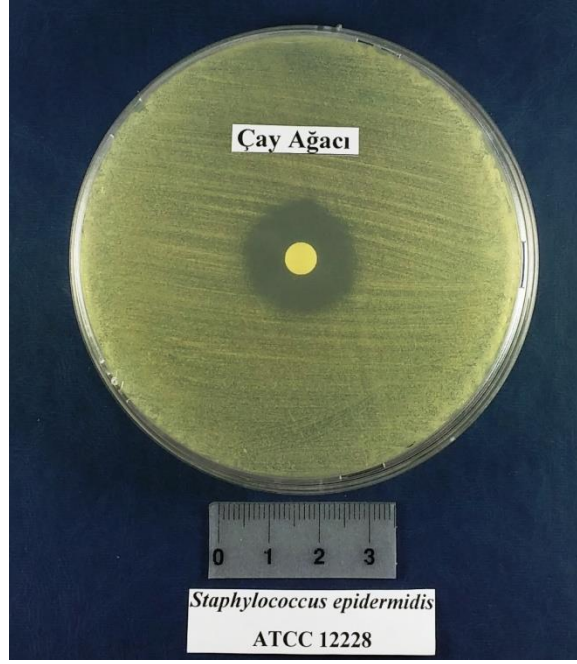
6.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Aktivitesi

Uçucu yağların antimikrobiyel aktivite testinde; palmarosa (*Staphylococcus epidermidis*, 33,76 mm/zon; MİK: %0,04) ve çay ağacı uçucu yağlarının (*Staphylococcus epidermidis*, 21,42 mm/zon; MİK: %0,09) bakterilere karşı en yüksek etkiyi gösterdikleri bulunmuştur (Resim 1, Resim 2). Mayalara karşı ise en yüksek antimikrobiyel etkiyi palmarosa yağının (*Candida tropicalis*, 31,13 mm/zon; MİK: %0,09) gösterdiği saptanmıştır (Resim 3).

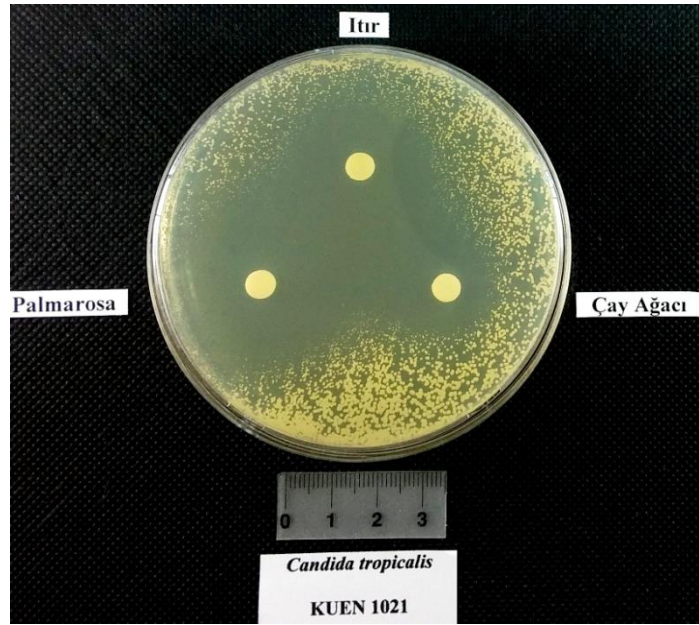
Uçucu yağların bakterilere ve mayalara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyel etki sonuçları Tablo 16 ve Tablo 17’de gösterilmiştir.



Resim 1: Palmarosa uçucu yağının *Staphylococcus epidermidis*’e karşı antibakteriyel aktivitesi



Resim 2: Çay ağacı uçucu yağının *Staphylococcus epidermidis* 'e karşı antibakteriyel aktivitesi



Resim 3: Palmarosa uçucu yağının *Candida tropicalis* 'e karşı antifungal aktivitesi

Tablo16:Uçucu Yağların Antibakteriyel Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

BAKTERİLER	UÇUCU YAĞLAR							
	ITIR		PALMAROSA		ÇAY AĞACI		MEROPENEM	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10,87	0,19	12,15	0,04	23,82	0,39	36,73	<0,03125
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12,79	>3,125	14,20	>3,125	19,49	>3,125	38,26	0,0625
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	26,07	0,04	33,76	0,04	21,42	0,09	43,70	0,125
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	7,56	0,39	9,35	0,04	21,34	0,78	35,63	0,0625
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	>3,125	-	1,56	-	1,56	33,26	0,25
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	7,37	0,19	7,53	0,04	18,59	0,39	32,92	<0,03125
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	10,36	0,19	13,16	0,04	24,18	0,39	39,89	<0,03125

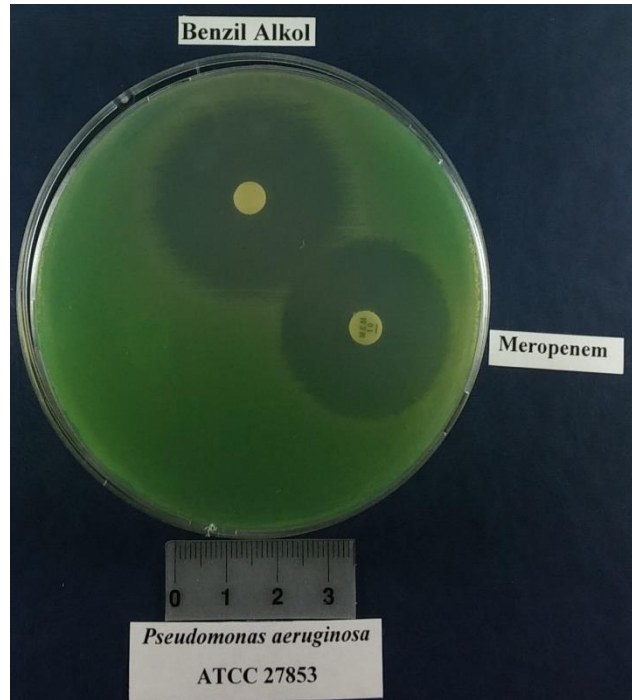
Tablo 17: Uçucu Yağların Antifungal Aktivite Sonuçları(İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

UÇUCU YAĞLAR								
MAYALAR	ITIR		PALMAROSA		ÇAY AĞACI		Amfoterisin B	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	26,57	0,09	27,72	0,04	21,770	0,39	13,06	0,25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	15,6	0,19	23,10	0,09	15,49	0,78	8,90	0,25
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	25,66	0,09	31,13	0,09	22,65	0,39	11,26	0,25
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	27,37	0,19	28,00	0,09	17,52	0,39	12,76	0,125
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 90018	20,91	0,19	31,09	0,04	17,175	0,19	13,22	0,03
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	23,32	0,09	38,73	0,04	15,14	0,19	15,10	0,03

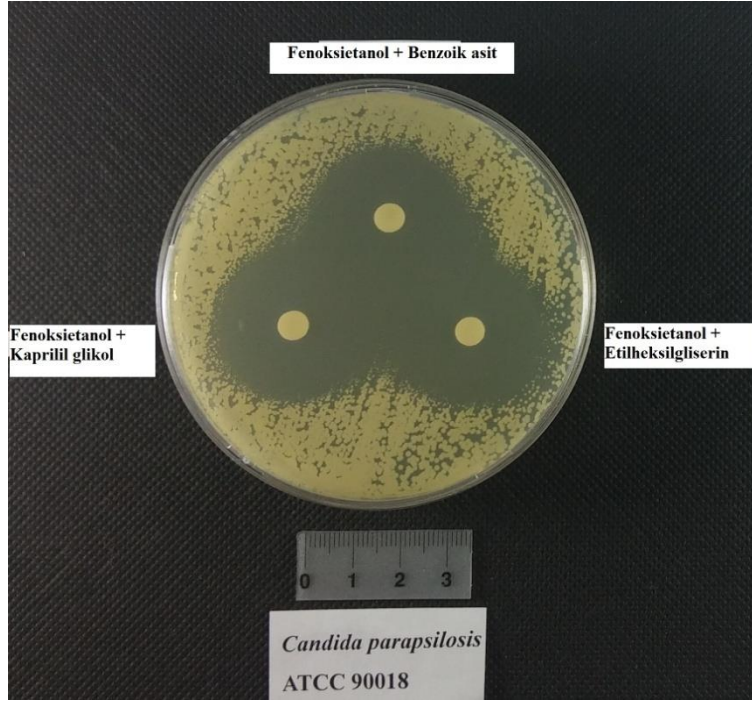
6.2. Koruyucuların Antimikrobiyel Aktivitesi

Koruyucuların antimikrobiyel aktivite testinde; benzil alkolün bakterilere (*Pseudomonas aeruginosa*, 35,26 mm/zon; MİK: %0,19) karşı en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiği bulunmuştur (Resim 4). Mayalara karşı ise fenoksietanol + benzoik asidin (*Candida parapsilosis*, 26,45 mm/zon; MİK: %0,02) ve fenoksietanol + kaprilil glikolün (*Candida parapsilosis*, 29,64 mm/zon; MİK: %0,09) en yüksek antifungal etki gösterdiği saptanmıştır (Resim 5).

Koruyucuların bakterilere ve mayalara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyel etki sonuçları Tablo18 ve Tablo 19’da gösterilmiştir.



Resim 4: Benzil alkolün *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı antibakteriyel aktivitesi



Resim 5: Fenoksietanol + benzoik asidin ve fenoksietanol + kaprilil glikolün *Candida parapsilosis*'e karşı antifungal aktivitesi

Tablo18:Koruyucuların Antibakteriyel Aktivite Sonuçları(İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

KORUYUCULAR								
BAKTERİLER	Fenoksietanol + Benzoik Asit		Fenoksietanol + Kaprilil glikol		Fenoksietanol + Etilheksilgliserin		Benzil Alkol	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	19,53	3,125	19,50	0,39	18,86	0,09	19,96	0,04
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	13,74	1,56	13,96	0,78	14,01	0,78	19,81	1,56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	18,38	0,19	17,87	0,19	17,47	0,19	20,71	0,09
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	23,59	0,19	23,86	0,19	23,94	0,19	27,47	0,09
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	25,61	1,56	28,00	0,19	27,22	0,19	35,26	0,19
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	18,99	0,09	17,77	0,19	18,02	0,19	21,78	0,19
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	24,60	0,09	22,73	0,19	21,14	0,39	22,32	0,19

Tablo19:Koruyucuların Antifungal Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

KORUYUCULAR								
MAYALAR	Fenoksietanol + Benzoik Asit		Fenoksietanol + Kaprillik glükol		Fenoksietanol + Etilheksilgliserin		Benzil Alkol	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	23,48	0,39	22,41	0,39	22,54	0,39	19,21	0,78
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	20,17	0,78	20,54	0,39	18,65	0,19	13,72	0,78
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	23,15	0,39	22,44	0,39	21,76	0,19	20,15	0,19
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	21,16	0,39	21,09	0,39	20,65	0,39	11,66	0,39
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	26,45	0,02	29,64	0,09	28,97	0,09	28,15	0,39
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	28,15	<0,02	28,20	0,19	27,26	0,04	26,46	0,09

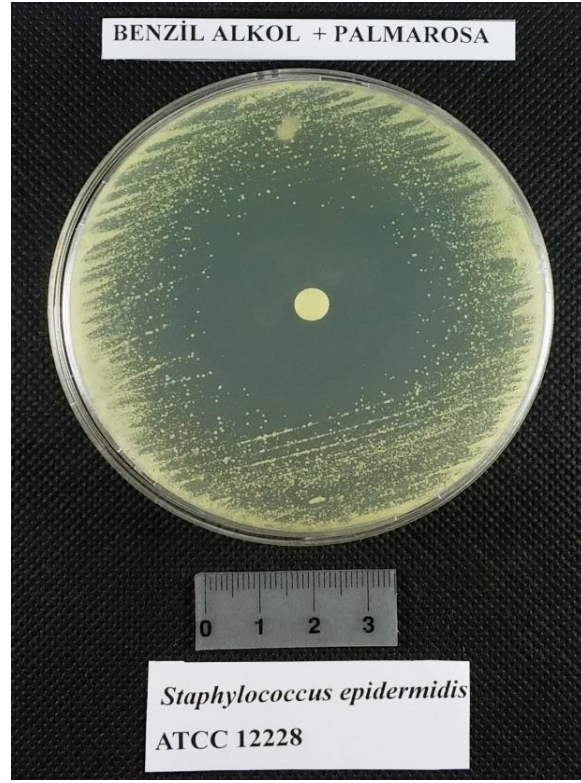
6.3. Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antimikrobiyel Aktivitesi

Çalışmamızın sonucunda; benzil alkol + ıtır (32,59 mm/zon; MİK: %0,04) ve benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun (33,46 mm/zon; MİK: %0,09) *Staphylococcus epidermidis*'e en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Resim6, Resim 7). En yüksek antifungal etkiyi ise benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun(36,00 mm/zon; MİK: %0,09) *Candida guilliermondii*'ye karşı gösterdiği saptanmıştır (Resim 8).

