



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOZMETİK PREPARATLARDA KULLANILAN BAZI
KORUYUCULARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

PELİN YALÇIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ümran Soyoğul GÜRER

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Pelin YALÇIN

Tez Başlığı : Kozmetik Preparatlarda Kullanılan Bazı Koruyucuların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Sınav Yeri : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 03.09.2010

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Ümran Soyoğul GÜRER

Kurumu

M.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,
Adı, Soyadı)**

Prof. Dr. Adile ÇEVİKBAŞ

M.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yard. Doç. Dr. Timuçin UĞURLU

M.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Teknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 15.10.2010 tarih ve 95. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr.
Gülden Z. OMURTAG
Müdür

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla 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.

22.09.2010

Pelin YALÇIN



TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenerek, tez çalışmamı yönlendiren ve tezimin başlangıcından sonuna kadar bana destek ve yardımcı olan, değerli fikirleri ile yol gösteren hocam Doç. Dr. Ümran Soyoğul Gürer'e ve yüksek lisans öğrenimimde çok değerli bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, destek ve ilgisini benden esirgemeyen hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Adile Çevikbaş'a teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında bana yardımcı olan Anabilim Dalımız Araştırma Görevlisi Erkan Rayaman ve Araştırma Görevlisi Burçak Gürbüz'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda değerli bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren direktörüm Dr. Ecz. Birgül Özden Kasımoğulları'na ve tez dönemimdeki yardımlarından dolayı kimyager Hakan Sevinç'e teşekkür ederim.

Hayatımda bir an bile maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren ve beni bu günlere getiren çok değerli AİLEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

VII

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Koruyucular hakkında genel bilgiler	6
4.1.1. Metil paraben ve propil paraben	8
4.1.2. Fenoksietanol	9
4.1.3. Bronopol	10
4.1.4. Diazolinidil üre	11
4.1.5. Benzil alkol	12
4.1.6. Dehidroasetik asit	13
4.1.7. Propilen glikol	13
4.1.8. Sodyum benzoat	14
4.1.9. Potasyum sorbat	15
4.1.10. Benzoik asit	16
4.1.11. Metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon	17
4.2. Koruyucu aktivitesini etkileyen faktörler	18
4.3. Kozmetik ürünlerde mikrobiyal kirlenme	19
4.4. Mikrobik kirlenmenin steril olmayan kozmetikler ve tuvalet malzemeleri üzerindeki kontrolü	21
4.5. Kozmetik ürünlerde saptanan mikrobiyal flora	23
4.6. Koruyucuların güvenlik değerlendirmesi	23
4.7. Koruyucu etkinlik testleri hakkında genel bilgiler	25
4.8. Koruyucu etkinlik testlerinde kullanılan mikroorganizmalar hakkında genel bilgiler	26
4.8.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
4.8.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
4.8.3. <i>Escherichia coli</i>	30
4.8.4. <i>Candida albicans</i>	31
4.8.5. <i>Aspergillus niger</i>	31
4.9. Saç kozmetikleri hakkında genel bilgiler	32
4.9.1. Şampuanlar	34
4.10. Kozmetik ürünlerde yapılan kararlılık testleri	35
5. GEREÇ ve YÖNTEM	37
5.1. Gereç	37
5.1.1. Mikroorganizmalar	37
5.1.2. Besiyerleri	37
5.1.3. Çözeltiler	37
5.1.4. Şampuan	37
5.1.5. Koruyucular	38
5.1.6. Kimyasal maddeler	39
5.1.7. Cihazlar ve gereçler	40
5.2. Yöntem	41
5.2.1. Amerikan Farmakopesi	41
5.2.2. İngiliz Farmakopesi	42
5.2.3. Japon Farmakopesi	43

5.2.4. Koruyucuların hazırlanması	44
5.2.5. Deneyin yapılışı	45
6. BULGULAR	46
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
8. KAYNAKLAR	61
9. ÖZGEÇMİŞ	68

KISALTMALAR

<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
<i>A. niger</i>	: <i>Aspergillus niger</i>
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
PDA	: Potato Dekstroz Agar
TSA	: Trypticase Soy Agar
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
PET	: Preservative Effectiveness Test
BP	: British Pharmacopoeia
USP	: United States Pharmacopoeia
EP	: European Pharmacopoeia
JP	: Japanese Pharmacopoeia
CTFA	: Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association
Leave-on	: Durulanmayan
Rinse-off	: Durulanabilen

1. ÖZET

Kozmetik ürünlerde, ürünün kullanım sırasında kontamine olma olasılığına karşı ürüne koruyucu olarak bilinen antimikrobiyal maddeler eklenmektedir. Çalışmamızda kozmetik ürünlerde kullanılan 4 farklı ticari kombinasyondan, bronopol, propil paraben, metil paraben ve fenoksietanol içeren A koruyucusu; diazolinidil üre, sodyum benzoat ve potasyum sorbat içeren B koruyucusu; fenoksietanol, benzoik asit ve dehidroasetik asit içeren C koruyucusu; propilen glikol, benzil alkol, metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon içeren D koruyucusunun etkinliği Amerikan, İngiliz ve Japon Farmakopelerinde yer alan koruyucu etkinlik testlerine göre değerlendirilmiştir. Tüm koruyucuların denenen konsantrasyonları Amerikan, İngiliz ve Japon Farmakopelerine göre etkili bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Koruyucu, koruyucu etkinlik testi, kozmetik, şampuan.

2. SUMMARY

Comparison of Methods Used For The Determination of Antimicrobial Activities of Some Preservatives Used In Cosmetic Preparates

Antimicrobial substances are added to the cosmetic products in order to prevent contamination that may occur during application of the product. In this study, the efficiency of 4 different commercial combinations used in cosmetic products, which were combination of bronopol, propyl paraben, methyl paraben and phenoxyethanol, preservative A, combination of diazolidinyl urea, sodium benzoate and potassium sorbate, preservative B, combination of phenoxyethanol, benzoic acid and dehydroacetic acid, preservative C and combination of propylene glycol, benzyl alcohol, methylisothiazolinone, methylchloroisothiazolinone, preservative D, were evaluated their preservative effectiveness according to United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia and Japan Pharmacopoeia. Tested concentrations of these four preservative systems were found to be effective according to United States, British and Japan Pharmacopoeia.

Key Words: Preservative, preservative effectiveness test, cosmetic, shampoo,

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kozmetik, Yunanca Kosmein, dekore etmek, süslemek sözcüğünden türetilmiştir. Bu sözcüğün anlamının aynı zamanda, “bakmak, bakım, vücut ile aklın harmonisi” olduğu düşünülebilir (1).

Kozmetikler deriye, saça, dişlere genel olarak vücudun dış yüzeylerine ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanan ve bu yüzeyleri temizlemek, korumak, sorunlarını gidermek ve güzelleştirmek amacıyla kullanılan preparatlardır (2). 26 Şubat 1994 Resmi gazetede yayınlanan Türk Kozmetik Kanunu’na göre “Kozmetikler; insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve genital organlar gibi değişik kısımlarına, ağız ve dişlere ve mukozaya uygulanmak üzere hazırlanmış amacı ve yan amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek ve korumak suretiyle iyi bir durumda muhafaza etmek ve görünümünü değiştirmek ve vücut kokularını düzeltmek olan, saç boyaları ve saç rengi açıcıları da dâhil bütün preparatlar ve/veya maddelerdir.” (Kozmetik Kanunu, Resmi Gazete, 26 Şubat 1994, Sayı 21861)(<http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok5.pdf>).

Bugün ülkemizde günlük yaşamın önemli bir parçası haline gelen kozmetik preparatlar içinde en büyük bölümü saç preparatları oluşturmaktadır. Bu denli geniş kullanım alanı olan bu preparatların mikrobiyal floraları ile bunlardan kaynaklanabilecek sağlık sorunlarının saptanması büyük önem taşımaktadır (3).

Günlük kozmetik ürünler, cildi nemlendirmek, temizlemek gibi sebeplerle üst üste kullanılırlar ve bunlar ciltte uzun süre kalırlar. Özellikle çok sık kullanımlarda her zaman ciltte bir miktar kimyasal madde kalacaktır. Bu da ciltte istenmeyen etkiler oluşturabilecektir. Bu yüzden uzun süreli kullanımlardan kaçınılmalıdır (4).

Kozmetik preparatların kullanılmasından sonra gözlenen istenmeyen etkiler ve bunların doğurduğu sonuçların nedenleri araştırıldığında genellikle preparatların mikroorganizmalarla kontamine olduğu saptanmıştır. Kozmetiklerin çoğu steril olarak üretilmezler. Bunun yanı sıra kozmetikler üretim esnasında, depolama

aşamasında ya da kullanım esnasında kontaminasyona maruz kalabilirler. Kozmetik preparatların mikrobiyolojik uygunluğu tüketici sağlığı yönünden önemli olduğu gibi preparatın stabilitesi ve kalite uygunluğu yönünden de büyük önem taşır. Mikrobiyolojik kontaminasyon üründeki fazların ayrışmasına, kimyasal yapısının değişmesine ve insanlarda sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bir ürün alındığı zaman ya da kullanım esnasında kabul edilebilir limitlerin altında mikroorganizma içermesi sağlanmalıdır. Kozmetik ürünlere konulan koruyucu düzeyi ürünün raf ömrü ve kullanım süresinde devam etmelidir. Ürün kullanım esnasında birçok mikroorganizma tarafından kontaminasyona uğrayabilir. Kozmetik preparatlarda mikroorganizma üremesini kontrol altında tutmak için formülasyona mikroorganizma gelişimini engelleyen bir ya da birkaç koruyucu madde ilavesi gereklidir (5).

Koruyucular losyon, krem ve şampuan gibi kozmetik ürünlere iki sebepten eklenir: birincisi, mikrobiyal bozulmayı önlemesi ve böylece ürünün raf ömrünün uzaması, ikincisi, bakteri, maya ve küf gelişimini önleyerek tüketiciyi potansiyel infeksiyondan korumasıdır. Her ne kadar kimyasal koruyucular mikrobiyal üremeyi önlese de, tüketiciler için güvenilirlikleri soru işaretidir (6).

Kozmetiklerin çoğu kompleks formülasyona sahiptir. Formülasyondaki maddeler, koruyucuların aktivitesini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. İdeal bir koruyucu ürüne giren bütün mikroorganizmaları öldürebilmelidir, hasta için toksik ya da tahriş edici bir özellik taşımamalıdır, imalat işlemlerine dayanabilecek kadar stabil olmalı ve kullanım süresi boyunca aktif kalmalıdır. Ürünün formül tasarımı yapıldığında, ürüne konulacak koruyucuların yeterince etkili olabilecekleri söylenemez. Çünkü koruyucuların aktivitesi konsantrasyon, pH, sıcaklık, ambalaj malzemeleri, mikroorganizmalar ve organik maddeler gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Dolayısıyla bir ürünün formülasyonuna girecek olan koruyucuyu seçerken bu faktörler göz önüne alınmalıdır (7).