Uçucu yağlar ile koruyucuların kombinasyonlarının bakterilere ve mayalara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyel etki sonuçları Tablo20 ve Tablo 21'de gösterilmiştir.



Resim 6: Benzil alkol + ıtır kombinasyonunun *Staphylococcus epidermidis*'e karşı antibakteriyel aktivitesi



Resim 7: Benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun *Staphylococcus epidermidis*'e karşı antibakteriyel aktivitesi



Resim 8: Benzil alkol + palmarosa kombinasyonunun *Candida guilliermondii*'e karşı antifungal aktivitesi

Tablo 20:Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antibakteriyel Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Benzoik Asit + Itr		Fenoksietanol+ Benzoik Asit + Palmarosa		Fenoksietanol+ Benzoik Asit + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	19,40	0,39	17,91	0,39	20,10	0,19
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	13,96	0,19	15,63	0,78	13,85	0,19
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,06	0,09	30,06	0,19	21,64	0,09
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	21,63	0,39	21,77	0,39	25,22	0,19
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	25,13	0,39	24,15	0,39	25,19	0,39
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	20,94	0,78	19,83	0,78	18,16	0,39
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	21,90	0,39	20,71	0,39	22,48	0,19

Tablo 20: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antibakteriyel Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v) (Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + Itr		Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + Palmarosa		Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	19,56	0,19	17,84	0,39	21,65	0,19
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	14,57	0,19	16,30	0,39	14,84	0,09
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	29,35	0,09	28,70	0,19	23,14	0,09
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	23,59	0,39	21,58	0,39	26,30	0,19
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	24,16	0,19	24,99	0,19	26,28	0,19
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	19,96	0,78	18,55	0,78	18,40	0,19
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	21,27	0,39	21,28	0,19	22,62	0,19

Tablo 20: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antibakteriyel Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v) (Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + İtir		Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + Palmarosa		Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	19,46	0,39	18,99	0,39	15,98	0,19
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	14,60	0,19	15,60	0,39	13,55	0,09
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	28,47	0,09	28,85	0,09	20,25	0,04
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	21,47	0,39	22,55	0,39	26,58	0,19
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	25,45	0,19	24,66	0,19	25,30	0,19
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	18,27	0,78	17,30	0,39	18,86	0,19
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	17,39	0,19	17,93	0,39	19,66	0,19

Tablo 20: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antibakteriyel Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v) (Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Benzil alkol + İtır		Benzil alkol + Palmarosa		Benzil alkol + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	23,42	0,39	22,10	0,39	24,01	0,19
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	20,86	0,19	19,84	0,39	19,65	0,09
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32,59	0,04	33,46	0,09	19,59	0,04
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	15,00	0,39	16,19	0,39	17,00	0,19
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	30,06	0,39	30,01	0,39	31,60	0,39
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352	17,43	0,78	18,30	0,78	16,49	0,19
<i>S.thyphimurium</i> ATCC 14028	17,92	0,39	18,82	0,39	20,91	0,19

Tablo 21: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antifungal Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Benzoik Asit + İtir		Fenoksietanol+ Benzoik Asit + Palmarosa		Fenoksietanol+ Benzoik Asit + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	27,38	0,39	28,30	0,39	24,27	0,09
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16,89	0,78	22,44	0,39	14,38	0,19
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	27,00	0,78	26,66	0,39	26,75	0,09
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	25,82	0,39	27,73	0,39	17,62	0,09
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	26,67	0,19	30,73	0,39	25,78	0,09
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	30,42	0,19	32,58	0,19	23,17	0,09

Tablo 21: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antifungal Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)(Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + İtır		Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + Palmarosa		Fenoksietanol+ Kaprilil glikol + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	26,05	0,19	27,79	0,39	22,14	0,09
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	18,13	0,39	22,05	0,39	15,00	0,19
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	23,33	0,19	27,00	0,39	20,92	0,09
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	26,93	0,19	26,26	0,19	20,90	0,09
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	25,92	0,19	32,92	0,39	26,67	0,09
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	28,08	0,19	32,50	0,19	24,67	0,09

Tablo 21: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antifungal Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)(Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + Itr		Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + Palmarosa		Fenoksietanol+ Etilheksilgliserin + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	25,33	0,19	27,05	0,19	17,81	0,09
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16,14	0,19	18,28	0,39	13,78	0,19
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	21,66	0,19	25,66	0,19	20,5	0,09
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	23,48	0,19	28,66	0,19	18,50	0,09
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	26,58	0,19	29,50	0,19	25,58	0,09
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	28,01	0,09	30,40	0,09	22,27	0,19

Tablo 21: Uçucu Yağlar ile Koruyucu Kombinasyonlarının Antifungal Aktivite Sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm; MİK değerleri,%v/v)(Devamı)

KORUYUCU + YAĞ	Benzil alkol + İtır		Benzil alkol + Palmarosa		Benzil alkol + Çay Ağacı	
	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	28,02	0,19	28,64	0,19	18,95	0,39
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	17,53	0,19	18,36	0,19	13,23	0,39
<i>C.tropicalis</i> KUEN 1021	21,18	0,19	28,00	0,19	13,66	0,39
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	22,57	0,19	25,40	0,09	10,26	0,19
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	23,67	0,19	26,50	0,09	16,33	0,39
<i>C.guilliermondii</i> KUEN 998	29,67	0,19	36,00	0,09	20,17	0,19

6.4. Ames MPF Testi Sonuçları

Çalışmamızda TA 98, TA 100 olarak etiketlenen bir gecelik bakteri kültür tüplerinin ve negatif kontrol tüplerinin optik yoğunluğu (OD₆₀₀ değerleri); negatif kontrolün 0,014($\leq 0,05$) , TA98 için OD₆₀₀ değeri 2,36 ve TA100 için OD₆₀₀ değeri 2,45 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda; ıtır, çay ağacı ve palmarosa uçucu yağları ile fenoksietanol + benzoik asit, fenoksietanol + kaprilil glikol, fenoksietanol + etilheksilgliserin ve benzil alkol koruyucularının mutajenik etkileri Ames MPFTM testi ile 6 farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Çalışma her şuş için S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiş olup 3 farklı plağa ekim yapılmıştır ve ortalama değerler istatistik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, standart sapmaları ile birlikte ortalamaları alınarak student *t* testi ile pozitif ve negatif kontroller varlığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, ; ıtır, çay ağacı ve palmarosa uçucu yağları ile fenoksietanol + benzoik asit, fenoksietanol + kaprilil glikol, fenoksietanol + etilheksilgliserin ve benzil alkol koruyucularının TA 100 ve TA 98 suşlarına karşı S9 varlığında ve S9 yokluğunda mutajenik aktiviteye sahip olmadığı ($p \geq 0.05$) gösterilmiştir. İstatistiksel tablolar ile sonuçlar Şekil 15 - 42'de gösterilmiştir.

İtır, çay ağacı ve palmarosa uçucu yağları ile fenoksietanol + benzoik asit, fenoksietanol + kaprilil glikol, fenoksietanol + etilheksilgliserin ve benzil alkol koruyucularının S9 varlığında ve yokluğunda TA98 ve TA 100 suşları ile verdikleri revertant koloni sayıları Tablo 22- 49'da gösterilmiştir.

Tablo 22: İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	3	5	1
0,01	2	3	1
0,02	5	2	4
0,04	5	4	2
0,09	1	3	3
0,19	4	1	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 23: İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	1	4	3
0,01	2	3	1
0,02	4	5	2
0,04	5	4	2
0,09	3	4	1
0,19	3	6	4
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 24: İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	2	2	1
0,01	2	3	1
0,02	4	3	4
0,04	3	1	2
0,09	1	4	1
0,19	0	3	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 25: İtir Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	3	4	4
0,01	5	6	2
0,02	2	6	3
0,04	4	3	1
0,09	1	4	5
0,19	3	4	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 26: Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	2	3	2
0,01	2	4	3
0,02	4	4	4
0,04	5	2	1
0,09	1	3	3
0,19	2	4	5
Pozitif Kontrol	48	47	48

Tablo 27: Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	4	5	1
0,01	1	2	5
0,02	2	4	4
0,04	4	3	4
0,09	5	1	2
0,19	3	5	4
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 28:Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	3	2	2
0,01	1	1	3
0,02	0	4	4
0,04	2	4	2
0,09	2	2	3
0,19	3	0	1
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 29:Çay Ağacı Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	2	5	3
0,01	5	2	4
0,02	3	3	1
0,04	2	4	3
0,09	4	5	4
0,19	1	4	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 30: Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,0007	2	3	5
0,001	1	1	4
0,003	5	2	3
0,006	3	1	1
0,01	1	4	2
0,02	2	1	3
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 31:Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 Plâğına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,0007	1	5	4
0,001	3	2	3
0,003	2	3	4
0,006	4	2	2
0,01	3	5	5
0,02	1	2	4
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 32:Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA98+ S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,0007	1	4	2
0,001	1	3	4
0,003	3	2	1
0,006	2	2	1
0,01	1	2	3
0,02	3	1	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 33:Palmarosa Uçucu Yağının Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,0007	3	5	3
0,001	2	6	1
0,003	1	4	4
0,006	3	3	5
0,01	2	4	5
0,02	4	3	3
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 34: Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98
Plagina Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	5	1	2
0,01	1	1	3
0,02	4	1	5
0,04	2	2	1
0,09	4	1	2
0,19	3	6	4
Pozitif Kontrol	48	47	48

Tablo 35: Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100
Plagina Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	4	2	4
0,01	3	4	1
0,02	2	3	1
0,04	3	1	5
0,09	1	4	3
0,19	2	4	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 36: Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	3	6	4
0,01	3	1	3
0,02	2	2	4
0,04	5	2	5
0,09	6	2	4
0,19	3	5	1
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 37: Fenoksietanol + Benzoik Asit Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	4	5	2
0,01	1	2	1
0,02	3	4	5
0,04	2	3	2
0,09	4	1	3
0,19	2	4	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 38: Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98
Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	4	2	5
0,01	5	2	4
0,02	2	4	3
0,04	4	3	1
0,09	1	3	6
0,19	3	4	5
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 39: Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100
Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	2	3	4
0,01	3	1	2
0,02	1	3	1
0,04	3	2	3
0,09	2	1	4
0,19	4	3	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 40: Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98+ S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	2	6	3
0,01	4	5	2
0,02	4	6	5
0,04	1	2	2
0,09	3	5	4
0,19	4	2	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 41: Fenoksietanol + Kaprilil Glikol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,006	3	4	4
0,01	1	2	3
0,02	2	3	1
0,04	3	2	3
0,09	1	4	3
0,19	2	1	5
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 42: Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu
TA98 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL))	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	3	2	1
0,02	4	4	2
0,04	2	6	4
0,09	5	2	3
0,19	4	3	1
0,39	4	5	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 43: Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu
TA100 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	2	3	3
0,02	5	4	1
0,04	3	5	3
0,09	4	3	1
0,19	2	1	2
0,39	3	3	3
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 44: Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu
TA98+ S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	6	4	2
0,02	3	2	5
0,04	5	3	3
0,09	4	1	4
0,19	1	4	1
0,39	4	2	1
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 45: Fenoksietanol + Etilheksilgliserin Koruyucusunun Ames Testi Sonucu
TA100+ S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	4	5	4
0,02	1	5	2
0,04	4	2	3
0,09	3	3	5
0,19	2	1	4
0,39	3	3	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 46:Benzil Alkol KoruyucusununAmes Testi Sonucu TA98 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	4	3	3
0,02	1	5	4
0,04	4	2	3
0,09	3	2	1
0,19	5	4	2
0,39	4	2	1
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 47: Benzil Alkol KoruyucusununAmes Testi Sonucu TA100 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

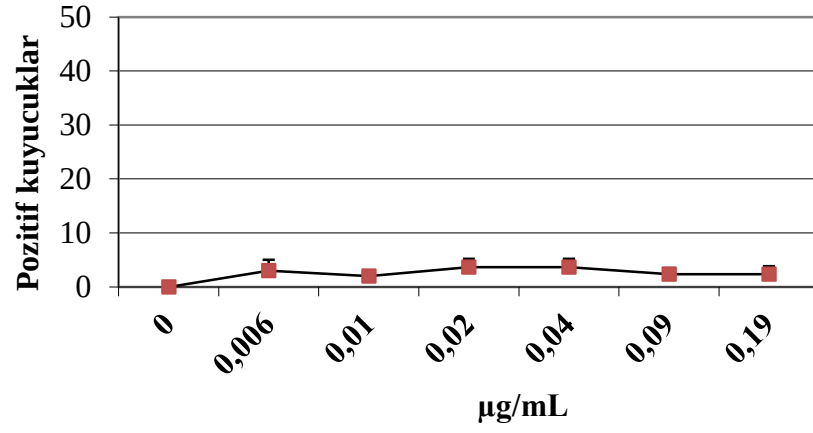
Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	3	2	4
0,02	2	4	4
0,04	1	5	5
0,09	4	4	2
0,19	1	2	3
0,39	3	3	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 48: Benzil Alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA98 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

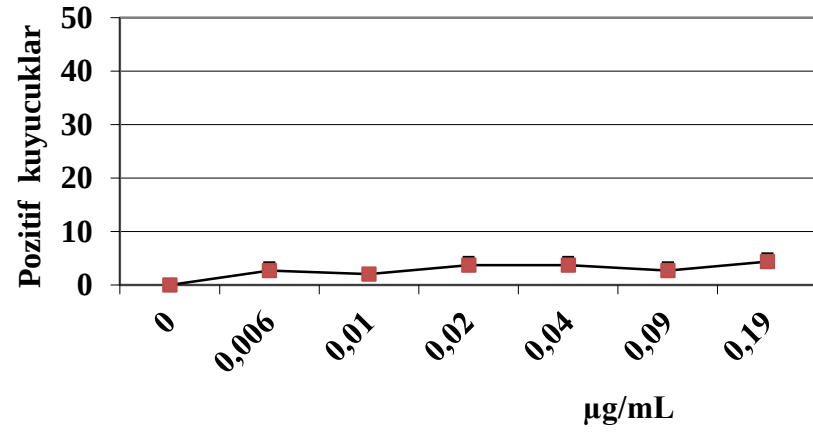
Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	3	2	4
0,02	2	4	5
0,04	3	1	4
0,09	4	1	2
0,19	2	3	5
0,39	3	1	2
Pozitif Kontrol	48	48	48

Tablo 49: Benzil Alkol Koruyucusunun Ames Testi Sonucu TA100 + S9 Plağına Ait Konsantrasyon Tablosu

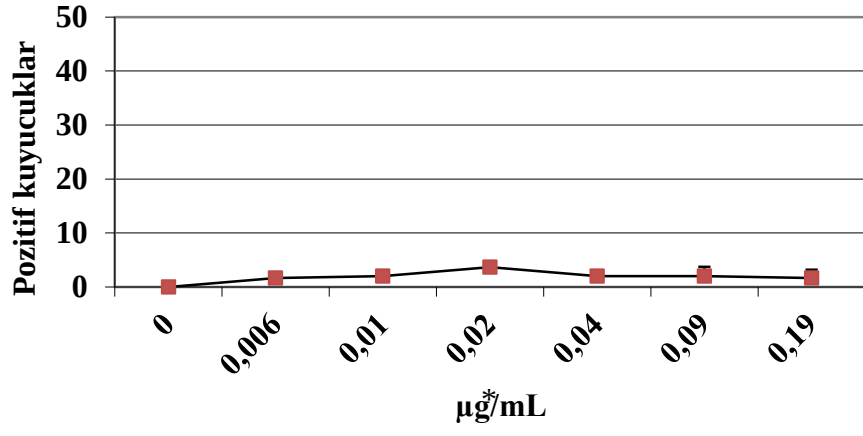
Konsantrasyon (µg/mL)	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
0,01	1	2	2
0,02	4	1	1
0,04	2	4	5
0,09	1	2	4
0,19	3	4	3
0,39	5	2	3
Pozitif Kontrol	48	48	48



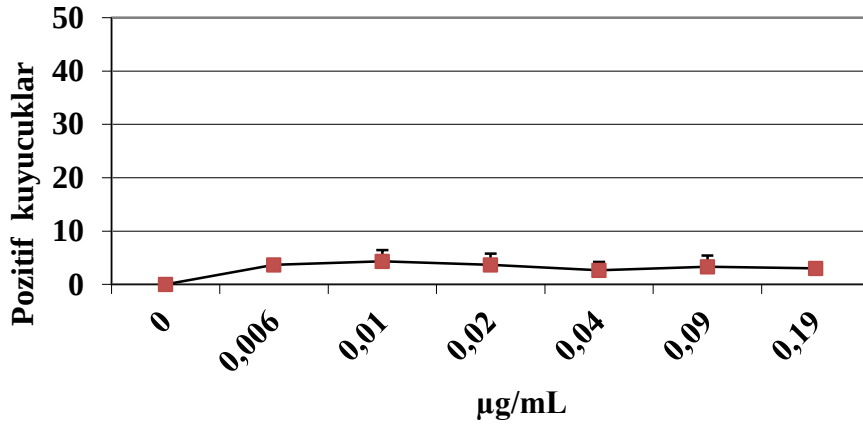
Şekil 15: İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği



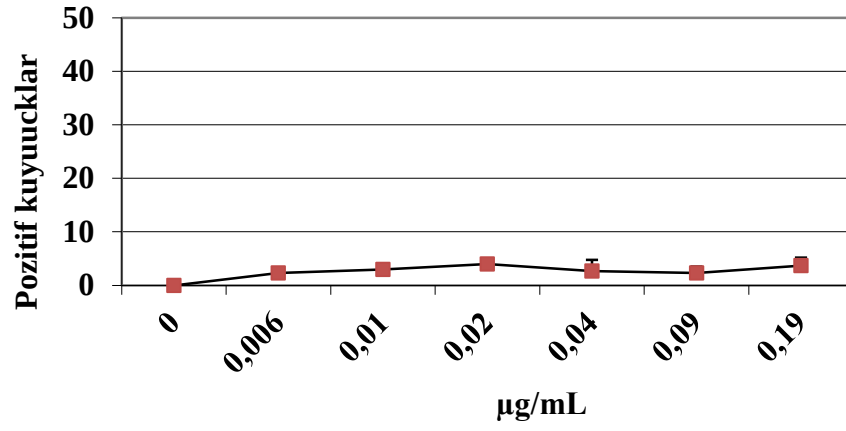
Şekil 16: İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği



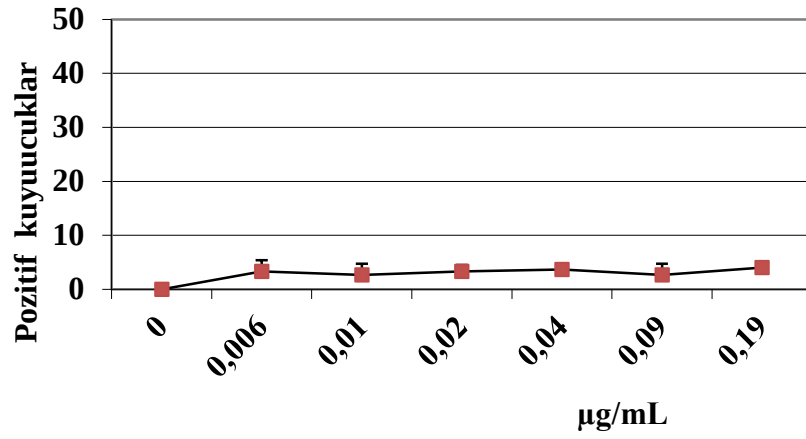
Şekil 17: İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



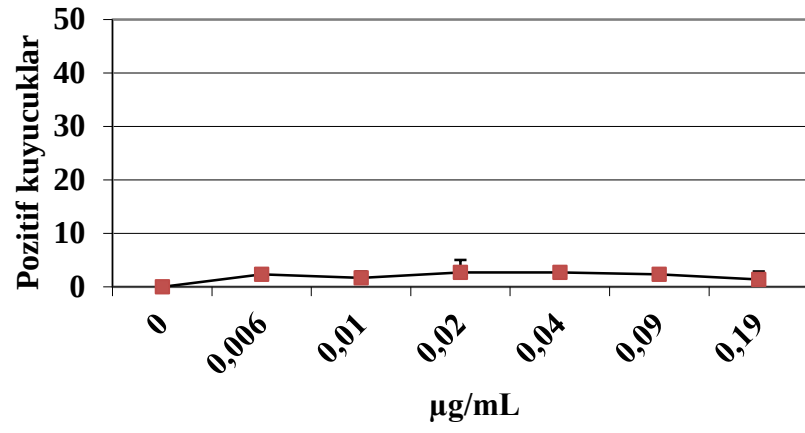
Şekil 18: İtir uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



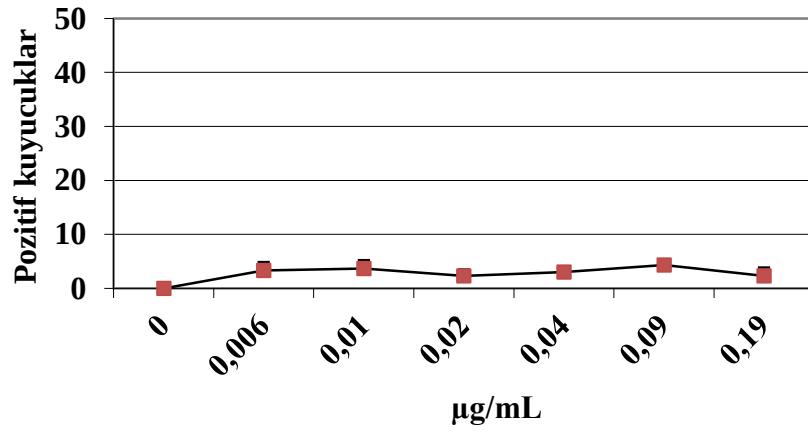
Şekil 19: Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği



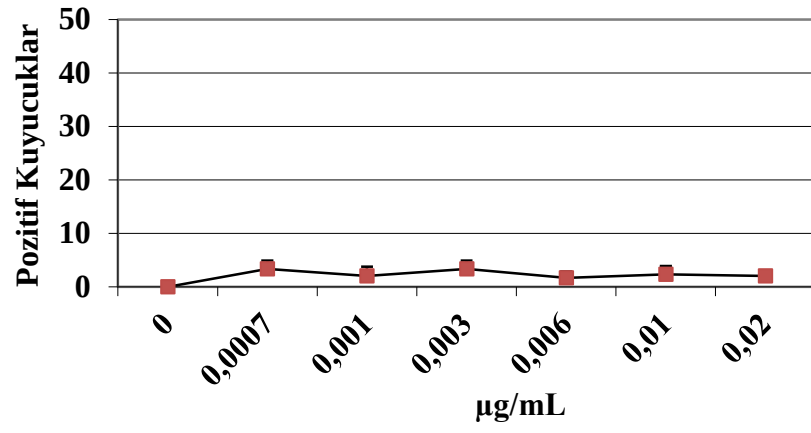
Şekil 20: Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği



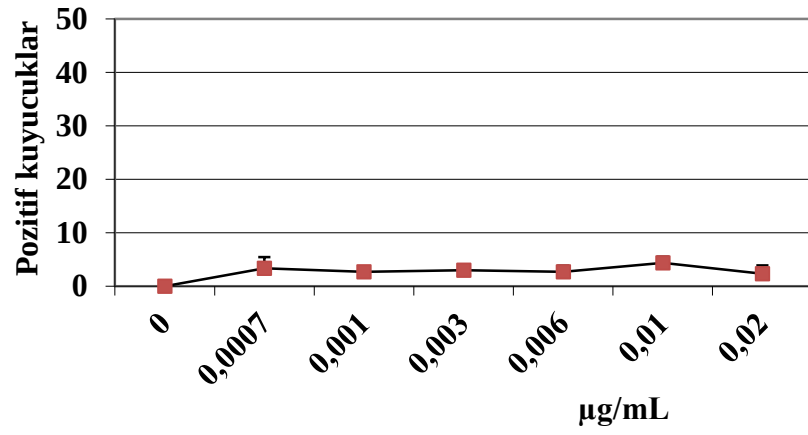
Şekil 21: Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



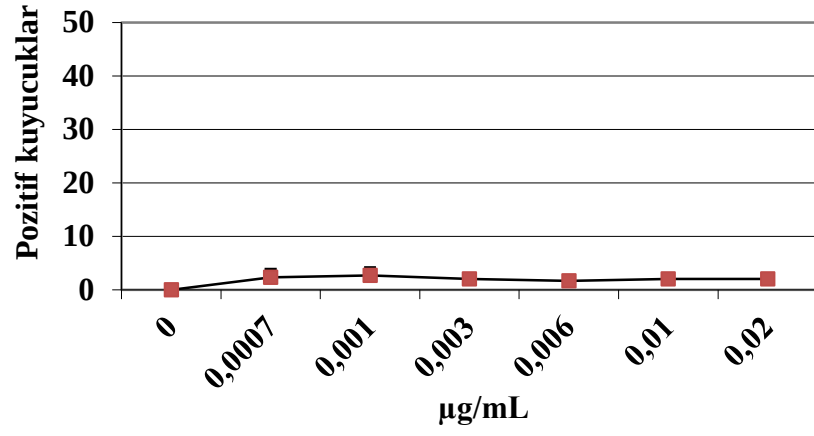
Şekil 22: Çay ağacı uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



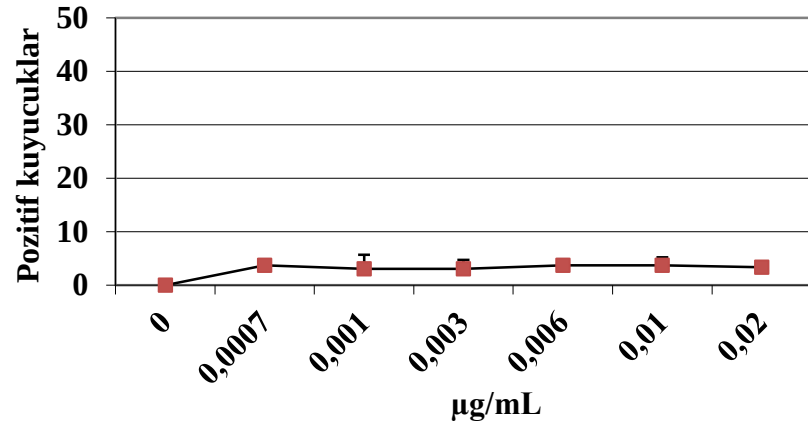
Şekil 23: Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 grafiği



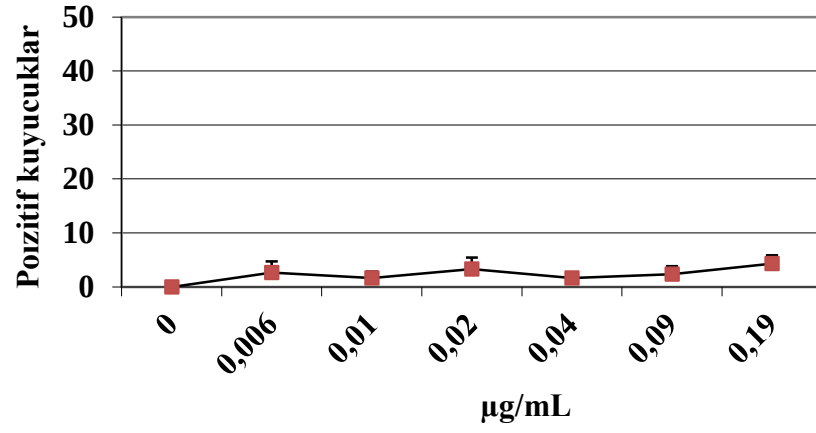
Şekil 24: Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 grafiği



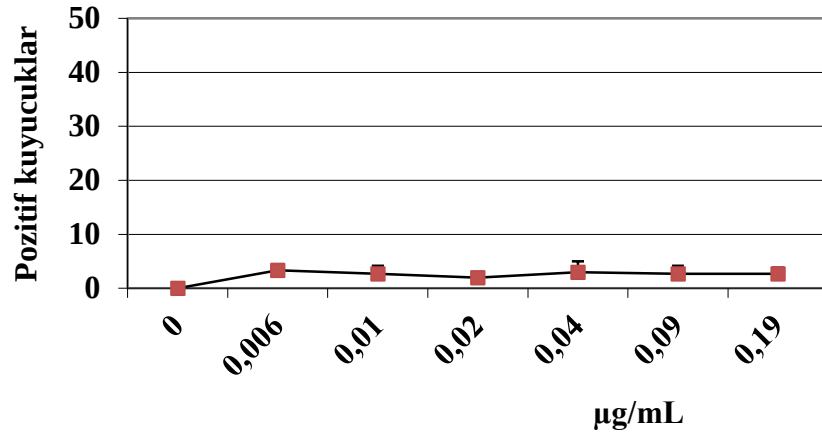
Şekil 25: Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



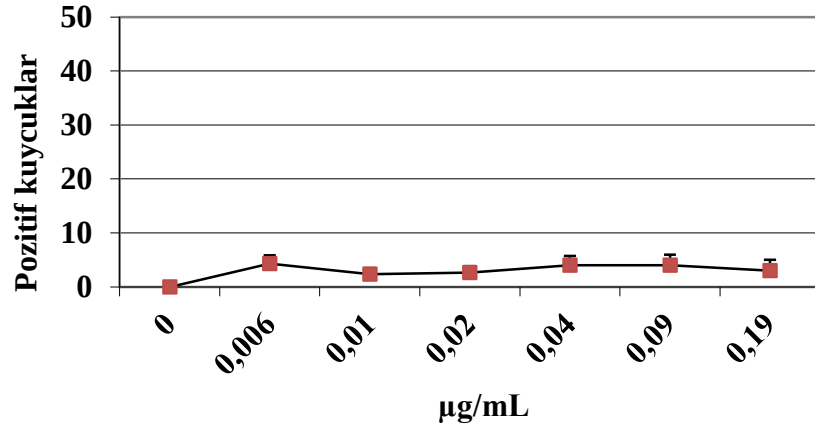
Şekil 26: Palmarosa uçucu yağının Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



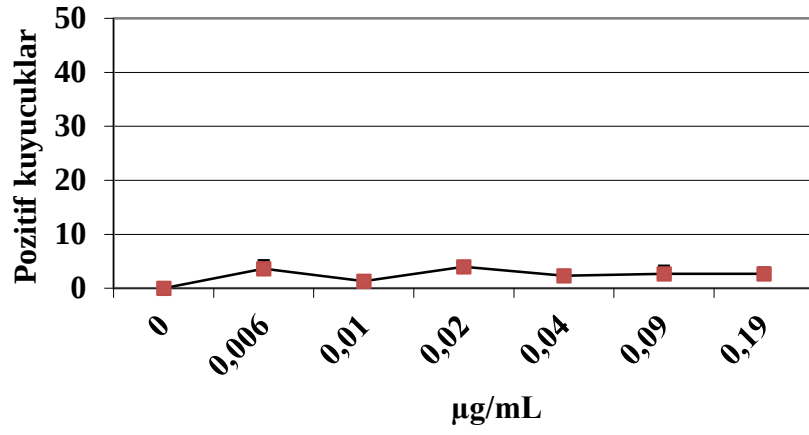
Şekil 27: Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği



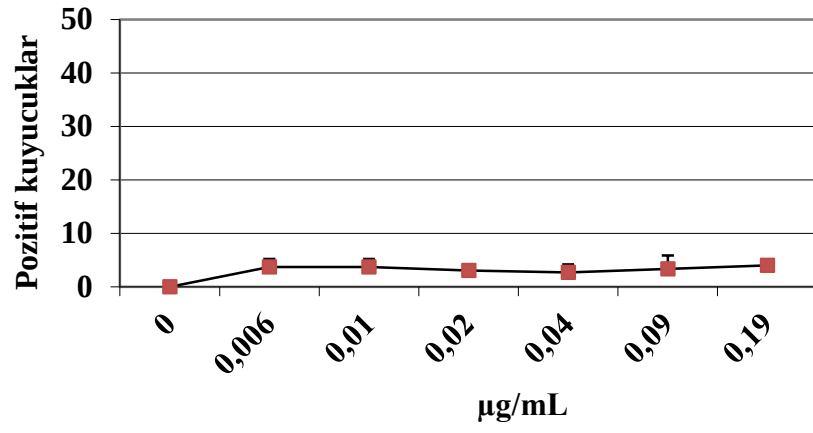
Şekil 28: Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği



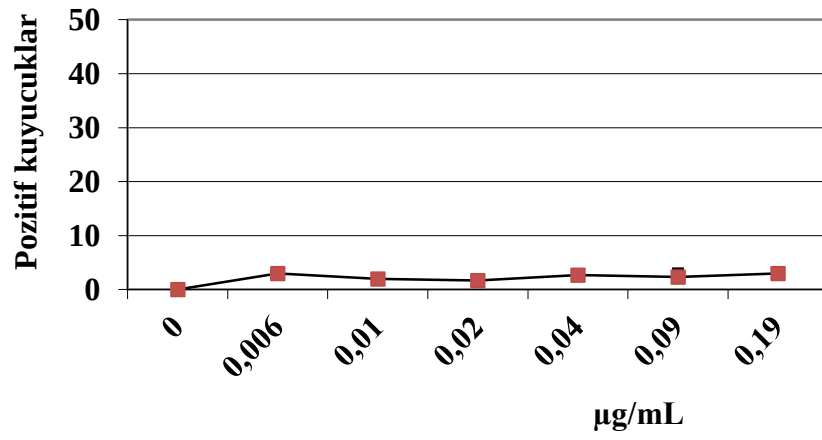
Şekil 29: Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



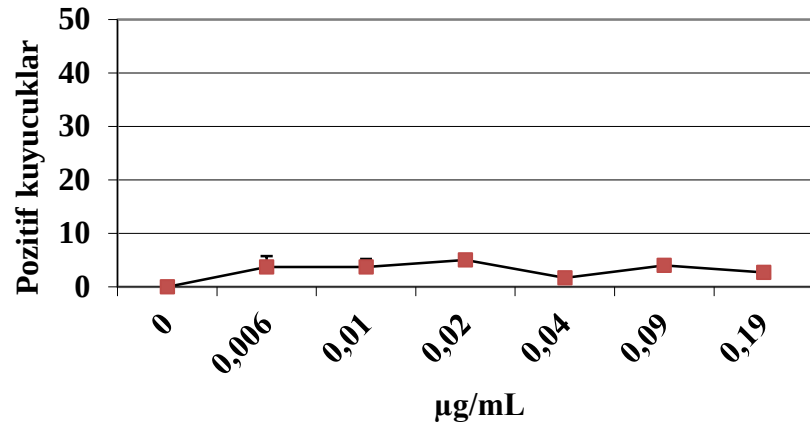
Şekil 30: Fenoksietanol + benzoik asit koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