Birçok koruyucu düşük moleküler ağırlıkta bileşiklerdir ve biyolojik olarak aktiftir, bu yüzden duyarlılık yapabilirler. Koruyucuların neden olduğu kontakt allerjiyle ilgili pek çok yayın yapılmıştır. 1980’lerde, özellikle leave-on (durulanabilen) ürünleri kullanan pek çok insanda metilizotiazolinonlara (MIT) karşı oluşan allerjik reaksiyonlar bildirilmiştir. Hala, kozmetik ve tuvalet ürünlerinde MIT içeren koruyucular sık sık kullanılmaktadır (8). Bronopol, formaldehit açığa çıkaran ajandır. Formaldehite allerjisi olan hastalarda allerjik reaksiyon ya da ciltte tahribe sebep olur (9).

Kozmetik preparatlarda kullanılan koruyucu maddelerin gerçek aktivitesini saptamak oldukça zordur. Herhangi bir ürünlerdeki koruyucuların etkinliğinin saptanması ya da deneysel olarak çeşitli maddelerin koruyucu olarak kullanımını araştırmak için standart yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin başlıcaları British Pharmacopoeia (BP), United States Pharmacopoeia (USP), European Pharmacopoeia (EP) gibi kaynaklarda belirtilmiştir (7).

Challenge test aslında koruyucu etkinlik testi olarak bilinir. Bu test kozmetik, farmasötik ya da diğer tip ürünün formülasyonunda, tüketici kullanımı esnasında ve ürünün hammaddeden kontaminasyonunu önlemede yeterli korumanın olup olmadığını belirleyen bir prosedürdür (10). Test, kontaminasyonun kontrolü için kullanılan koruyucuların minimum seviyesini belirlemede ürün geliştirme esnasında kullanılır. Testte bakteri, maya ve küf kullanılır. Koruyucu etkinlik testinde genellikle, gram pozitif kok (*Staphylococcus aureus*), fermenter gram negatif çomak (*Escherichia coli*), nonfermenter gram negatif çomak (*Pseudomonas aeruginosa*), maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) kullanılır. Bu test mikroorganizmaları, patojenleri, fırsatçı patojenleri ve patojen olmayanları içermektedir (11).

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda; farklı formülasyondaki 4 ticari koruyucunun etkinliğini Amerikan, İngiliz ve Japon Farmakopelere göre karşılaştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Koruyucular Hakkında Genel Bilgiler

Koruyucular, kozmetik ürünlerde ve ilaçlarda mikrobiyal kontaminasyonu önlemede kullanılırlar (12). Koruyucuların oral ve topikal gibi steril olmayan diğer tıbbi tedavi ürünlerinin ve üretim esnasında ister istemez oluşabilecek mikroorganizmaların üremelerini sınırlandırmaları gerekmektedir. Multidoz enjeksiyonluk ve göz damlaları gibi steril ürünlerde koruyucular, kullanım esnasında karşılaşılan istenmeyen mikrobiyal kontaminantların hepsini öldürmelidir. Korunan preparatın uygulama yolunda, koruyucu temel olarak toksik olmamalıdır. Böylece koruyucular düşük konsantrasyonda, kullanılmaktadır ve bu yüzden antimikrobiyal etkileri, dezenfektanlardan ve antiseptiklerden daha düşüktür (13).

Tek bir koruyucu çok düşük kullanım seviyesinde geniş bir antimikrobiyal etki sağlayabilir. Fakat “ideal” koruyucu kriterinin kabul edilmesi için geniş spektrumlu bir koruyucu sistemi geliştirilmelidir. Mükemmel bir koruyucu aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- 1) Bakteri ve mantarlara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalıdır.
- 2) Kozmetik ürünlerde düşük seviyelerde mükemmel antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalıdır.
- 3) Geniş pH aralığında etkili olmalıdır.
- 4) Toksik ve irrite edici olmamalı, güvenilir olmalıdır.
- 5) Ambalaj materyaliyle ya da formülasyon içindeki diğer bileşenlerle tepkisiz olmalıdır.
- 6) Tüm kozmetik materyallerle uyumlu olmalı ve bitmiş ürünün renk ve kokusunda etkili olmamalıdır.
- 7) Ucuz ve kolay temin edilebilir olmalıdır.

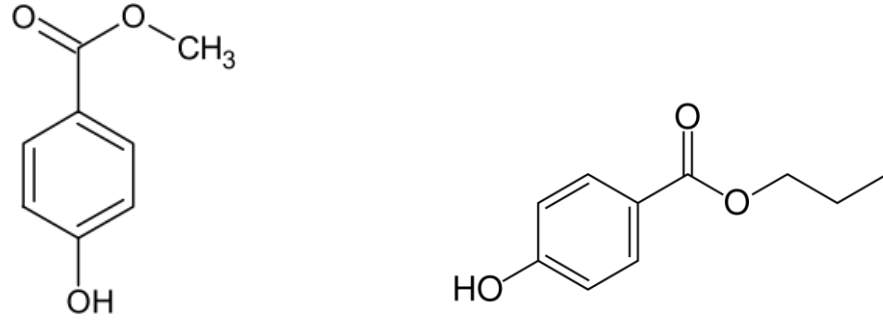
(14, http://www.sinolion.com/zshx_eng/admin_eng/myedit/UploadFile/20081130223131803.PDF, Erişim tarihi: 09.06.2010).

Kozmetik ürünlerde en çok kullanılan kimyasal koruyucular tablo 1’de listelenmiştir (15).

Tablo 1: En çok kullanılan koruyucular (15)

Koruyucu İsmi	Etki Spektrumu	Uyumluluk	İnaktive Edenler	Uygun pH
Parabenler: benzoik asit esterleri	Mantar, Gram pozitif bakteriler	Katyonik	Anyonik, noniyonik, proteinler	<7
İmidazolinidil üre, Diazolinidil üre	Geniş spektrumlu, bakterilere karşı zayıf spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik, proteinler		4-9
İzotiazolinonlar	Geniş spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik	Yüksek pH	4-8
Formaldehit, Dimethyloldimethyl hydantoin (DMDM Hydantoin)	Geniş spektrumlu	Anyonik, noniyonik, katyonik	$T^0 > 60^0C$	4-9
Benzalkonyum klorür	Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve 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

4.1.1. Metil paraben ve propil paraben



Şekil 1. Metil ve propil parabenin kimyasal yapısı

Günümüzde ilaç ve kozmetik sanayinde pek çok koruyucu madde kullanılmaktadır. Parabenler, kozmetik ürünlerde en çok kullanılan koruyucudur (5, 16, 17).

Parabenler, küçük renksiz kristaller ya da beyaz toz kristallerdir ve özellikle kokusuz ve tozdurlar. %0.1-%0.2 konsantrasyonlarında etkilidirler. Alkol, eter, gliserin ve propilen glikolde çözünürler, suda ise az veya hiç çözünmezler (2, 18).

Birçok kozmetik ve topikal terapötik ajanda bakteriyel ve fungal kontaminasyonu önlemede popüler koruyucular propil ve metilparaben esterleridir. Diğer paraben esterleri olarak çoğunlukla etil, bütıl ve benzil parabenler kullanılır (19).

Ayrıca, paraben kombinasyonları bakteriler üzerine sinerjistik etkilidir (20, 21).

Metil, etil, propil ve bütıl esterlerin birlikte kullanımı formülasyonun su ve yağ fazını korur (22). Metil parabenin suda çözünürlüğünün yüksek oluşu ve propil parabenin yüksek etkinliği bu iki maddenin birlikte kullanımında avantaj sağlamaktadır (23).

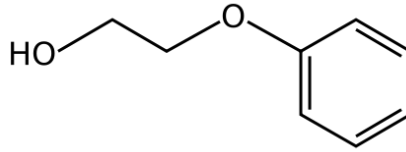
Kozmetik formülasyonlarında, %1'e kadar parabenlerin kullanımına izin verilmiştir. 1984'te 13.200 farklı kozmetik formülasyonunda parabenlerin kullanımı

değerlendirilmiş ve son zamanlarda yapılan 215 kozmetik ürün anketinde, durulanamayan ürünlerde kullanım oranı %99, durulanabilen ürünlerde ise %77 olarak bulunmuştur. Parabenler ciltten hızlıca emilirler (24).

Parabenlerin, gram pozitiflere karşı etkisi gram negatif organizmalara olan etkisinden daha fazladır. *Pseudomonas*'lara karşı zayıf etkilidir. Parabenlerin maya ve küflere karşı öldürme aktivitesi bakterilere göre daha fazladır. Sık sık diğer koruyucularla birlikte kullanılırlar. Suda çözünmemeleri *P. aeruginosa*'ya karşı zayıf aktivitelerini açıklamaya yardımcıdır (19).

Etkili oldukları pH aralığı 4.5-7.5'dir. Alkil zincirinin karbon sayısı arttıkça, antimikrobiyal aktivite ve yağdaki çözünürlükleri artar fakat sudaki çözünürlükleri azalır (25).

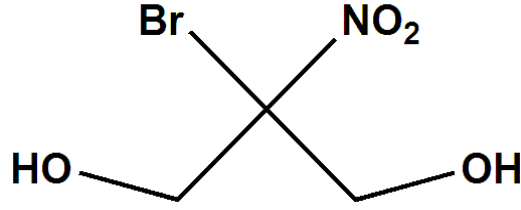
4.1.2. Fenoksietanol



Şekil 2. Fenoksietanolün kimyasal yapısı

Fenoksietanol, organik kimyasal bir bileşendir. Renksiz, yağa benzeyen sıvıdır. Çoğunlukla kozmetikler, farmasötik ürünler, aşılar ve topikal ilaçlarda kullanılan bir koruyucudur. Tavsiye edilen kullanım konsantrasyonu %0.5-2.0'dır. *P. aeruginosa*'ya karşı etkisi diğer bakterilere olan etkisinden daha yüksektir ve genellikle hidroksibenzoatlar gibi diğer koruyucularla birlikte kullanılarak antimikrobiyal aktivitesinin etkinliği artırılır. Katyonik ve aniyoniklerle uyumlu olmasına rağmen, noniyoniklerle aktivitesini kaybeder (13, 22, 26, www.wikipedia.org/wiki/Phenoxyethanol, Erişim tarihi: 09.06.2010).

4.1.3. Bronopol



Şekil 3. Bronopolün kimyasal yapısı

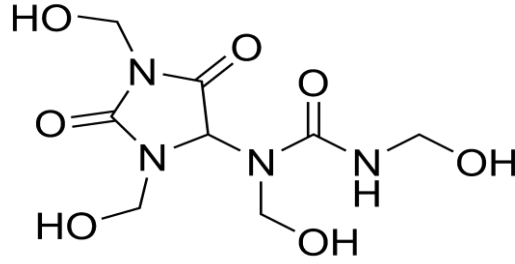
Bronopolün sentezi ilk olarak 1897’de Henry tarafından yayınlanmış olmasına rağmen, antimikrobiyal bir ajan olduğu 1960’larda kabul edilmiştir (22).