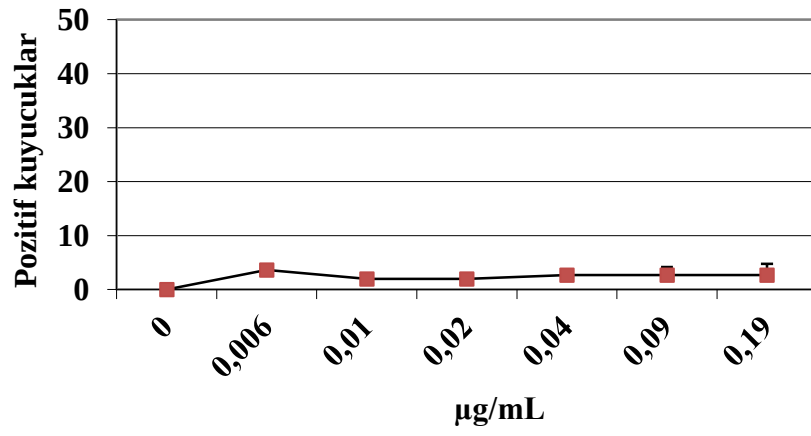
Şekil 31: Fenoksietanol + kaprilil glkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği



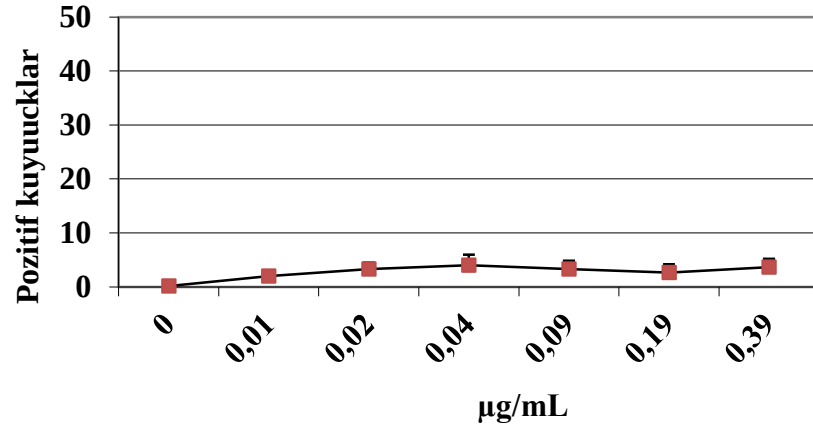
Şekil 32: Fenoksietanol + kaprilil glkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği



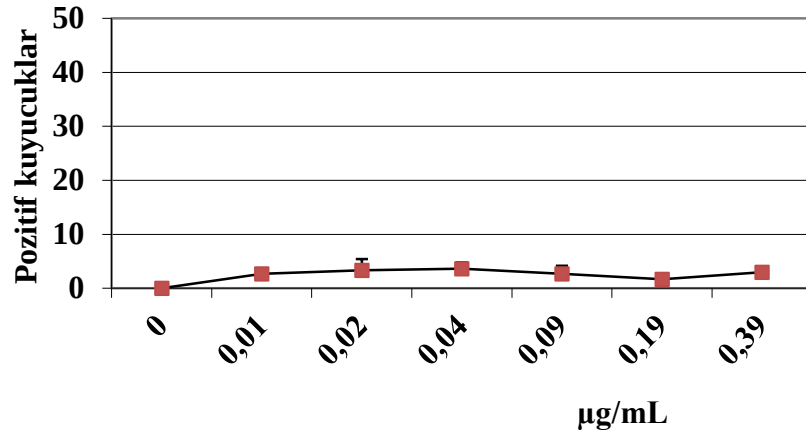
Şekil 33: Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



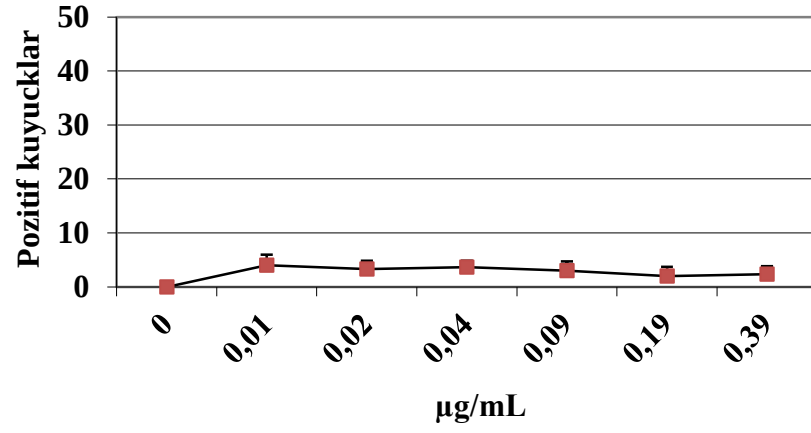
Şekil 34: Fenoksietanol + kaprilil glikol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



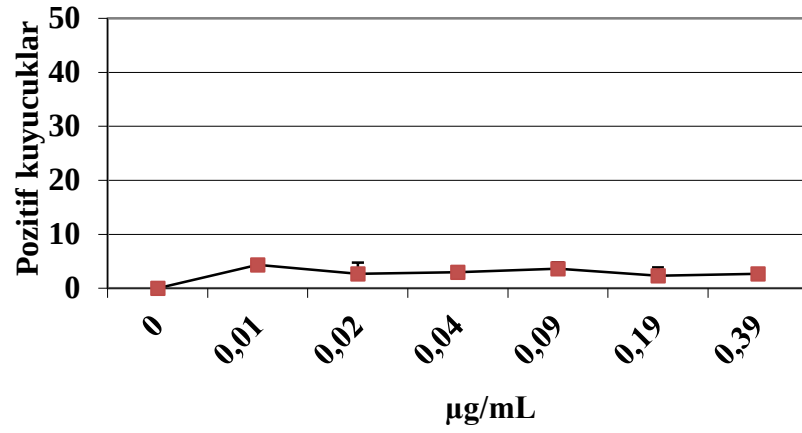
Şekil 35: Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği



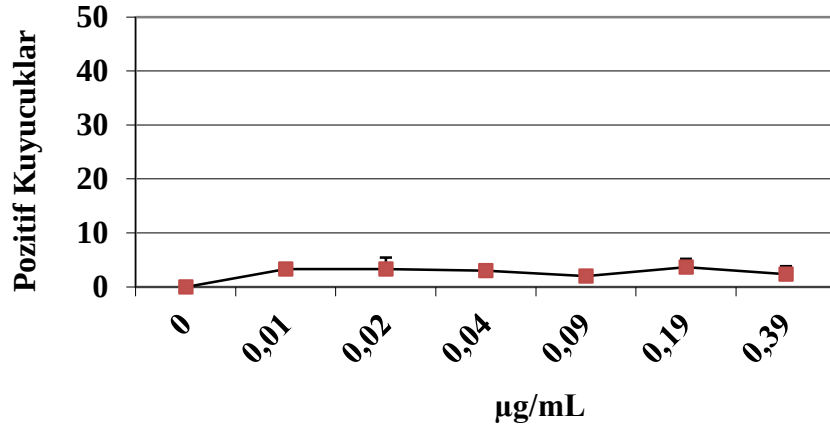
Şekil 36: Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği



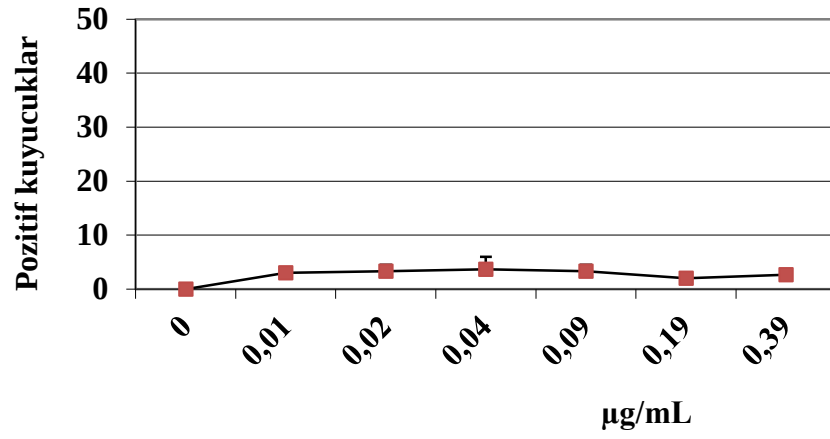
Şekil 37: Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



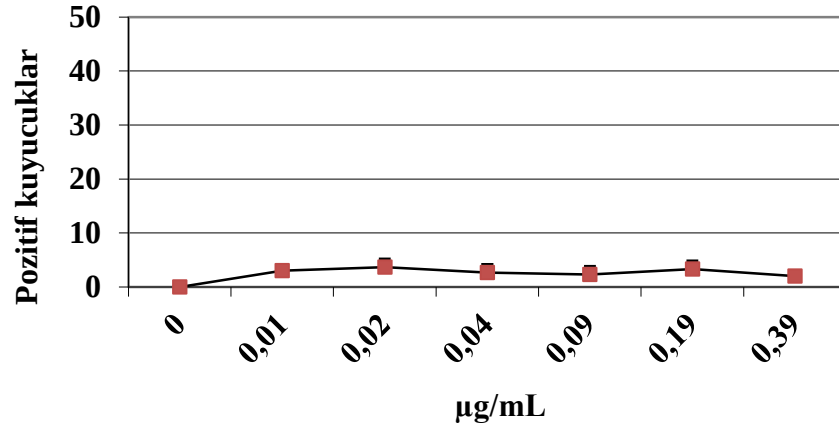
Şekil 38: Fenoksietanol + etilheksilgliserin koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği



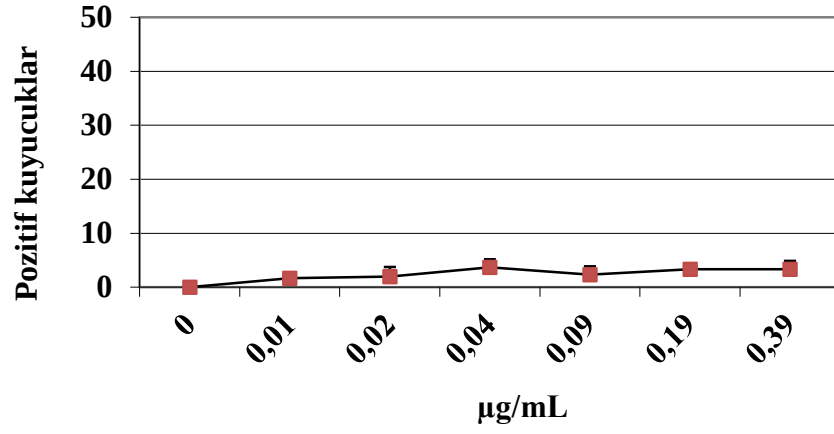
Şekil 39: Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 grafiği



Şekil 40: Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 grafiği



Şekil 41: Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA98 + S9 grafiği



Şekil 42: Benzil alkol koruyucusunun Ames Testi sonucu TA100 + S9 grafiği

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kozmetikler steril olması zorunlu olmayan ürünler olmasına rağmen, ürünün formuna uygun olacak şekilde içeriği limitler ile sınırlandırılmıştır (Onurdağ ve ark.,2010). Fakat ürün içeriğinde yer alan organik materyaller nedeni ile bu maddelerin döngüsünden ve çürümesinden sorumlu mikroorganizmalar olan bakteriler, mayalar ve küfler tarafından kozmetik ürünlerde kontaminasyon meydana gelebilmektedir (Sasseville,2004).

Kozmetik ürünlerde mikroorganizma kontaminasyonu hem ürünün bozulmasına neden olmakta hemde kontaminasyon patojen bir mikroorganizma tarafından meydana geliyor ise dünya çapındaki tüketicilerde ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Campana ve ark.,2006). Bu anlamda kozmetik ürünlere koruyucu madde ilavesi yapılmaktadır. Koruyucular kozmetik ürünlerin yapısına iki nedenden dolayı ilave edilmektedirler. Bunlardan birincisi; üretim işlemleri sırasında ve ürünün tüketici tarafından kullanılırken kontaminasyonunu önlemek, dolayısı ile ürünün raf ömrünü arttırmak; ikincisi ise tüketicileri potansiyel infeksiyonlardan korumaktır (Varvaresou,2009).