Bronopol, şampuanlar, sabunlar, bebek ıslak mendilleri, nemlendiriciler, losyonlar, topikal ilaçlar, göz makyaj ürünleri gibi çok çeşitli kozmetik ürünlerinde ve ev eşyası ürünlerinde koruyucu olarak kullanılır (27, 28, 29, 30).

Beyaz, kokusuz, kristalize bir maddedir (2). Kimyasal formülü 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol olan bronopol, mikroorganizmaların büyük çoğunluğuna karşı mükemmel etkili, suda çözünebilir alifatik dioldür. Mantarlara, mayalara, gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara ki özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas*’lara karşı antibakteriyal aktivitesi yüksektir. Bu mikroorganizmalar, suda yaygın olarak bulunurlar ve kozmetik ve tuvalet ürünlerinde kontaminasyon ve bozulmaya neden olurlar (16, 30, 31, www.wikipedia.org/wiki/Bronopol, Erişim tarihi: 09.06.2010).

Emülsiyonlar içerisine %0.01-0.05, şampuanlar, dudak boyaları ve göz kozmetiklerine ise %0.1 oranında ilave edilir. Noniyonik deterjanlar bronopolün etkinliğini azaltır. Parabenlerle birlikte kullanılmalıdır (2).

4.1.4. Diazolinidil Üre



Şekil 4. Diazolinidil ürenin kimyasal yapısı

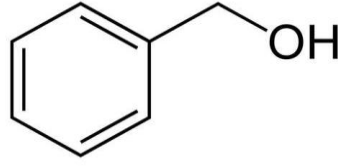
Formaldehit bileşenlerine en son eklenen koruyucudur. Çoğunlukla topikal ilaçlarda, deterjanlarda, bebek ıslak mendillerinde, sıvı sabunlarda, saç bakım ürünlerinde ve kremler gibi kozmetik ürünlerinde kullanılır (16, 27).

Çeşitli pH aralıklarında etkilidir ve suda çözünür. Avrupa Birliği kozmetiklerde maksimum kullanım konsantrasyonu olarak %0.5'e izin vermiştir. Tipik kullanım konsantrasyonu %0.1-0.3'tür. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı aktivitesi çok yüksektir. Antifungal aktivite için sık sık metil ve propil parabenle birlikte kullanılır (16, 19, 31).

Kozmetik içeriğindeki diğer maddelerle uyumludur ve noniyonik surfaktanlar ve proteinlerden etkilenmez (22).

Ayrıca diazolinidil üreyle imidazolinidil ürenin yapıları benzediği için çapraz reaksiyona sebep olduğu yayımlanmıştır (28).

4.1.5. Benzil alkol



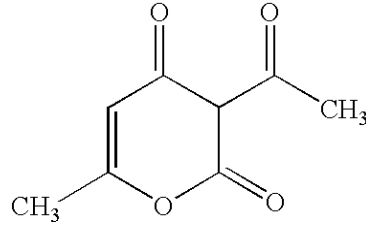
Şekil 5. Benzil alkolün kimyasal yapısı

Benzil alkol organik bir bileşiktir ve $C_6H_5CH_2OH$ formülüyle gösterilir. Aromatik hoş kokulu, renksiz bir sıvıdır (32, www.wikipedia.org/wiki/Benzyl_alcohol, Erişim tarihi: 09.06.2010).

Benzil alkol, koruyucu, parfüm bileşeni, çözücü ve viskozite azaltıcı ajan olarak çeşitli kozmetik ürünlerine ilave edilebilir. Bu kozmetik ürünlerin içerisinde şampuanlar, spreyler, durulama ürünleri, fondöten gibi makyaj ürünleri, yüz krem ve losyonları, nemlendirici kremler ve losyonlar, parfümler ve tıraş sonrası losyonları yer alır (32,33).

Geniş pH aralığında etkindir. Suda çok az çözünür (4g/100 ml) ve alkoller ve dietil eterle iyi çözünür. Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir ve gram negatif bakteriler, mayalar ve küflere karşı aktivitesi zayıftır (22, www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Benzylalcohol.pdf, Erişim tarihi: 09.06.2010 www.wikipedia.org/wiki/Benzyl_alcohol, Erişim tarihi: 09.06.2010).

4.1.6. Dehidroasetik asit

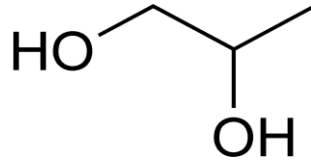


Şekil 6. Dehidroasetik asitin kimyasal yapısı

Dehidroasetik asit, genellikle farmasötik ve kozmetik ürünlerin içinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılır. Uçucu değildir ve geniş spektrumludur (34).

Çoğunlukla asidik pH'da etkilidir. Fungisit ve bakterisittir (22, [www.wikipedia.org/wiki/ Dehydroacetic_acid](http://www.wikipedia.org/wiki/Dehydroacetic_acid), Erişim tarihi: 10.06.2010).

4.1.7. Propilen glikol



Şekil 7. Propilen glikolün kimyasal yapısı

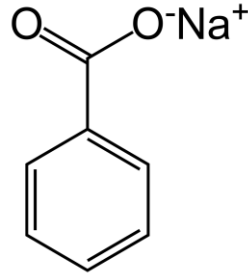
Propilen glikol organik bir bileşiktir ve $C_3H_8O_2$ formülüyle gösterilir. Renksiz, az kokusu ve tadı olan, su, aseton ve kloroform ile karışabilen sıvıdır ([www.wikipedia.org/wiki/ Propylene_glycol](http://www.wikipedia.org/wiki/Propylene_glycol), Erişim tarihi: 10.06.2010).

Nemlendirici, çözücü ve viskozite artırıcı ajan olarak, rujlar, kremler, losyonlar, makyaj ürünleri, şampuanlar, ter önleyiciler, deodorantlar ve banyo köpüklerinin formülasyonlarında kullanılır (33).

Bazı preparatlarda propilen glikol miktarı %70'e kadar yükselebilir. Böylece propilen glikol sadece bazı ter önleyicilerde kullanılır. Konsantrasyon %25'in üzerinde olduğunda propilen glikol antifungal ve antibakteriyel etkilidir. Topikal ilaçlarda “koruyucu” olarak kullanılabilir (19).

Escherichia coli, *Pseudomonas* ve diğer bakterilere, *Candida albicans*, *Bityrosporum orbiculare* ve diğer dermatofit mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite gösterir (19).

4.1.8. Sodyum benzoat



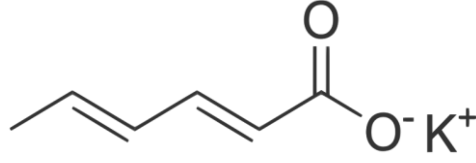
Şekil 8. Sodyum benzoatın kimyasal yapısı

Sodyum benzoat, benzoik asitin sodyum tuzudur ve $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$ kimyasal formülüyle gösterilir (www.wikipedia.org/wiki/Sodium_benzoate, Erişim tarihi: 10.06.2010).

Beyaz kristal ya da granüler tozudur. Suda benzoik asitten daha çok çözünür. Asidik pH'da çok iyi çalışır ve mayaların, küflerin ve bakterilerin üremesini engeller (35, 36).

Çoğunlukla soda ve meyve suyu gibi gıdalarda olmak üzere kozmetik ve farmasötik ürünlerde de kullanılır (36).

4.1.9. Potasyum sorbat



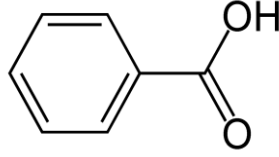
Şekil 9. Potasyum sorbatın kimyasal yapısı

Potasyum sorbat sorbik asidin potasyum tuzudur ve $C_6H_7O_2K$ kimyasal formülüyle gösterilir (www.wikipedia.org/wiki/Potassium_sorbate, Erişim tarihi: 10.06.2010).

Potasyum sorbat toz ve granüler olarak işlenebilir. Gıda alanındaki uygulamalarda sık sık kullanılır çünkü suda çözünürlüğü çok iyidir (35).

Öncelikle gıda koruyucusu olarak kullanılır. Kişisel bakım, şarap ve gıdayı içeren çeşitli uygulama alanlarında da etkilidir. Bazı işletmeler bu koruyucuyu parabenlerin yerine kullanırlar. Küf ve mayaların üremesini engeller (37, www.wikipedia.org/wiki/Potassium_sorbate, Erişim tarihi: 10.06.2010).

4.1.10. Benzoik asit



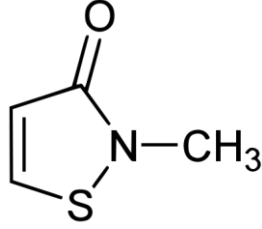
Şekil 10. Benzoik asidin kimyasal yapısı

Benzoik asit bir organik asittir, C_6H_5COOH kimyasal formülüyle gösterilir ve renksiz, kristal gibidir (13, www.wikipedia.org/wiki/Benzoic_acid, Erişim tarihi: 12.06.2010).

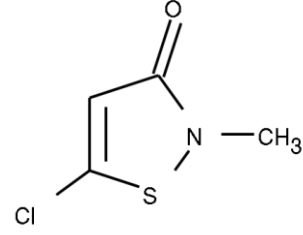
Farmasötiklerde çoğunlukla, tek başına ya da diğer koruyucularla birlikte kullanılır. Benzoik asit, bal, mantar, kızılçık, kakao, fasulye, kayısı gibi birçok gıda da doğal olarak bulunur (13, 32).

Farmasötiklerin korunmasında max. pH'ın 5.0 ve eğer mümkünse 4.0'dan aşağı olması tavsiye edilir. Öncelikle antimikotik ajan olarak kullanılır ve birçok maya ve küfü %0.05-0.1 konsantrasyonda inhibe eder (13, 35).

4.1.11. Metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon



Metilizotiazolinon



Metilkloroizotiazolinon

Şekil 11. Metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinonun kimyasal yapısı

Metilizotiazolinon/Metilkloroizotiazolinonun (MI/MCI) iki izotiazolinonun karışımından ibarettir ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyaldir. MI/MCI kombinasyonu genellikle 1:3 oranında kullanılır (17, 38).

Metilizotiazolinon/Metilkloroizotiazolinonu kombinasyonu çok düşük konsantrasyonlarda bile gram pozitif ve gram negatif bakterilere, maya ve küflere karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir. Konsantrasyonu 200 ppm üzerinde olduğunda iritandır ve hayvan deneyleri de güçlü bir allerjen olduğunu göstermiştir (16, 39).

Metilizotiazolinon/Metilkloroizotiazolinonu kombinasyonu, şampuanlar, kozmetikler ve ıslak mendilleri içeren leave-on ve rinse-off gibi kişisel bakım ürünlerinde ve kağıt imalatları, metal çalışmaları ve lateks boyamayı içeren endüstri de kullanılır (17, 27).