Ürünlere ilave edilen koruyucular sadece Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı değil, aynı zamanda da ökaryotik mantarlara karşı da etkili olmalıdırlar. Formülasyonda yer alacak olan koruyucunun seçimi genel olarak bir endişe durumu oluşturmaktadır. Çünkü ökaryotik mantarların oluşumunun engellenmesi için ilave edilen bileşiklerin insanlarda aşırı duyarlılık veya toksik reaksiyon oluşturma potansiyellerinin prokaryotik bakterilerin oluşumunu önlemek için ilave edilen bileşiklerden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu neden ile koruyucu bileşikler genellikle ürün formülasyonunun %1'den daha az konsantrasyonda olacak şekilde çok düşük seviyelerde kullanılmakta olup *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Serratia* spp., *Aspergillus niger* gibi spesifik mikroorganizmaları hedef almaktadırlar (Ravita ve ark., 2009).

Bunun yanında yapılan çalışmalar ile koruyucuların kombine halde kullanımlarının, tek başına kullanımlarına göre daha düşük konsantrasyonda daha yüksek etki gösterdiklerini ve olası alerjenik etkilerinin de azaldığını göstermektedir.

Lundov ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada; metilizotiazolinon, metilkloroizotiazolinon / metilizotiazolinon, diazolidinil üre ve fenoksietanolün tekli hallerinin ve ikili, üçlü koruyucu olacak şekilde kombine hallerinin antimikrobiyel etkilerini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda farklı koruyucu kombinasyonlarının, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyel etkiyi arttırıcı bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Lundov ve ark.,2011).

Yapılan başka bir kombinasyon çalışmasında, etilheksilgliserinin sinerjistik etki göstererek fenoksietanol, metilizotiazolinon ve metilparaben gibi koruyucuların aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (English,2006; Leschke,2006).

Kimyasal koruyucular mikrobiyel kontaminasyonu önlemelerine rağmen tüketicilerin büyük bir çoğunluğu açısından güvenilirlikleri sorgulanır bir hale gelmiştir. Pek çok koruyucuya ait alerjik reaksiyonların raporlanması ve olası toksik etkileri tüketicileri bitkisel içerikli ürünlerin kullanımına yönlendirmiştir. Bu formülasyonlarda çok fonksiyonlu antimikrobiyel içerikler ve bitkilerden izole edilen esansiyel yağlar ile ekstratlar, alternatif veya doğal koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır (Varvaresou,2009; Vyas,2013).

Esansiyel yağlar bitkilerden hidrodistilasyon, buhar distilasyonu veya sıkma (bitki kabuklarından) yolu ile elde edilen uçucu sekonder metabolitlerin doğal kompleks bir karışımıdır. Aromatik ve medikal bitkilerin koku verici özellikleri ve biyolojik özellikleri esansiyel yağların yapısında bulunan monoterpenler ve seskiterpenlerden kaynaklanmaktadır (Kalemba ve Kunicka, 2003). Literatürde esansiyel yağların antibakteriyel, antifungal, antiviral, insektisidal ve antioksidan özellikleri olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Prabuseenivasan,2006).

Carson ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'un mikrodilüsyon yöntemi ile çay ağacı esansiyel yağına olan

duyarlılıklarına baktıkları çalışmada, çay ağacı yağının *S.aureus* için MIC₉₀ değerini %0,50 iken *E.coli* için %0,25 olduğunu belirtmişlerdir (Carson ve ark., 1994).

Schelz ve arkadaşlarının, içlerinde çay ağacı ve ıtır esansiyel yağlarının da olduğu 10 esansiyel yağın antimikrobiyel ve antiplasmid etkilerini araştırdıkları çalışmada her bir yağın antimikrobiyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Schelz ve ark., 2006).

Bigos ve arkadaşlarının, disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile ıtır esansiyel yağının *Staphylococcus aureus*'un klinik suşları üzerine antimikrobiyel aktivitelerini araştırdıkları çalışmada, ıtır yağının; Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B pozitif, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve çoklu ilaç direnci gösteren suşları içeren tüm *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı 0,25-2,0µL/mL MİK değerleri arasında güçlü bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Bigos ve ark.,2012).

Duarte ve arkadaşlarının, *Escherichia coli* üzerine genellikle Brezilya'da kullanılan medikal bitkilerden elde edilen esansiyel yağların etkisini araştırdıkları çalışmada, palmarosa esansiyel yağının 100-500 µg/mL MİK değerleri arasında geniş bir inhibasyon etkisi oluşturduğunu göstermişlerdir (Duarte, 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile kozmetik ürünler içerisine ilave edilen içeriklerin olası karsinojenik ve toksik etkileride önem kazanmıştır. Bu neden ile farmasötik ve kozmetik endüstrisinde kullanılan kimyasalların genotoksik etkisini araştırmada geleneksel Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile en güvenilir ve standart verilerin elde edilmesi nedeni ile bu test sistemi oldukça fazla kullanılmaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Soni ve arkadaşlarının, 2005 yılında yayınladıkları derlemede *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA1535 ve TA1537suşlarını kullanarak geçmiş yıllarda yapılmış olan Ames testi ile metil ve propil parabenin her ikisinin de mutajenik etkilerinin olmadığını göstermişlerdir (Soni ve ark.,2005).

Potasyum sorbat ve sobik asitin *S. typhimurium* suşları kullanılarak yapılan Ames testi ile mutajenik bir aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir (Elder,1988)

Formaldehit salan koruyucular sınıfında yer alan diazolidinil üre ile yapılan Ames testi'nde, koruyucunun TA98, TA 100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları üzerine mutajenik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Liebert,1990).

Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 ve TA100 suşlarına karşı gerçekleştirilen Ames deneyi ve *Escherichia coli* DNA-polimeraz eksikliği deneyi ile fenetil alkolün mutajenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Brandt,1990).

Fenoksietanolün metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100,TA1535 ve TA1537 suşlarına karşı mutajenik etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Scognamiglio, 2012; Poudrier,1990).

Benzoik asit, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100,TA1535, TA1537 ve TA 1538 suşlarını içeren pek çok Ames testinde non-mutajenik bulunmuştur (Becker ve ark, 2012; Kubo ve ark.2002; Zeiger ve ark. 1988; Ishidate ve ark.1984; McCann ve ark.,1975).

İpek ve arkadaşlarının İzmir kekiği'nin uçucu yağının Ames Salmonella/microsome testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarını kullanarak genotoksik ve antigenotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda İzmir kekiği'nin uçucu yağının mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir.(İpek ve ark.,2005)

Al-Bataina ve arkadaşlarının doğu'ya özgü baharat olarak kullanılan anason, çörek otu ve Sicilya sumacı gibi pek çok bitkinin uçucu yağının genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmada, uçucu yağların *Salmonella typhimurium*'un TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarına karşı mutajenik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. (Al-Bataina ve ark.,2003)

Evandri ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA suşları ile *Lavandula angustifolia* (lavanta) yağının mutajenik ve antimutajenik etkileri araştırılmış ve herhangi bir mutajenik etkisinin olmadığı, ancak güçlü bir antimutajenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Evandri ve ark., 2005)

Özkan ve arkadaşlarının , Erzurum’da yetişen, *Ferula orientalis* (Çakşır otu) bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden izole ettikleri esansiyel yağın mutajenitesini araştırdıkları çalışmada, esansiyel yağın *Salmonella typhimurium* TA1535 and TA1537 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA suşlarına karşı mutajenik etkisinin olmadığı görülmüştür (Özkan ve ark.,2014).

Martino ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, *Lamiaceae* familyasının üyesi olan *Melissa officinalis* L. (*Melisa*, oğulotu), *Ocimum basilicum* L. (*fesleğen*), *Hyssopus officinalis* L. (*çördük* otu), *Lavandula angustifolia* Mill. (*lavanta*), *Origanum vulgare* L. (*mercankösk*), *Salvia officinalis* L. (*adaçayı*) ve *Thymus vulgaris* L. (*kekik*) uçucu yağlarının *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Martino ve ark.,2009).

Kimyasalların hem mutajenik hem de antimutajenik etkilerinin araştırılmasında verimli bir şekilde kullanılan geleneksel Ames testinin oldukça fazla iş gücü, zaman ve alet kullanımına neden olması, araştırmacıların alternatif test sistemleri için bir arayış içerisine girmelerini gerekli kılmıştır (Sghaiera ve ark., 2010).

Bu amaç doğrultusunda geliştirilen Ames testinin sıvı plak modifikasyonu olan Ames MPF mutajenite testi hem yüksek hızda renkli ölçüm özelliği ile çalışma kolaylığı sağlamakta hemde yapılan birçok çalışma ile geleneksel Ames testi ile olan uyumluluğu kanıtlanmış olmaktadır.

Kamber ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Ames II testi, geleneksel Ames testi ile mutajenik yanıtları bakımından karşılaştırılmalı olarak çalışılmış ve her iki çalışma sonucunda da %84 uyumluluk olduğu gösterilmiştir (Kamber ve ark., 2009). Gervais ve arkadaşlarının geleneksel Ames tekniği ile Ames II testini karşılaştırdıkları çalışmada da 42 bileşikte, %83 uyumluluk görüldüğünü bildirmişlerdir (Gervais ve ark., 2003).

Umbuzeiro ve arkadaşları yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise Ames MPF testi ile geleneksel Ames testini çevresel kimyasalların mutajenik aktivitelerini araştırmak amacı ile karşılaştırmışlardır. Her iki teknikten de elde edilen verilerin uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Ames MPF testinin var olan mikrosüspansiyon testlerine göre daha fazla miktarda örneğin daha kolay bir şekilde

alışmasına imkan sağlaması açısından daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Umbuzeiro ve ark., 2010).

Literatürde yağların ve koruyucuların antimikrobiyel aktivitesini ve mutajenitesini gösteren pek çok çalışma olmasına rağmen, koruyucu ve yağ kombinasyonlarına ait nihai verilerde eksiklikler bulunmaktadır.

Fenoksietanol, benzoik asit, benzil alkol ve yeni nesil koruyucu olarak etihexsilgliserin ile kaprilil glikolün; ıtır, çay ağacı ve palmarosa uçucu yağları ile kombinasyonlarının mutajenik etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bu neden ile çalışmamızda, ıtır, çay ağacı ve palmarosa uçucu yağları ile fenoksietanol + benzoik asit, fenoksietanol + kaprilil glikol, fenoksietanol + etihexsilgliserin ve benzil alkol koruyucularının hem tekli hallerinin hemde kombinasyonlarının antimikrobiyel aktivitesi ve tekli hallerinin ise mutajenitesi araştırılmıştır.

Çalışmamızda;

1-Uçucu yağlar koruyucular ile kombine edildiğinde; koruyucuların mikroorganizmalara karşı olan tek başına etkilerine göre, uçucu yağların koruyucuların antimikrobiyel etkisini arttırdığı saptanmıştır.

2- Uçucu yağların ve koruyucuların TA 100 ve TA 98 suşlarına karşı S9 varlığında ve S9 yokluğunda mutajenik aktiviteye sahip olmadığı ($p \geq 0.05$) gösterilmiştir.

Son yıllarda sentetik katkı maddelerinin potansiyel tehlikeleri nedeniyle tüketicilerin doğal bileşenlere olan artan talebi doğrultusunda uçucu yağların kozmetik endüstrisinde kullanımı artmış bulunmaktadır. Literatürlerde kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucular ile uçucu yağlar gibi doğal maddelerin antimikrobiyel ve antimutajenik aktivitelerini gösteren çalışmaların sayısı oldukça azdır.

Sonuç olarak; doğal katkı maddelerinin kozmetik ürünlerinde kullanımının her geçen gün artan öneminden dolayı çalışmamızın, uçucu yağların antibakteriyel, antifungal ve antimutajenik aktiviteleriyle ilgili yapılacak başka çalışmalara kaynak oluşturabileceği görüşüne varılmıştır.

8.KAYNAKLAR

Abdelaziz AA, Alkofahi A. Microbiological profile of selected samples of "Al-Kohl" eye cosmetics in northern Jordanian provinces before and after use. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*. 1989;187(3):244-253.

Abdelaziz AA, Ashour MSE, Hefni H, El-Tayeb OM. Microbiol contamination of cosmetics and personal care items in Egypt body lotions and talcum powders. *J Clin Pharm Therap*.1989;14(3): 207-212.