4.2. Koruyucu Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Bir kozmetik ya da farmasötik ürünlerdeki koruyucunun gerçek aktivitesini saptamak oldukça zordur. Ürünün formül tasarımı yapıldığında, ürüne konulacak koruyucuların yeterince etkili olabilecekleri söylenemez. Çünkü koruyucu aktivitesini formülasyon faktörleri gibi birçok faktör etkilemektedir (11, 40).

1. Koruyucunun konsantrasyonu: Her koruyucunun etkili olduğu bir konsantrasyon vardır ve aktivite konsantrasyonla doğru orantılı olarak artar (5, 40).

2. Işık: Bazı organik ve anorganik koruyucular direkt güneş ışığına maruz bırakıldığında bozulabilirler. Bunu önlemek için seçilen ambalaj materyalinin ultraviyole ışınlarla engel olabilecek yapıda olmasına dikkat edilmelidir (40).

3. Sıcaklık: İdeal olarak, koruyucu maddeler farklı formülasyon işlemlerinde ve kullanım sırasında karşılaştıkları sıcaklığa karşı dayanıklı olmalıdır. Sıcaklığın artmasıyla koruyucu etkinliği artar (1, 5, 40).

4. pH: Formülasyonda koruyucunun antimikrobiyal etkisini ya da kimyasal stabilitesini değiştirir. Organik asit koruyucular benzoik asit, dehidroasetik asit ve sorbik asittir ve bunlar düşük pH'da çalışırlar. Benzil alkolün antimikrobiyal aktivitesi pH 5.0 civarındadır. Parabenlerin en iyi antimikrobiyal aktivitesi nötral pH seviyeleridir. Bronopol düşük pH'da antimikrobiyal aktivitelidir (11).

5. Ambalaj malzemeleri: Ambalaj malzemeleri koruyucuyu absorblayarak aktivitenin değişimine neden olabilir. Benzoik asit, sorbik asit ve parabenler gibi koruyucuların plastik kaplara absorpsiyonuna sık rastlanılır. Kauçuk kapaklar, fenolik koruyucular başta olmak üzere çeşitli koruyucuların geçişine izin vererek koruyucu etkinliğini azaltır (1, 5).

6. Çözünürlük özellikleri: Mikroorganizmalar sulu fazda kolaylıkla çoğaldıklarından, sulu fazda etkili miktarda koruyucu bulunmalıdır. Bu nedenle, koruyucunun sudaki çözünürlüğü önemlidir. Emülsiyonlar gibi, sulu ve yağlı faz içeren sistemlerde ise, koruyucu maddelerin bu ortamlardaki dağılıbilirlik katsayısı önem taşır (1, 11).

4.3. Kozmetik Ürünlerde Mikrobiyal Kirlenme

Mikroorganizmalar kozmetik ürünlere hammadde, su, hava, ekipmanlar, paketlenme malzemeleri ve personelden bulaşabilirler (41).

1. Hammadde ile kirlenme: Hammaddenin mikrobiyal kalitesinin düşük olması, kozmetik ve tuvalet ürünlerinin kontaminasyonu için uygun bir ortam oluşturur. Hammaddenin iyi kalitede olması ve etkin bir mikrobiyolojik kalite kontrol, üretim ortamında ve bitmiş üründe kontaminasyonu en aza indirir. En çok mikrobiyolojik kontaminasyon görülen hammadde grupları: doğal maddeler (bitki ekstraktları ve konsantreleri), karbonhidratlar ve glikozitler, protein ve protein türevleri ve sudur (1, 14, 41).

Kozmetik ve tuvalet ürünlerinde kullanılacak olan hammaddelerin dikkatli bir şekilde kontrol edilmelerinin yanı sıra, kontamine olmayacakları bir ortamda saklanmaları gereklidir (1).

2. Su: Mikrobiyal kalitesi, çok düşük olan hammadde sudur. Pek çok kozmetik ve tuvalet ürünü içinde en çok kullanılan hammadde su olduğundan, suyun mikrobiyal kalitesi büyük önem taşır (1, 14).

Distilasyon veya deiyonizasyon ile hazırlanmış, iletkenliği düşük olan su, kimyasal olarak daha saf olmasına rağmen, daha fazla mikrobiyolojik zarar oluşturur. Kontaminasyonu en aza düşürmek için etkili bir işlem yapılmadığında, birkaç gün içinde su, yoğun miktarda, başlangıçta gram negatif ve gram pozitif bakteriler, hemen arkasından da çok çeşitli bakteriler, küf ve maya üremesi gösterir. Sorumlu

mikroorganizmalar koruyucu maddelere yüksek derecede dirençli olmadıkları gibi çok çeşitli organik bileşikleri substrat olarak kullanarak ürün içinde çoğalırlar (41).

3. Katı maddeler : Kozmetik preparatın içine konulacak katı maddeler gaz veya ısıtma işlemlerinden geçirildikten sonra formülasyona girmelidir. Aksi durumda ürüne konulması gereken katı maddeler (bentonit, kil, tebeşir, kaolin) anaerop sporlu basiller, küfler veya gram negatif bakterilerin üremesine imkan sağlar. Bu üreyen mikroorganizmalar ürünü kullanılamaz hale getirir (41).

4. Cihazlar ve bina: Üretimde kullanılan cihazlar daima mikrobiyal kontaminasyon riski taşırlar. Cihazdan bulaşma, sadece üretim tankından değil, üretim sırasında kullanılan borular ve transfer şişelerinden de ortaya çıkabilmektedir. Mikroorganizmalar spor formunda, özellikle plastik maddelerin yüzeylerinde ve köşelerinde sessiz kalarak, çoğalmaları için gereken koşulların oluşumunu bekleyebilirler. Ekipmanlarda en çok bulunan bakteriler *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus spp.*'dir. Tavanlarda ve duvarlarda ise çoğunlukla küfler bulunur (14, 41).

5. Üretim sonrası kirlenme: Bir ürün aseptik şartlar altında işlem görmüş ve üretim sırasında kontamine olmamış olsa bile, kaplara dağıtıldığı zaman hala mikroorganizmalarla karşılaşabilir. Ürünün son paketlenmesi sırasında da kontaminasyon gerçekleşebilir (41).

6. Kullanım sırasında kirlenme: Başarılı bir üretim ve paketleme sonrasında bile tüketici kullanımı süresince ürün kontamine olabilmektedir. İnsan vücudunun normal florasının bir kısmında mikroorganizmalar yer alır. Geniş ağızlı bir kavanozda bulunan krem veya losyona, tüketicinin kirli parmaklarının değmesi ile mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bundan başka, şampuanı daha uzun süre kullanmak veya daha kolay alınmasını sağlamak amacıyla, tüketicinin su eklemesi sonucunda ürün yine kontamine olabilmektedir. Ambalaj şekli ürünün tüketici kaynaklı veya çevresel kontaminasyonuna karşı çok önemli rol oynar (14, 41, 42, 43).

7. Personel: Tesislerdeki en büyük kontaminasyon kaynaklarından biri de personeldir. Kozmetik ve tuvalet ürünlerinin üretiminde görev alacak personel, hijyen kurallarına göre eğitilmiş olmalıdır. Personel hijyeni yeterince yerine getirilemezse, bitmiş ürüne zararlı mikroorganizmaların bulaşma olasılığı artar. Personelin bulaşıcı bir hastalığı olmamalı ve vücudunda açık yaralar bulunmamalıdır. Akne ve diğer deri hastalıklarına sahip personel, kontaminasyon riskini arttıracığından, dikkatli olunmalıdır. Personel, çalışma sırasında, koruyucu giysiler, bone ve eldiven giymelidir. Üretim alanında giyilen bu kıyafetler dışarıda giyilmemeli ve günlük kıyafetlerinde içerde giyilmesine izin verilmemelidir. Üretim ve dolum alanlarının hemen dışında el yıkama bölümleri bulunmalıdır. Ayrıca, günlük giysileri değiştirmek amacıyla hazırlanmış odalarda sigara içilmemeli, yiyecek ve içecek tüketilmemelidir. Gerekğinde, personel hijyeni çeşitli testlerle izlenebilmelidir (1, 7).

4.4. Mikrobik Kirlenmenin Steril Olmayan Kozmetikler ve Tuvalet Malzemeleri Üzerindeki Kontrolü

Kozmetikler ve tuvalet malzemeleri de ilaçlar gibi imalat esnasında bir kalite güvence sistemine tabi tutulmalıdır. Ürün güvenliği;

- 1-İçerisine koruyucu maddelerin ilavesi,
- 2-Kontaminasyonu engelleyen paketlenme teknikleri ile sağlanır.

Steril olmayan endüstriyel ürünler içerisinde mikroorganizmalar tüm önlemlere rağmen üreyebilir. Önemli olan bu üremenin miktarıdır. O halde steril olmayan ürünlerin kabul edilebilir mikrobik kirlenme standartları olmalıdır. Bu konuda ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır. İlk uygulamalar, imalatın hijyenik bir ortamda yapılması ve içerisine koruyucu madde ilavesi ile sınırlıydı. Bu yöndeki çalışmalar 20 yılı aşkın bir süre devam ettikten sonra mikrobiyolojik kirlenme limitleri oluşmuştur. Ancak bu limitler esnektir ve ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (7).

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı Kozmetik Yönetmeliği’nin kriterleri ise şöyledir: Kozmetik ürünlerin gram veya mililitresinde en fazla bulunabilecek mikroorganizma miktarları; bebekler için kullanılan kozmetiklerde ve göz çevresi veya gözle temas eden kozmetiklerde 100 mikroorganizma; ağız çevresinde kullanılanlarda ve diğer kozmetiklerde 1000 mikroorganizmadır (41).

Koruyucu maddelerin eklenmesi ile ilgili öneriler şunlardır:

İmalat ve bireysel kullanım aşamasında oluşabilecek mikrobik kontaminasyonu gidermek için ortama koruyucu madde ilavesi gereklidir. Öncelikle üretimde ve kullanım da hangi tip mikroorganizmaların kontaminasyon kaynağı olabileceği ve bunlara karşı hangi maddelerin etkili olabileceği ön çalışmalarla belirlenmelidir. Koruyucular, ürünün genel üretim prosedürünü bozmayacak şekilde uygulanmalıdır. Örneğin, ürünün yoğunluğuna ve bütünlüğüne zarar vermemelidir. Koruyucu maddenin miktarı ve çeşidi üründen ürüne ve kontaminasyon etkeni türüne göre değişkenlik gösterir (7).

Kozmetik ve banyo ürünleri mikrobiyal kontaminasyona açıktır. Bu yolla yayılabilen mikroorganizmalardan bazıları: *Clostridium tetani*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*’dır (7).