Abdelaziz AA, Ashour MSE, Hefni H, El-Tayeb OM. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt—shaving creams and shampoos. *J Clin Pharm Ther*. 1989;14(1):29-34.

Abdelaziz AA, Ashour MSE, Hefni H, El-Tayeb OM. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt-eye shadows, mascaras and face creams. *J Clin Pharm Ther*.1989;14(1): 21-28.

Aburjai T, Natsheh F M. Plants used in cosmetics. *Phytother Res*. 2003;17(9): 987-1000.

Ames MPF™ 98/100, Instructions for Use, Version 4.5_S, Xenometrix, 2012.

Al-Bataina, Ba., Maslat, Ao., And Al-Kofahıl, Mm. Element Analysis And Biological Studies On Ten Oriental Spices Using Xrf And Ames Test. *J. Trace Elem, Med. Biol.*, 2003;17(2):85-90.

Anelichm LE, Korsten L. Survey of micro-organisms associated with spoilage of cosmetic creams manufactured in South Africa. *Int J Cosmet Sci*.1996;18(1): 25-40.

Ashour MSE, Abdelaziz AA, El-Tayeb OM. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt. I. Contamination of toothpastes. *J Soc Cosmet Chem*.1987; 38: 435-441.

Baird MR, Shooter RA. *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with use of contaminated medicaments. *Br Med J*.1976 (2): 349-350.

Baird RM. Contamination of non-sterile pharmaceuticals in hospital and community environments. In: Hugo WB, Russell AD, eds. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd;1998, p:374-385.

Baird RM. Microbial spoilage, infection risk and contamination control. In: Denyer SP, Hodges AN, Gorman SP, eds. *Hugo's and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. UK: Blackwell Publishing Company; 2004, p:263-284.

Bayaz M. Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyel, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*.2014;12(3):45-53.

Becker LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Shank RC, Slaga TJ, Synder PW, Andersen FA. Safety Assessment of Alkyl Benzoates as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*. 2012; 31(Suppl 6): 342-372.

Behravan J, Bazzaz F, Malaekheh P. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). *Int J Dermatol*. 2005;44(6): 482-485.

Beveridge EG. Microbial spoilage and preservation of pharmaceutical products. In: Hugo WB, Russell AD, eds. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd;1998,p:355-373.

Biebl KA, Warshaw EM. Allergic Contact Dermatitis to Cosmetics, *Dermatol Clin*. 2006; 24 (2) :215 – 232.

Bigos M, Wasiela M, Kalembe D, Sienkiewicz M. Antimicrobial activity of geranium oil against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2012; 17(9):10276-10291.

Bloomfield SF. Microbial contamination: spoilage and hazard. In: Denyer S, Baird R, eds. The Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices. 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2007, p:23-50.

Boukhris M, Simmonds MS, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phytother Res*. 2013;27(8): 1206-1213.

Branan DK. Biology of microbes. In: Geis PA, eds. *Cosmetic Microbiology, A practical approach*. 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006, p:19-69.

Brandt K. Final report on the safety assessment of phenethyl alcohol. *J Am Coll Toxicol*. 1990;9(2): 165-183.

Burnett CL, Bergfeld W, Belsito DV, Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Final report of the safety assessment of methylisothiazolinone. *Int J Toxicol*. 2010;29(Suppl 4): 187-213.

Campana R, Scesa C, Patrone V, Vittoria E, Baffone W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Lett Appl Microbiol*. 2006; 43(3): 301-306.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*. 1994; 82(332):181-185.

Ceylan E, Fung DY. Antimicrobial activity of spices 1. *J Rapid Meth Aut Mic*. 2004;12(1): 1-55.

Chang MW, Nakrani R. Six children with allergic contact dermatitis to methylisothiazolinone in wet wipes (baby wipes). *Pediatrics*. 2014;133(2): 434-438

.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, CLSI document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2012).

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition, CLSI document M02-A11, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA (2012)

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Yeasts; Approved standard-Second edition, CLSI Document M27-A2, Wayne, PA(2008).

Connor TH, Tee PG, Afshar M, Connor KM. Mutagenicity of cosmetic products containing Kathon®. Environ Mol Mutagen. 1996;28(2): 127-132.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000;88(1): 170 -175.

Cronin H, Draelos ZD. Original Contribution: Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. J Cosmet Dermatol. 2010;9(3): 218-225.

Curry JC, Brannan DK, Geis PA. History of cosmetic microbiology. In: Geis PA, eds. Cosmetic Microbiology, A practical approach. 2nd ed. New York: Talor&Francis Group; 2006, p: 3-17.

Çevikbaş A, Derici K, Uğurlu T. Farmasötik endüstrisinde mikrobiyal kontaminasyon. İçinde: Abbasoğlu U, Çevikbaş A,ed. Farmasötik Mikrobiyoloji.1 Basım. Ankara: Efil Yayın evi; 2011,p: 393- 418.

Çomoğlu T.Kozmetikler. Marmara Pharmaceutical Journal. 2012;16: 1-8.

Darbre PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20 (1): 121-143.

Darbre PD. Under arm cosmetic sand breast cancer. *J Appl Toxicol.* 2003; 23: 89-95.

Denyer S, Russell AD. Non-antibiotic antibacterial agents: mode of action and resistance. In: Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, eds. *Hugo's and Russell's Pharmaceutical Microbiology.* 7th ed. UK: Blackwell Publishing company;2004, p:306-323.

Denyer SP. Antimicrobial preservatives and their properties. In: Denyer SP, Baird RM, eds. *The Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices.* 2nd ed. Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group; 2007,p:324-344.

Doorne VH. Preservative stability and efficacy: formulation influences.In: Denyer SP, Baird RM, ed. *The Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices.* 2nd ed. Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group; 2007,p:349-36.

Dreger M, Wielgus K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Pol.* 2013;59(4): 142-156.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol.* 2007;111(2): 197-201.

Elder RL. Final report on the safety assessment of sorbic acid and potassium sorbate. *J Am Coll Toxicol.* 1988;7 6: 837-880.

English JD. Factors in selecting and testing preservatives in product formulations. In: Orth DS, Kabara JJ, Denyer SP, Tan SK, eds. *Cosmetic and Drug Microbiology*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group;2006,p:57-101.

Ergin A, Arikan S. Comparison of microdilution and disc diffusion methods in assessing the in vitro activity of fluconazole and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against vaginal *Candida* isolates. *J Chemother*. 2002;14(5): 465-472.

Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C. Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti, G.,. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*.2005;43(9): 1381-1387.

Evren M, Tekgüler B. Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*.2011;9(3): 28-40.

Fall S, Bruze M, Isaksson M, Liden C, Matura M, Stenberg B, Lindberg M. Contact allergy trends in Sweden—a retrospective comparison of patch test data from 1992, 2000, and 2009. *Contact Dermatitis*. 2015;72(5): 297-304.

Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2013;6(2): 233-265.

Flores M, Morillo M, Crespo ML. Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms. *Int Biodeter Biodegr*.1997;40(2): 157-160.

Galentine PG, Cohen EJ, Laibson PR, Adams CP, Michaud R, Arentsen JJ. Corneal ulcers associated with contact lens wear. *Arch Ophthalmol*.1984; 102(6): 891-894.

Garret AW, Orth DS. A history of pharmaceutical preservation in the United States. In: Orth DS, Kabara JJ, Denyer SP, Tan SK, eds. *Cosmetic and Drug Microbiology*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group;2006, p: 11-22.

Gediya SK, Mistry RB, Patel UK, Blessy M, Jain HN. Herbal Plants: Used as a cosmetics. *J Nat Prod. Plant Resour.* 2011;1(1): 24-32.

Geis PA. Preservation strategies. In: Geis PA ,ed.*Cosmetic Microbiology-A Practical Approach*. 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006,p: 163-180.

Gervais V, Bijot D, Claude N. Assessment of a screening experience with the Ames II test and future prospects. (servier) European Environmental Mutagen Society Annual Meeting: From Hazard to risk, Aberdeen Scotland (UK); 2003,p:120.

Godfrey D. Preservation of moisturisers. In:Loden M, Maibach HI, eds. *Treatment of Dry Skin Syndrome*.1 st ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012,p: 355-367.

Gorman S, Scott E. Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives, In: Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP,ed. *Hugo's and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. UK: Blackwell Publishing company;2004, p:285-305.

Güven N, Onurdağ KF. İlaç, Kozmetik ve Gıda Ürünlerinde Kullanılan Bazı Koruyucuların Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Etkisinin Araştırılması. *Mikrobiyal Bul* 2014; 48(1): 94-105.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003;95(4): 853-860.

Hammer KA. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(2):106-110.

Heid SE, Kanti A, McNamee PM, Apel WA. Consumer safety considerations of cosmetic preservation,, In: Geis PA ,ed. *Cosmetic Microbiology-A Practical Approach*. 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006,p: 194-211.

Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Młynarczyk A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian J Microbiol*. 2013;53(2): 232-237.

Hiom SJ. Preservation of medicines and cosmetics. In: Fraise AP, Maillard JY, Sattar SA, eds. *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. 5th ed.UK: Wiley Blackwell; 2013, p: 388-407.

Hugbo PG, Onyekweli AO, Igwe I. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *TJPR*.2005;2(2): 229-234.

Ishidate M, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayash M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chem Toxicol*. 1984;22(8): 623-636.

İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü Kozmetikler Piyasa Gözetimi ve Denetimi Şube Müdürlüğü. *Kozmetik Ürünlerde Güvenlik Değerlendirmesi Kılavuzu*, Rev:01, 22 Mart 2012.

İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, Ba., Kürkcüoğlu, M.,Başer, Khc. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 2005;93:551-556.

Johnson W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Andersen FA. Safety Assessment of Alkyl Glyceryl Ethers as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*.2013;32(5):5-21.

Kabara JJ, Orth DS. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. In: Kabara JJ, Orth DS, eds. Principles for Product Preservation.1 st ed. New York: Marcel Dekker;1997, p:1–14.

Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003;10: 813-829.

Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckkh R, Zeigerr E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. Mutagenesis. 2009;24: 359-366.

Kaymak Y, Tırnaksız F. Kozmetik Ürünlere Bağlı İstenmeyen Etkiler. Dermatose.2007;1: 39-48.

Kılıç A. Bitkisel Kaynaklı Bazı Uçucu Yağ Ve Monoterpenlerin Olası Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005,Eskişehir (Danışman: Doç.B Ayaz Tüylü)

Kışlalıoğlu S. Kozmetoloji bilimi. İçinde: Yazan Y, ed. Kozmetik Bilimi.2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2010, s:3-9.

Kubo T, Urano K, Utsumi H. Mutagenicity characteristics of 255environmental chemicals. JHS. 2002;48(6): 545-554.

Kumaran AM, D'Souza P, Agarwal A, Bokkolla RM, Balasubramaniam M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of Cymbopogon martinii. Phytother Res. 2003; 17(8): 957-957.

Kunicka-Styczyńska A, Sikora M, Kalembe D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. J Appl Microbiol.2009;107(6): 1903-1911.

Leschke M. A Multifunctional Ingredient for Leave on Cosmetics. *Cosmetic Science and Technology*.2006;1-11.

Liebert MA. Final report on the safety assessment of diazolidinyl urea. *J Am Coll Toxicol*. 1990;9: 229-245.

Lundov MD, Johansen JD, Zachariae C, Moesby L. Low-level efficacy of cosmetic preservatives. *Int J Cosmet Sci*. 2011; 33(2) : 190-196.

Lundov MD, Zachariae C. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(6):471-474.

Maccioni AM, Anchisi C, Sanna A, Sardu C, Dessi S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. 2002;24(1): 53-59.

Madani TA, Alsaedi S, James L, Eldeek BS, Jiman-Fatani AA, Alawi MM, Marwan D, Macapagal M, Bahlas R, Farouq M. *Serratia marcescens*-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Hosp Infect*. 2011;78(1):16-19.

Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer MJ, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J Appl Microbiol*. 1998; 84(3): 368-376.

Maron DM, Ames BN. Revised methods for the mutagenicity test. *Mutation Research*. 1983;113: 173-215.

Martino, L.D., Feo, V.D., Nazzaro, F. Chemical composition and in Vitro antimicrobial mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules* 2009;14(10): 4213-4230.

McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(12): 5135-5139.