Bildirilen kontaminasyon olguları arasında talk pudrası ile yayılan *C. tetani* infeksiyonları, sıkça kullanılan el kremleri aracılığı ile de *P. aeruginosa* infeksiyonları bulunmaktadır. Ayrıca göz kozmetik ürünlerinin sıkça kullanıldığı bir bölge olduğundan infeksiyonlara açıktır. Bu bölgede genellikle *Fusarium* türleri hafif seyirli infeksiyona neden olurlar. Göz bölgesinde *P. aeruginosa* infeksiyonlarına da rastlanır. Özellikle kontamine olmuş maskara kullanımına bağlı olarak kornea tabakasında infeksiyon oluşur. Bu açıdan kozmetik ve banyo ürünlerinin korunması için koruyucu maddelerin doğru seçilmesi ve etkinliklerinin belirlenmesi gerekir (7).

4.5. Kozmetik Ürünlerde Saptanan Mikrobiyal Flora

Son yıllarda gerek ilaçlar gerekse kozmetik preparatların mikrobiyal kontaminasyonları giderek önem kazanmış ve bu konuda bilimsel çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur (42).

Kozmetik ürünlerden şampuanlarda: *P. aeruginosa*, diğer *Pseudomonas*lar, koliform basiller, *Burkholderia cepacia*; krem ve losyonlarda: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, ve küf; tıraş kremlerinde: *S. aureus* ve *Staphylococcus spp.*; dudak boyalarında: küf; pudralarda: küf üremesi saptanmıştır (14, 41).

Kozmetik ürünlere bulaşan mikroorganizmalar çeşitli hidrolitik enzimleri kullanarak, üründe bulunan maddeleri metabolize ederler. Bunun sonucunda üründe renk değişimi, koku ve/veya gaz oluşumu ve viskozite değişiklikleri görülür (41).

4.6. Koruyucuların Güvenlik Değerlendirmesi

Antimikrobiyal koruyucular mikroorganizmaya toksik olduğu kadar kullanıcıya da toksik olabilir. Koruyucular genelde düşük konsantrasyonda kullanılırlar. Ancak kozmetiklerin uzun süre kullanılmaları sonucu formülasyonlarında bulunan koruyucu tüketicide akut toksik seviyeye ulaşarak birikme neden olabilir. Bazı koruyucular aminler ile ya da amidlerle reaksiyona girip karsinojenik nitrozaminleri oluştururlar. Aynı şekilde çözündüğünde serbest nitrit oluşturan bronopolünde karsinojenik etkileri açısından dikkatli kullanılması önerilmektedir (7).

Ancak fareler ve sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda bronopolun mutajenite oluşturmadığı ve karsinojen etkisinin olmadığı gösterilmiştir (7).

Metil ve propil parabenin hayvanlarda yapılan deneylerinde mutajenik ve karsinojenik olmadığı gösterilmiştir (18, 25).

Klinik öncesi toksikoloji çalışmaları diazolinidil ürenin göz ve ciltte irritasyon oluşturmadığını ve mutajenik, toksik, teratojenik, klastojenik olmadığını göstermiştir (44).

Sodyum benzoatın fare ve sıçanlarda (175/mg/kg/gün), hamsterlarda (300/mg/kg/gün) ve tavşanlarda (250/mg/kg/gün) teratojenik etkisinin olmadığı bulunmuştur (32). Sodyum benzoat ve benzil alkolün in vivo çalışmalarda genotoksik olmadığı ve uzun süreli karsinojenite çalışmalarında da karsinojenik olmadığı gösterilmiştir (www.inchem.org/documents/sids/sids/BENZOATES.pdf, Erişim tarihi:19.09.2010). Benzoik asitin mutajenite oluşturmadığı bulunmuştur (32).

Fenoksietanolün Ames testte mutajenik olmadığı bulunmuştur (45).

Potasyum sorbatın hamile fare (460/mg/kg) ve sıçanlarda (340/mg/kg) teratojenik olmadığı gözlenmiştir (46). Ferrand ve ark. potasyum sorbat'ın HeLa hücrelerinde ve plazmid DNA'larında mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olmadığını bulmuşlardır (47).

Metilizotiazolinon/Metilkloroizotiazolinonun (MI/MCI) karışımı içeren içme suyu çalışmasının sıçanlarda karsinojenik olmadığı bulunmuştur (48).

Kozmetiklerin içinde bulunan dehidroasetik asitin çok sayıdaki klinik çalışmalarda hemen hemen irritan, fototoksik, sansibilize olmadığı bulunmuştur. Akut toksisite çalışmaları ise dehidroasetik asidin sıçanlara oral yolla uygulandığı zaman biraz toksik olduğunu göstermiştir. Çok sayıdaki çalışmalarda mutajenik olmadığı bulunmuştur (49).

4.7. Koruyucu Etkinlik Testleri Hakkında Genel Bilgiler

Koruyucu etkinlik testleri, kozmetik preparatların güvenilirliğinde ve tüketici tarafından kabul edilmesinde çok önemli yer tutarlar (1).

Koruyucu etkinlik testi ya da challenge test, kozmetik ürünleri ve farmasötik ürünlerde üretim ya da tüketici kullanımı sırasında meydana gelen olası kontaminasyonu önlemede uygun koruyucu ve onun minimum etkili olduğu konsantrasyonu belirlemede kullanılmaktadır (11, 40, 50).

Ürüne çok az miktarda koruyucu konulduğunda, ürünün yapısında fiziksel ve kimyasal değişiklikler (renk, koku, viskozite gibi) ile tüketicide mikrobiyal kirlenmeye bağlı enfeksiyonlar görülebilir. Bu nedenlerle, koruyucu etkinlik testleri, ürünün güvenle kullanılabileceği konsantrasyonu seçmenin yanı sıra, ürünün fiyatının gerektiğinden fazla olmaması için de yapılması gerekli testlerdir (1).

Koruyucu etkinlik testleri, laboratuvar, pilot üretimde ve son üründe yapılmalıdır. Ayrıca, seçilen koruyucu sistemin kararlılığı saklama süresince yeterli olmalıdır. Kararlılık yeterli olmazsa koruyucu etkinliğinde değişiklikler görülebileceği gibi formülasyonun kararlılığı da bozulur (1).

Günümüzde endüstride kullanılan koruyucu etkinlik testlerinin birkaç metodu vardır. Bu metodlar şunlardır: Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopoeia-USP), İngiliz Farmakopesi (British Pharmacopoeia -BP), Kozmetik ve Tuvalet Koku Birliği (Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association-CTFA), Japon Farmakopesi (Japanese Pharmacopoeia-JP), Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia-EP) (1, 7, 11, 14).

Kozmetikler ve temizlik malzemeleri TGA (Toilet Goods Association) ve SCC (The Society for Cosmetic Chemist) de belirtilen prensiplere göre test edilmelidir. TGA'daki testlerde koruyucu içeren numuneler ve kontrol olarak koruyucu içermeyen numuneler ile çalışılır. Formülasyonlar minimum 28 gün süreyle kendi

yapılarına ve istenilen kullanıma göre incelenirler. Bir formülasyonda 7 gün sonunda fazla mikroorganizma saptanması onun yetersiz korunduğunu düşündürebilir. 14. gün sonunda tahmini karar, 28. günde ise son karara varılır. SCC tarafından önerilen test organizmaları bakteri, maya ve küflerden oluşur. Bakteriler 35-37°C, mayalar 32°C, küfler ise 22-25°C'de inkübe edilirler. BP ve USP'de test organizma, ürüne bir kez inoküle edilir (tek inokülasyon). Koruyucu etkinlik testlerinde baştaki test organizmasının öldürülme oranının belirlenmesi ile koruyucu aktivitesi tayin edilmektedir. Ürüne inokülasyon yapılmasından sonra geçen süre sonunda gram başına düşen canlı mikroorganizma sayısı logaritmik hesaplanır (7).

Kullanılan yöntemlerde, test örneğini farklı mikroorganizmalar ile bir araya getirdikten sonra, test örneğinde kalan, yaşayan mikroorganizma sayısını belirlemek üzere, farklı zamanlarda aerobik plak sayımı yapılarak koruyucu etkinliği saptanır (1).

4.8. Koruyucu Etkinlik Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar Hakkında Genel Bilgiler

Kozmetiklerin steril olma zorunluluğu yoktur. Ancak üründe bulunan mikroorganizmalar düşük sayıda ve patojenik olmamalı, ürünün raf ömrü içerisinde bozulmasına sebep olmamalıdır (42). Kozmetikler mikroorganizmalarla kontamine olursa, üründe bozulmaya ve eğer patojenik mikroorganizma olurlarsa tüketicide ciddi sağlık sorunlarına sebep olurlar (51). İnsan sağlığı açısından önem taşıyan ve kozmetikte bulunması istenmeyen patojen mikroorganizmalar *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* ve diğer *Clostridium*'lar, *C. albicans* ve *A. niger*'dir (42).

Koruyucu etkinlik testi için ideal mikroorganizmalar, üretimde ki hatalardan ya da tüketici kullanımından kaynaklanan olası kontaminantları temsil eder. Çünkü mikroorganizmalar fırsatçı infeksiyonlara ve koruyuculara direnç geliştirmeye sebep olabilirler (52).

Tablo 2: Kozmetik ve tuvalet ürünlerinden izole edilen bazı mikroorganizmalar (43)

Bakteri	Mayalar	Küfler
Gram pozitif:		
<i>Bacillus</i> (spor formu)	<i>Candida</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Monilia</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Torula</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Streptococcus</i>		<i>Geotrichum</i>
		<i>Penicillium</i>
		<i>Rhizopus</i>
Gram negatif:		<i>Thamnidium</i>
<i>Acinetobacter</i>		<i>Trichothecium</i>
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Burkholderia</i>		
<i>Enterobacter</i>		
<i>Escherichia</i>		
<i>Proteus</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Serratia</i>		

İnokülasyonun *P. aeruginosa* ve *A. niger*'i kapsamı tavsiye edilir çünkü formülasyonların büyük çoğunluğunda çoğu zaman rastlanılır ve antimikrobiyal ajanlara nispeten dirençlidirler (22).

Gram negatif bakterilerden, özellikle *Pseudomonas spp.*, kullanılmamış kozmetiklerden sıklıkla izole edilen mikroorganizmadır. Kullanılmış kozmetiklerden çoğunlukla ciltte bulunan ve sıklıkla kontaminasyona sebep olan mikroorganizmalar stafilokok, difteroidler ve mikrokoklar izole edilirler. Ancak, maya ve küflerle hep karşılaşılır (50).

Koruyucu etkinlik testlerinde genellikle kullanılan mikroorganizmalar şunlardır:

Bakteri: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella choleraesuis*, *Proteus vulgaris*.

Maya: *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*

Küf: *A. niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Penicillium expansum*, *Cephalosporium spp.*(1).

4.8.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar gram pozitif küre şekilli, sporsuz, hareketsiz, genellikle kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren fakültatif anaerobik bakterilerdir. Gram pozitif koklar çapı 0.5-1.5 µm, tek, çift, kısa zincirler şeklinde görülebilir. Cinse ait bir özellik olarak bu küreler kümeler oluşturarak üzüm salkımı şeklinde görünürler. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C'dir (53, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR>, Erişim tarihi: 15.06.2010).

Staphylococcus cinsi içinde en önemli insan patojeni *S.aureus*'tur (54). Koagülaz testinin pozitifliği *S. aureus*'u insanda bulunan diğer stafilokok türlerinden ayırır (53).

S. aureus insanlarda birçok enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Ortam şartlarına dayanıklı olduklarından doğada çok yaygındırlar. İnsanlarda enfeksiyon yapan patojen stafilokokların kaynağı yine insanlardır. Doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışkılarında, ciltte apseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak bulunurlar. Gıdalarda ve gıda işletmelerinde, elle gıda hazırlayanlarda, hastane personeli ve hastane ortamlarında da yaygın olarak bulunurlar. Nazal stafilokoklar, taşıyıcılarla çevreye yayılarak tehlike oluştururlar. Taşıyıcı olan ve özellikle gıda sektöründe bizzat elleriyle gıda hazırlayanlar stafilokok besin zehirlenmelerinin önemli kaynağıdırlar (55).

Ciddi ve hayatı tehdit edici enfeksiyonlar başta olmak üzere, antibiyotik seçimi ve kullanımında bu mikroorganizmadaki yüksek ve geniş spektrumlu direnç nedeniyle sorunlar yaşanmaktadır (56).

Kozmetik ürünlerin koruyucu etkinlik test metodunda *S. aureus* kullanılır çünkü bu mikroorganizma tüketici için tehlike yaratan yaygın kontaminantlardandır (52).

4.8.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır. Çoğu kez bir uçlarında bir veya nadiren iki veya üç adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Gram negatif, 1.5-3 µm uzunluğunda ve 0.5µm genişliğinde, çiftli veya kısa zincirler halinde görülen bakterilerdir (www.mikrobiyoloji.org/TR, Erişim tarihi: 15.06.2010).

Laboratuvarda rutinde kullanılan bütün besiyerlerinde kolayca ürerler ve 3-5 mm büyüklüğünde kenarları düzensiz, üzeri düz beta-hemolitik koloniler oluştururlar. Genellikle 30-37°C'ler de ürerler (53, www.mikrobiyoloji.org/TR, Erişim tarihi: 15.06.2010).

P. aeruginosa son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (57).

P. aeruginosa, farklı fiziksel koşullara uyum yeteneği yüksek olan bir mikroorganizmadır ve bu özellikleri ile hastane ortamında önemli bir fırsatçı patojen rolüne sahiptir. İnsanda, perine, aksilla, kulak gibi bölgelere kolonize olabilmektedir. Nemli ortamları tercih etmesi nedeniyle hastanelerde solunum destek sistemlerinde, temizleme solüsyonlarında, ilaçlarda ve dezenfektanlarda üreyebilmektedir (58).

P. aeruginosa, özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane infeksiyonlarına neden olabilen önemli bir patojendir (59).

Bilindiği gibi çoğu zaman rastlanan bir patojendir ve birçok koruyucuya yüksek direnç gösterir (52).

Amerikan Farmakopesi *P. aeruginosa* için ATCC 9027 suşunu önerirken, CTFA ise *P. aeruginosa* ATCC 15442 ve ATCC 13338 suşlarını önermektedir (52).

4.8.3. *Escherichia coli*

Escherichia, *Enterobacteriaceae* familyası üyesidir (www.mikrobiyoloji.org, Erişim tarihi: 15.06.2010).

E. coli peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif olarak ürer. Optimal üreme 37°C’de, nötral reaksiyonda ve oksijen varlığında olur. Bu koşullarda logaritmik üreme fazında bakteri 20 dakikada ikiye bölünebilir (jenerasyon üresi) (53).

E. coli gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Logaritmik üreme fazında genellikle 2-4 µm boyunda, ortalama 1 µm eninde ise de eski kültürlerde ve bazen idrarda daha uzun filamanlar şeklinde görülebilir (53).

Birçok koliform bakteri kolayca biosit direnci geliştirebilir. *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Proteus spp.* bazen *E. coli* yerine kullanılır (52).

CTFA ve Amerikan Farmakopesi yöntemlerinde *E. coli* ATCC 8739 suşunu tavsiye etmektedir (52).

4.8.4. *Candida albicans*

Kandida türleri doku ve kültürlerde oval şekilli ve 10-12 µm çapında ökaryotik mikroorganizmalardır. Kandidalar maya hücreleri veya yalancı hifler yapar ve tomurcuklanarak çoğalırlar. Tomurcuklanma ile meydana gelen yavru hücre ana hücrenin aynısıdır ve ana hücreden ayrılabilir ya da ayrılmaz. Ayrılmayan hücre tomurcukları zincir yaparak yalancı hif oluşturur (60).

C. albicans; ağız mukozasında, deride ve vajende normal florada bulunabilir. Enfeksiyonun gelişimi için mantara ve konağa ait faktörler önemli rol oynar. İnsanda *Candida* enfeksiyonlarının en az %90'ı *C. albicans* tarafından geri kalanı *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve başlıca bazı türler tarafından oluşturulur. Direkt Gram preparatlarında *C. albicans* gram pozitif, tomurcuklanan, 5µm çapında oval mayalar olarak görülür. Gram pozitif boyanan yalancı hifler izlenir. Çoğu kez bölmeli misellerde bulunur (61).

Koruyucu sistemlerde hem mayaların direncini gösterir hem de patojeniktir. Amerikan Farmakopesi ATCC suşundan 10231'i tavsiye ederken, CTFA spesifik bir ATCC suşu tavsiye etmemektedir (52).

4.8.5. *Aspergillus niger*

Aspergillus türleri doğada küf halinde bulunur, bunlar dimorfik mantar değildirler. V şeklinde çatallanma gösteren septalı hiflere sahiptir (62).

Aspergillus cinsine ait mantarlar doğada yaygın olarak hemen her yerde bulunurlar. Bu etkenlerin çoğu saprofit olmakla birlikte, özellikle bazı türleri insan ve hayvanlarda alerjik reaksiyonlara, önemli lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır (63). *Aspergillus* türlerinin salgıladığı çeşitli proteazlar konakçının bariyer yapısını bozarak dokuda mantarların yayılımını sağlarlar (53).

A. niger genellikle kontaminant bir tür olarak kabul edilmekle birlikte, immün yetmezliği olan canlılarda diğer etkenlerle birlikte ikincil olarak bazı infeksiyonlara neden olabilmektedir (63).

Farmasötik ürün bileşimlerinde *Penicillium* ve *Aspergillus spp.* gibi filamentöz mantarlar büyük bir kontaminasyon sebebidir. Amerikan Farmakopesi *A. niger* ATCC suşundan 16404'ü tavsiye ederken, CTFA *A. niger* ATCC 9642 suşunu tavsiye etmektedir. Ayrıca CTFA, *A. niger* ATCC 9644 suşunu da önerir (52).

4.9. Saç Kozmetikleri Hakkında Genel Bilgiler

İnsanların dış görünümü ve kendilerine olan güvenlerinin sağlanmasında güzel ve pürüzsüz bir cilt görünümü kadar saçlarında önemli rolü vardır (64, www.huksam.hacettepe.edu.tr/Turkce/SayfaDosya/kozmetikler_ve_kadin.pdf, Erişim tarihi: 15.03.2010).

Modern dünyada giderek sıklaşan ticari, sosyal, bireysel ilişkilere de insanların birbirini etkileme isteği saç bakımı ve temizliğinin de önemini arttırır. İnsanların sağlıklı ve bakımlı saçlara sahip olması ve saç stili onların içinde bulundukları ortamlarda olumlu etki bırakır. Ancak günlük yaşantımız içinde tarama, fırçalama ve kurutma gibi uygulamalar sonucunda ya da çevresel faktörlerin etkisi ile saçlarımız hasar görebilir. Düzenli bir saç bakımı ve saç kozmetiklerinin akılcı kullanımı ile bu hasar azaltılarak iyi bir şekilde muhafaza edilmesi sağlanabilir (64, www.huksam.hacettepe.edu.tr/Turkce/SayfaDosya/kozmetikler_ve_kadin.pdf, Erişim tarihi: 15.03.2010).

Saç bakım ürünleri 4 ana grupta toplanabilir: (65)

1. Temizlik amacıyla kullanılanlar:

Şampuanlar

2. Saça şekil veren preparatlar:

2. 1. Geçici şekil verici ve şekli koruyucular:

- Saç kremleri
- Jöleler
- Köpükler
- Losyon ve çözeltiler
- Biryantinler
- Spreyler

2. 2. Kalıcı şekil veren preparatlar:

- Perma preparatları
- Saç düzelticileri

3. Renk değiştirici preparatlar:

- Saç rengini açıcılar
- Saç boyaaları

4. İyileştirici saç bakım ürünleri:

- Losyonlar
- Tonikler

4.9.1. Şampuanlar

Saçı ve saç derisindeki yağları temizleme, kepek, kir ve kokuyu giderme, insanın en temel ihtiyaçlarındandır (3). Şampuanlar, genel anlamıyla saç ve kafa derisini temizleme ürünleridir. Modern terminolojide ise, temizlemenin yanı sıra saçın iyi şekillenmesini sağlayan maddelerle saç ve saçlı deri hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelerdir. Vücudun korunmasında saçın, dolayısıyla şampuanların önemli bir yeri vardır. Temel amaçları, saç ve saçlı deriye zarar vermeden kirliliklerin uzaklaştırılmasıdır (65).

Kozmetik müstahzarlar arasında en komplike olan karışımlar şampuanlardır. Kozmetik sanayinde şampuan formüllerini mükemmelleştirmek ve saçlar için daha elverişli bir hale getirmek amacıyla devamlı olarak yeni maddeler kullanılmaktadır (3).

Şampuan en yaygın olarak kullanılan kozmetik üründür denilebilir. Saç bakım ürünleri pazarında satışların yaklaşık %50'si şampuanlara aittir. Bunun başlıca nedeni, saç güzelliği ve bakımına verilen önemden çok artık saç temizliğinde en çok kullanılan ürün olmasıdır. Belli bir kesim için sadece temizlik amaçlı kullanılan şampuanlar, günümüzde bazı kesimler içinse artık estetik kaygılarla saç beslemeye, korumaya, şartlandırma gibi özel amaçlara yönelik ya da kepek, psoriasis, saç dökülmesi gibi hastalıkların tedavisi için kullanılan medikal etkin maddeler için taşıyıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır (65).

Günümüz tüketicisi artık şampuanlardan genel fonksiyonundan daha fazlasını beklemektedir ve kozmetik bir fayda talep etmektedir. Saçın kolay taranması, statik elektrik ile yüklenmemesi, kolay şekil verilmesi, yıkandıktan sonra parlak ipeksi saçlar istenmektedir (65).