Mert T, Fafal T, Kivçak B, Öztürk T. H. Antimicrobial and cytotoxicactivities of the extracts obtained from the flowers of *Alcea rosea* L. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2010;1(30): 17-24.

Morse LJ, Schonbeck LE. Hand lotions-a potential nosocomial hazard. *New England Journal of Medicine*.1968;278(7):376-378.

Morse LJ, Williams HI, Grenn, FP, Eldridge EF, Rotta JR. Septicaemia due to *Klebsiella pneumoniae* originating from a handcream dispenser. *New Engl J Med*.1967;277:472–473.

Mortelmans K,Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenity assay, *MutationResearch*, 2000;455(1): 29-60,

Mulhall R, Schmidt E, Brannan DK. Microbial environment of the manufacturing plant. In: Geis PA, ed. *Cosmetic Microbiyology- A Practical Approach*.2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006,p: 74-96.

Mumcu E. Seydi Çayı (Eskişehir) Çevresinden Toplanan Su Ve Toprak Örneklerinde Ames / Salmonella/ Mutajenite Testi İle Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005,Eskişehir (Danışman: Prof. Dr. A Özata)

Muyima NYO, Zulu G Bhengu T, Popplewell D.The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. *Flavour Fragr J*. 2002;17(4): 258-266.

Naeini A, Khosravi AR, Chitsaz M, Shokri H, Kamlnejad M. AntiCandida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. J MedMycol. 2009;19(3):168-172.

Nair B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. Int J Toxicol.2000; 20: 23-50.

Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Cioni PL, Bader A, Marino A, Alonzo V. Preservative properties of Calamintha officinalis essential oil with and without EDTA. Lett Appl Microbiol. 2002;35(5): 385-389.

Oishi S. Effects of propylparaben on the male reproductive system. Food Chem Toxicol.2002; 40: 1807-1813.

Okeke IN, Lamikanra A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. J Appl Microbiol. 2001; 91(5): 922-928.

Onurdağ F, Özgen S, Abbasoğlu D. Microbiological investigation of used cosmetic samples. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy,2010; 30(1), 1-16.

Orth DS. Principles of preservation. In: Denyer SP, Baird RM, ed. The Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices. 2nd ed. Broken Sound Parkway NW: Taylor&Francis Group; 2007, p:309-318.

Ostrosky EA, Marcondes EMC, Oliveira Nishikawa S, Lopes PS, Varca GHC, Pinto TDJA, Consiglieri TVO, Baby AR, Velasco MVR, Kaneko TM. Rubus rosaefolius extract as a natural preservative candidate in topical formulations. AAPS PharmSciTech. 2011;12(2): 732-737.

Özer Ö. Kozmetik ürünlerin kararlılığı. İçinde: Yazan Y,ed. Kozmetik Bilimi.2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2010, s: 277-300.

Özkan, H., Yanmış, D., Karadayı, M., Bal, T., Barış, O., Güllüce, M. Determination of genotoxic and antigenotoxic properties of essential oil from *Ferula orientalis* L. by using Ames/Salmonella and E. coli WP2 bacterial test systems. *Toxicol Ind Health*. 2012; 30(8):714-23

Öztaş P. Önder M. Kozmetik ürünlerin güvenirliliği. İçinde: Yazan Y, ed. *Kozmetik Bilimi*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2010, s:307-3012.

Özyaral O, Cevikbas A, Ergin E. Microbial investigation in non-sterile pharmaceutical and cosmetic products I. The detection of mycotic contamination in eye cosmetics. *Journal of Pharmacy of University of Marmara*. 1993; 9 (1): 141-155.

Pack LD, Wickham MG, Enloe RA, Hill DN. Microbial contamination associated with mascara use. *Optometry*. 2008;79(10): 587-593.

Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C. New alternatives to cosmetics preservation. *J Cosmet Sci*. 2010;61(2): 107.

Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 1997;89(358): 39-46.

Payne DN. Microbial ecology of the production process. In: Denyer SP, Baird RM, eds. *The Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. 2nd ed. Broken Sound Parkway NW: Taylor&Francis Group; 2007, p:51-65.

Poudrier JK. Final report on the safety assessment of phenoxyethanol. *J Am Coll Toxicol*. 1990;9(2): 259-277.

Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6(1): 39.

Ravita TD, Tanner RS, Ahearn D G, Arms EL, Crockett PW. Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36(1): 35-38.

Rayaman P. Sağlıklı ve Hasta Polimorf Nüveli Lökositlerinde Miyeloperoksidaz ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesinin İlişkisi ve Bazı İlaçların Miyeloperoksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. M. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2010, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. A Çevikbaş).

Rigler NE, Schimmel J. Preservation of cosmetics. In: Goulden HD, Klarmann EG, Donald HP, Sagarin E, eds. Cosmetics Science and Technology. 1st ed. New York: Interscience; 1957, p: 1035-1074.

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. Toxicol Appl Pharmacol. 1998;153(1):12-19.

Russell AD. A history of pharmaceutical preservation in the United Kingdom. In: Orth DS, Kabara JJ, Denyer SP, Tan SK, eds. Cosmetic and Drug Microbiology. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group; 2006, p: 23-42.

Saraç N. Muğla Yöresinde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Bazı Lamiaceae Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi. M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, Muğla (Danışman: Doç. Dr. A Uğur)

Sarıkaya B. Antioksidan Maddelerin Mutajenite Üzerine Etkilerinin Ames Testi İle İncelenmesi, M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. GZ Omurtag)

Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. Dermatol Ther. 2004;17(3): 251-263.

Scholz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, 2006; 77(4): 279-285.

Scientific Committee on Consumer Products. SCCP. OPINION ON Tea tree oil, SCCP/1155/08 – European Union Commission Health and Consumer Union protection director general – adopted 18th plenary of 16 December 2008.

Scognamiglio J, Jones L, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. *Food Chem Toxicol*. 2012;50: 244-255.

Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk HG. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(5):625-644.

Sghaiera MB, Boubakera J, Skandrani I, Bouhlel I, Limema I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;31: 220-232.

Shaqra QMA, Al-Groom RM. Microbiological quality of hair and skin care cosmetics manufactured in Jordan. *Int Biodeter Biodegr*. 2012; 69: 69-72.

Sinha S, Biswas D, Mukherjee A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. *J Ethnopharmacol*. 2011; 137(3):1521-1527

Siquet F, Devleeschouwer JM. Antibacterial agents and preservatives. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI, eds. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 1st ed. USA: Eastern Hemisphere Distribution; 2001, p:245-251.

Sivri NN. Türkiye piyasasında mevcut bazı kozmetiklerin gama radyasyonla dekontaminasyonu. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*. 2005;4: 230-249.

Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol*. 2005;43 7: 985-1015.

Sonia MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methylparaben: a review of the published literature. *Food and Chem Toxicol.*2002; 40(10): 1335–1373.

Spooner DF. Hazards associated with the microbiological contamination of cosmetics, toiletries and nonsterile pharmaceuticals. In: Baird RM, Bloomfield SF, eds. *Microbial Quality Assurance in Cosmetics, Toiletries and Non-Sterile Pharmaceuticals*. 2nd ed. UK: Taylor and Francis Lt; 1996, p:9-3.

Stefanakis MK, Touloupakis E, Anastasopoulos E, Ghanotakis D, Katerinopoulos H E, Makridis P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*. 2013;34(2): 539-546.

Steinberg D. Global regulation of preservatives and cosmetics preservatives, In: Geis PA, ed. *Cosmetic Microbiology-A Practical Approach*, 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006, p:216-226.

Stephenson JR, Heard SR, Richards MA, Tabaqchali S. Outbreak of septicaemia due to contaminated mouthwash. *BMJ*.1984;289(6458): 1584-1584.

Sutton S VW. Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing. In: Geis PA, eds. *Cosmetic Microbiology, A practical approach*. 2nd ed. New York: Taylor&Francis Group; 2006, p: 111-146.

T.C. Resmi Gazete. Türk Kozmetik Kanunu. 30 Mart 2005. Sayı: 25771, Başbakanlık Basımevi, Ankara.

T.C. Resmi Gazete. Türk Kozmetik Yönetmeliği. 23 Mayıs 2005. Sayı:25823, Başbakanlık Basımevi, Ankara.

Taji SS, Rogers AH. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. *A D J*. 1998; 43(2);128-130.

Templeton WC, Eiferman RA, Snyder JW, Melo JC, Raff MJ. *Serratia keratitis* transmitted by contaminated eyedroppers. *Am J Ophthalmol.* 1982;93(6):723-726.

Tepe B, Akpulat HA, Sokmen M, Daferera D, Yumrutas O, Aydin E, Polissiou M, Sokmen A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chem.* 2006;97(4): 719-724.

Toroğlu S, Çenet M. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi.* 2006;9(2): 12-19.

Tüysüz M. Piyasada Bulunan Bazı Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik İçeriğinin Ve Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İstanbul (Danışman: Yard. Doç. Dr. AS Birteksöz Tan).

Umbuzeiro GDA, Rech CM, Correia S, Bergamasco AM, Cardenette GH, Flückiger-Isler S, Kamber M. Comparison of the Salmonella / microsome microsuspension assay with the new micro plate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. *EnvironMolMutagen.* 2010;51(1) :31-38

Underwood E. Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry. In: Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, eds. *Hugo's and Russell's Pharmaceutical Microbiology*, 7th ed. UK: Blackwell Publishing company;2004, p:251-262.

Underwood E. Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry. In: Hugo WB, Russell AD, eds. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science; 1998, p:339-354.

Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C. Self-preserving cosmetics. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31(3): 163-175.

Verma RS, Verma RK, Yadav AK, Chauhan A. Changes in the essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Herit. ex Ait.) due to date of transplanting under hill conditions of Uttarakhand. *Indian J Nat Prod Resour.* 2010; 1: 367-70.

Vural N. Mutajenesite testleri. İçinde: Vural N. ed.Toksikoloji. 2.Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi;2005, s:124-126.

Vyas P. Essential oils from plants: A Review. *INTJCA* . 2013;2(1): 129-134.

Wilson LA, Ahearn DG. Pseudomonas-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras. *Am J Ophthalmol.* 1977;84(1):112-119.

Wilson LA, Julian AJ, Ahearn DG. The survival and growth of microorganisms in mascara during use. *Am J Ophthalmol.* 1975;79(4):596-601.

Wong S, Debra S, Sonia I. Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the US Food and Drug Administration. *J Food Prot.* 2000;63(8): 1113-1116.

Yalçın P. Kozmetik Preparatlarda Kullanılan Bazı Koruyucuların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. Ü Soyoğul Gürer).

Yazar K, Johnsson S. Lind ML, Boman A, Liden C. Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermatitis.* 2011;64(5): 265-272.

YimE, Nole KLB, Tosti A. Contact Dermatitis Caused by Preservatives. *Dermatitis.*2014;25(5) :215-231.

Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen. 1988;11(Suppl 12): 1-158.

9.EK

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

Uluslararası Bildiriler

TUĞÇE KOÇOĞLU, ÜMRAN SOYOĞUL GÜRER, AYFER TOZAN BECEREN, BURÇAK GÜRBÜZ, PERVİN RAYAMAN, ESRA DALKILIÇ, ERKAN RAYAMAN. Kozmetik Ürünlerinde Kullanılan Bazı Koruyucuların Uçucu Yağlar ile Kombinasyonlarının Antimikrobiyel ve Mutajenik Etkilerinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, (P-076, Poster Bildiri),2. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım 2015, Haliç Kongre Merkezi, İstanbul, Türkiye.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Tuğçe	Soyadı	Koçoğlu
Doğum Yeri	Şişli	Doğum Tarihi	16.10.1990
Uyruğu	T.C.	Tel	0546 650 34 41
E-mail	tugcekocoglu@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2016
Lisans	Kocaeli Üniversitesi	2012
Lise	Silivri Süper Lisesi	2008

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Mikrobiyoloji Kalite Kontrol Analisti	Onko – Koçsel İlaçları	2015- Devam ediyor
	Stajyer	Silivri Devlet Hastanesi	07.2011 -08.2011
	Stajyer	Özel Silivri Hayat Hastanesi	07.2010 -08.2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
78,75	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	65,10	67,79	65,02

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.