Özel amaçlı şampuanlarda, yüzey aktif maddeler, şekil verici maddeler, viskozite ve pH ayarlayıcı ajanlar, koruyucu maddeler gibi temel şampuan maddelerine ilaveten vitaminler, protein hidrolizatlar ve aloe vera jeli gibi amaca uygun daha

başka maddeler de bulunmaktadır. Şartlandırıcı maddelere verebileceğimiz diğer örnekler: yağ asitleri amidleri (lauramid DEA), esterler ve trigliseridler (glikol stearat, PEG-150 distearat, jojoba yağı), kuaterner amonyum bileşikleri (setil trimetil amonyum klorür), protein türevleri (hidroliz edilmiş hayvansal protein), amfoterik maddeler (oleil betaine), lanolin türevleri (PEG-75 lanolin), propilen glikol, gliserin, setil alkol, silikon türevleridir (65).

Etken maddesi anyonik olan şampuanlar ve etken maddesi katyonik olan saç kremleri içerikleri nedeniyle “kuvvetli iritan” özellik gösterirler. Buna bağlı olarak da mikroorganizma üremesinin az olabileceği düşünülebilir. Ancak, içlerine konan diğer yardımcı maddelerin hemen hepsi mikroorganizmaların üremesi için uygun besinlerdir (66).

Koruyucu olarak şampuan formüllerine metil/propil paraben, bronopol, imidazolinidil üre, benzil alkol ve formaldehit eklenmektedir. Formaldehit kullanımı yerini başka maddelere bırakmıştır. Şampuan formüllerine boyar maddeler, parfümler ve EDTA gibi ağır metalleri bağlayıcı kompleks oluşturucular eklenir (2).

Şampuanlar kullanıldığı zaman sulandırılır, çabucak yıkanır ve bu yüzden genellikle başın derisiyle temas süresi kısadır. Bu faktörler şampuanın duyarlılık etkisini azaltır (67).

4.10. Kozmetik Ürünlerde Yapılan Kararlılık Testleri

Kozmetik ve tuvalet ürünlerinin, üretimleri sırasında, kullanıcıya sunulduklarında ve rafta bekledikleri süre boyunca etkilerinde bir değişiklik olmamalı, beklenmeyen yan etkiler oluşturmamalıdır (1).

Kararlılık testlerinin amacı, ürün için saklama koşulları ve raf ömrü belirlenmesinde kullanılabilecek verileri elde etmektir. Kararlılık-geçimlilik test programı yapılırken, testin amaçları açıkça tanımlanmalı ve test belirlenen amaçlara etkin yolla ulaşacak şekilde düzenlenmelidir. Bütün kararlılık testlerinde standart bir

program uygulamak etkili olmaz. Test sonuçlarının en kısa sürede alınabilmesi için hızlandırılmış test koşulları kullanılır. Hızlandırılmış koşullar aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

1. Yüksek sıcaklık: Saklama sıcaklığındaki her 10°C'lik artış, reaksiyon hızının iki katına çıkmasına neden olarak değişiklik oluşma hızını arttırır. Hızlandırılmış test sonuçlarını değerlendirmek için, en az üç farklı sıcaklıkta çalışılır. Genel olarak 4°C, 25°C, 37°C ve 45°C'de çalışılır. Bu konuda önemli olan, birbirinden yeterince farklı sıcaklık aralıklarını seçmektir (1).

2. Yüksek nem: Yüksek nemde yapılan testler, genellikle ambalajın ürünü korumadaki etkinliğini test etmek amacıyla yapılır. Bu amaçla en fazla %80 rölatif nemde çalışılması önerilir. Yüksek nem içeren ortamlarda çalışırken, sıcaklığıda yükseltmek gerekir. Bu nedenle, testlerin yapıldığı ortam koşulları, 37°C-%80 rölatif nem olarak düzenlenir (1).

3. Donma/ısınma testleri: Çözelti, emülsiyon, krem ve diğer sıvı yarı katı preparatlarda yapılması istenen bir testtir. -30°C ile oda sıcaklığı, 24 saat süreyle değiştirilerek yapılır. En az 6 döngü yapılması önerilir. Kontrol preparatları kullanılarak, emülsiyon kararlılığı, kristalizasyon, çökme ve bulanıklık gibi durumlar incelenir (1).

4. Işık etkisi: Ürünler, rafta veya kullanım sırasında ışığa maruz kaldıkları için, ışık etkisinin araştırılması gereklidir (1).

5. Mekanik testler: Uygun titreşim aletiyle, birkaç saat gibi kısa bir sürede yapılan bu testler, toz ve granüler preparatlarda ayrışma olup olmayacağını ve emülsiyonlarda kararlılığı test etmek amacıyla yapılır (1).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmamızda kullanılan mikroorganizma kökenleri Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Escherichia coli ATCC 8739

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

5.1.2. Besiyerleri

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck)

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck)

Potato Dekstroz Agar (PDA) (Merck)

5.1.3. Çözeltiler

% 0.1 peptonlu su

% 0.9 NaCl

% 0.9 NaCl ve % 0.1 pepton çözeltisi

5.1.4. Şampuan

Çalışmamızda kullanılan koruyucu eklenmemiş şampuanın pH'sı 5.80 olup, Biota Laboratuvarları'ndan temin edilmiştir.

5.1.5. Koruyucular

Çalışmamızda kullanılan A koruyucusu % 4.50-5.50 bronopol, % 4.50-5.50 propil paraben, % 13.50-16.50 metil paraben ve % 72.50-77.50 fenoksietanol karışımından oluşur ve Veser Kimyevi Maddeler A.Ş.'den temin edilmiştir.

B koruyucusu % 18-22 diazolinidil üre, % 18-22 sodyum benzoat ve % 9-11 potasyum sorbat karışımından oluşur ve Parkoteks Kimya San. ve Tic. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir.

C koruyucusu % 80 ± 1.0 fenoksietanol, % 12 ± 0.5 benzoik asit ve % 8 ± 0.3 dehidroasetik asit karışımından oluşur ve International Corp. Türkiye Şubesi'den temin edilmiştir.

D koruyucusu % 31 ± 1.0 propilen glikol, % 13 ± 0.5 benzil alkol ve % 1.25 ± 0.1 metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon karışımından oluşur ve International Corp. Türkiye Şubesi'den temin edilmiştir.

A koruyucusu pH 4.50 – 8.50 arasında stabil olup, % 0.3- 0.7 konsantrasyonda kullanılır ve propilen glikol, etanol ve asetonunda çözünür.

B koruyucusunun kullanıldığı bitmiş ürünün pH'ı 3.00 – 7.00 arasında olmalıdır. Bu koruyucu % 0.2- 1.0 konsantrasyonda kullanılır ve propilen glikolde çözünür.

C koruyucusu pH < 6.00 altında, % 0.3- 1.0 konsantrasyonda kullanılır. Su bazlı sistemlerde önerilen miktarında kullanıldığında çözünür.

D koruyucusu pH < 8.00 altında, % 0.10- 0.12 konsantrasyonda kullanılır. Propilen glikolde çözünür.

Şampuan propilen glikol ve su ihtiva ettiği için, şampuan bazına çalışmada kullanılan koruyucular ayrı ayrı 3 farklı konsantrasyonda (ticari olarak belirlenmiş konsantrasyonun alt ve üst sınırları ile sınırlar arasında kalan miktarlar) eklenmiştir.

5.1.6. Kimyasal Maddeler

NaCl₂ (Merck)

Pepton (Merck)

Polisorbat 80 (Merck)

Distile Su

5.1.7. Cihazlar ve Gereçler

Hassas terazi (Precisa)

Etüv (Binder-Nüve)

Pastör Fırını (Binder)

Otoklav(Hirayama)

Mikroskop (Olympus)

Otomatik pipetler (5-50 mikrolitre, 100-1000 mikrolitre) (Brand)

Plastik Pastör pipeti (3ml'lik) (Isolab)

Otomatik pipet uçları (sarı-mavi) (LP)

pH metre (WTW)

Enjektör (2.5, 5, 10 ml) (Hayat)

Petri kutuları (Fırat Plastik)

Santrifüj (Nüve)

Manyetik Karıştırıcı (IKA)

Mekanik Karıştırıcı (IKA)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Uğur)

Su banyosu (Nüve)

Otoklav poşeti (Isolab)

McFarland Cihazı (Biosan)

İdrar beheri (Fırat Plastik)

Steril plastik tüp (LP)

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Amerikan Farmakopesi (USP)

Amerikan Farmakopesi, ürünleri sahip oldukları kabul kriterlerine göre 4 farklı kategoriye ayırır. Bu kategorilerden (1) enjektabiları, (2) topikal kullanılan ürünleri, (3) oral kullanılan ürünleri ve (4) su bazlı yapılan antiasitleri içerir (68).

Çalışmamızda kullanılan şampuan kategori (2)'de yer alır. Ürünler ağzı kapalı kaplarda $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir (68).

Testte *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 kökenleri kullanılır. Mikroorganizma kökenlerinden taze kültürler hazırlanır. Bakteriler TSA'da $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat, maya SDA'da $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 'de 44-52 saat ve küfler ise SDA'da $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 'de 6-10 günde üretilir. Bakteri inokülasyonunda steril FTS (%0.9 NaCl₂), küf inokülasyonunda ise % 0.05 polisorbat 80 içeren steril FTS kullanılır. Her mikroorganizma için inokülasyon miktarı % 1'i aşmamalıdır ve her ürün 10^5 - 10^6 kob/gr mikroorganizma ve küf sporu ile inoküle edilmelidir. 0., 14. ve 28. gün ürünlerden ekim yapılır. Değişiklikler her mikroorganizma için ml başına üreme gözlenen koloninin logaritmik değerlendirilmesiyle olur (68).

Bakterilerde 14. günkü sayımda başlangıç sayımından en az 2 logaritmik azalma olmalı, 28. günkü sayımda 14. güne göre artış olmamalıdır. Maya ve küfte ise 14. ve 28. günkü sayımlarda başlangıç sayımına göre artış olmamalıdır (68).

5.2.2. İngiliz Farmakopesi (BP)

İngiliz Farmakopesi ürünleri dört kategoriye ayırır. Kategori 1’de parenteral ve oftalmik preparatlar, kategori 2’de oral preparatlar, kategori 3’te topikal preparatlar ve kategori 4’te de kulak preparatları yer alır. Çalışmamızda kullanılan şampuan kategori 3 altında yer almaktadır (69).

Testte *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 kökenleri kullanılır. Teste hazırlıkta bakteriler TSA besiyerine ve mantarlarda SDA besiyerine pasajlanır. Bakteri kültürleri 30-35⁰C’de 18-24 saat, *C. albicans* 20-25⁰C’de 48 saat ve *A. niger* 20-25⁰C’de 1 hafta ya da iyi sporulasyon sağlanana kadar inkübe edilir. Bakteriler ve *C. albicans* sodyum klorür (%0.9 NaCl₂) ve pepton (%0.1) içeren steril suda inoküle edilir ve ml başına mikroorganizma miktarı 10⁸ olarak ayarlanır. *A. niger*’de kültür hücreleri %0.05 polisorbata 80 ve sodyum klorür (%0.9 NaCl₂) içeren steril suda, ml başına düşen spor miktarı 10⁸ olarak ayarlanır. Her mikroorganizma için inokülasyon miktarı % 1’i aşmamalıdır ve her ürün 10⁵- 10⁶ kob/gr mikroorganizma inoküle edilmelidir. İnokülasyon yapılmış ürünler ışıktan uzakta ve 20-25⁰C’de muhafaza edilmelidir. Ürünün gramı ya da ml’si başına düşen mikroorganizma miktarı, inkübasyondan sonraki 48. saat, 7., 14. ve 28. günlerde hesaplanır (69).

Topikal ürünler için, bakterilerde 48 saat içinde, başlangıç sayımına göre en az 3 logaritmik azalma olmalıdır ve 7., 14. ve 28. günlerde artış olmamalıdır. Mantarlarda ise 14. günde 2 logaritmik azalma ve 28. günde artış olmamalıdır (69).

5.2.3. Japon Farmakopesi (JP)

Japon Farmakopesi kozmetik ürünleri içinde iki kategoriye ayırır. Kategori 1 su bazlı ürünleri içerir. Kategori 1’de kendi içinde ayrılır. Kategori 1A enjeksiyonları ve diğer steril parenteral ürünleri, kategori 1B steril olmayan parenteral ürünleri ve kategori 1C’de su bazlı oral ürünleri içerir. Kategori 2 su bazlı olmayan, yağ içinde su emülsiyonu gibi, ürünleri içerir. Çalışmamızda kullanılan şampuan kategori 1B’de yer alır (70).

Testte *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 kökenleri kullanılır. Mikroorganizma kökenlerinden taze kültürler hazırlanır. Bakteriler TSA’da 30-35⁰C’de 18-24 saat, maya PDA’da 20-25⁰C’de 40-48 saat ve küf ise PDA’da 20-25⁰C’de 1 hafta ya da iyi sporulasyon sağlanana kadar inkübe edilir. Hücreler steril peptonlu suda (%0.1) süspanse edilir ve ml başına mikroorganizma miktarı 10⁸ olarak ayarlanır. *A. niger*’de kültür hücreleri %0.05 polisorbata 80 içeren steril peptonlu suda (%0.1) inoküle edilir ve ml başına düşen spor miktarı 10⁸ olarak ayarlanır. Her mikroorganizma için inokülasyon miktarı %1’i aşmamalıdır ve her ürüne 10⁵- 10⁶ kob/gr mikroorganizma inoküle edilmelidir. Ürün konulan kaplar 20-25⁰C’de ve ışıktan uzakta muhafaza edilmelidir. Ürünün gramı ya da ml’si başına düşen mikroorganizma miktarı, inkübasyondan sonraki 0., 14. ve 28. günlerde hesaplanır (70).

Bakteriler için 14. günde inokulum miktarından en az %1’lik azalma ve 28. günde 14. günkü sayımdan daha az veya aynı miktarda olmalı, mantarlar için ise 14. ve 28. günlerde başlangıç sayımına göre aynı veya daha az olmalıdır (70).

5.2.4. Koruyucuların Hazırlanması

Baz olarak hazırlanan şampuanın 500'er gramının üzerine her koruyucudan 3 farklı konsantrasyonda, ticari olarak belirlenmiş konsantrasyonun alt ve üst sınırları ile sınırlar arasında kalan miktarda eklenmiştir. Koruyucuların eklenecek miktarları çok az olduğu için eklemeler hassas terazide yapılmıştır. Numuneler mekanik karıştırıcıda 800 rpm'de 15 dk. karıştırılır. Şampuan köpüğünün dinmesi için 1 gece bekletilir.

Tablo 3: Şampuan bazına eklenen koruyucu miktarları

Koruyucu	Koruyucu Konsantrasyonu (%)	Koruyucu Bazı (ml)	Şampuan Bazı (ml)	Eklenecek Koruyucu Miktarı (ml)
A	0.30	99.70	500	1.50
	0.50	99.50	500	2.51
	0.70	99.30	500	3.52
B	0.20	99.80	500	1.00
	0.60	99.40	500	3.02
	1.00	99.00	500	5.05
C	0.30	99.70	500	1.50
	0.65	99.35	500	3.27
	1.00	99.00	500	5.05
D	0.10	99.90	500	0.50
	0.11	99.89	500	0.55
	0.12	99.88	500	0.60

A koruyucusu: % 4.50-5.50 bronopol, % 4.50-5.50 propil paraben, % 13.50-16.50 metil paraben ve % 72.50-77.50 fenoksietanol. **B koruyucusu:** % 18-22 diazolinidil üre, % 18-22 sodyum benzoat ve % 9-11 potasyum sorbat. **C koruyucusu:** % 80 $\pm$ 1.0 fenoksietanol, % 12 $\pm$ 0.5 benzoik asit ve % 8 $\pm$ 0.3 dehidroasetik asit. **D koruyucusu:** % 31 $\pm$ 1.0 propilen glikol, % 13 $\pm$ 0.5 benzil alkol ve % 1.25 $\pm$ 0.1 metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon karışımından oluşur.

Köpüğü dinen şampuanlar steril vidalı kapaklı tüplere 10'ar gram olarak tartılır. Deney süresince numuneler ışıktan uzakta oda sıcaklığında bekletilir.

5.2.5. Deneyin Yapılışı

Deneye başlamadan önce bakteriler, maya ve küf, farmakopelerde belirtilen önceden hazırlanmış besiyerlerine pasajlanır. Hazırlanan taze kültürlerden bakteri, maya ve küf sporları farmakopede belirtilen sulandırım solüsyonu içinde McFarland 0.5 (1×10^8) bulanıklığına ayarlanır. Mikroorganizma süspansiyonlarından 100 µl alınarak vidalı kapaklı tüplerdeki şampuan numunelerine inoküle edilir. Numunelerden farmakopelerde belirtilen zamanlarda ve belirtilen solüsyonlarda, 1 gram numune karıştırılarak ve uygun oranda dilüsyon yapılarak, önceden hazırlanmış besiyerlerine yüzeye ekim (0.1 ml) yapılır. Ekim yapmadan önce numuneler 2000 rpm'de 1-2 dk. karıştırılır. Ekim yapılan besiyerlerinde bakteriler farmakopelerde belirtilen inkübasyon koşullarında bekletilir. İnkübasyonun ardından koloniler sayılarak, ml'deki mikroorganizma sayıları bulunur ve farmakopelerde belirtilen oranlarda azalma olup olmadığı incelenir.

6. BULGULAR

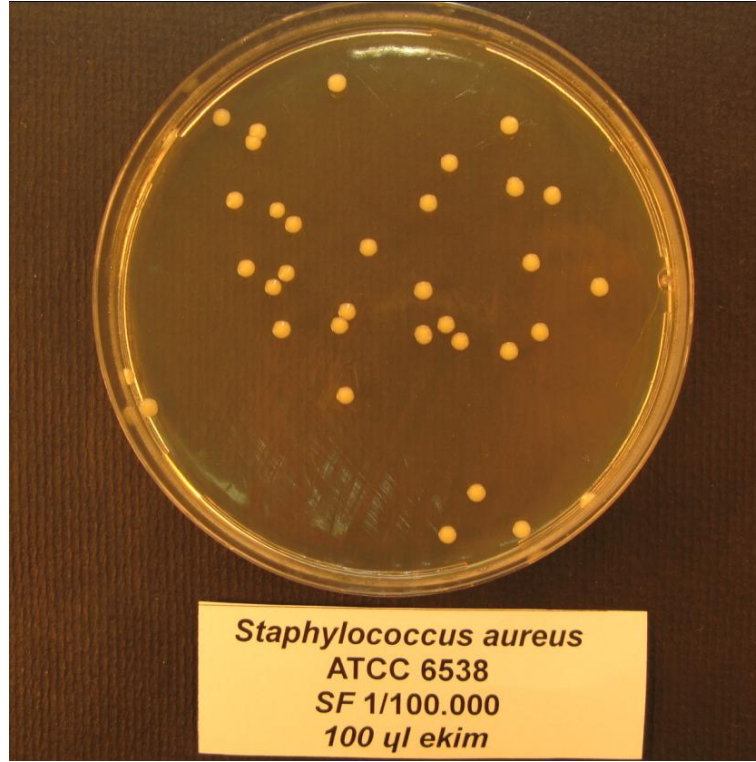
Koruyucu içermeyen şampuan bazı ve koruyucu içeren şampuanlara sterilite testi yapılmış ve üreme gözlenmemiştir.

Kozmetik preparatlarda koruyucu etkinliğin saptanmasında Amerikan, İngiliz ve Japon Farmakopesi önerilerine göre deneyde kullanılan mikroorganizmalar uygun solüsyonlarda süspanse edilip inokülasyon yapılmıştır. Farmakopelerdeki koruyucu etkinlik test yöntemine göre yapılan mikroorganizma inokülasyon miktarları Tablo 4’de gösterilmiştir.

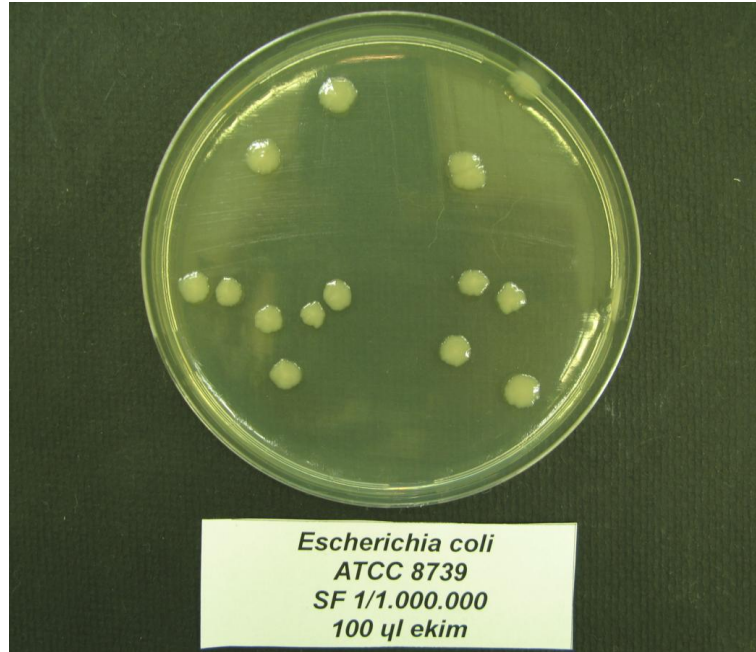
Tablo 4: Mikroorganizma inokülasyon miktarları

Mikroorganizma	Şampuan örneklerindeki mikroorganizma sayısı (kob/ml-g)		
	Amerikan Farmakopesi	İngiliz Farmakopesi	Japon Farmakopesi
<i>S.aureus</i>	3.6×10^5	1.6×10^6	5.4×10^6
<i>E.coli</i>	1.5×10^6		3.0×10^6
<i>P.aeruginosa</i>	3.7×10^6	5.0×10^6	4.6×10^6
<i>C.albicans</i>	1.6×10^6	1.2×10^6	5.3×10^6
<i>A.niger</i>	2.8×10^6	7.5×10^6	1.8×10^6

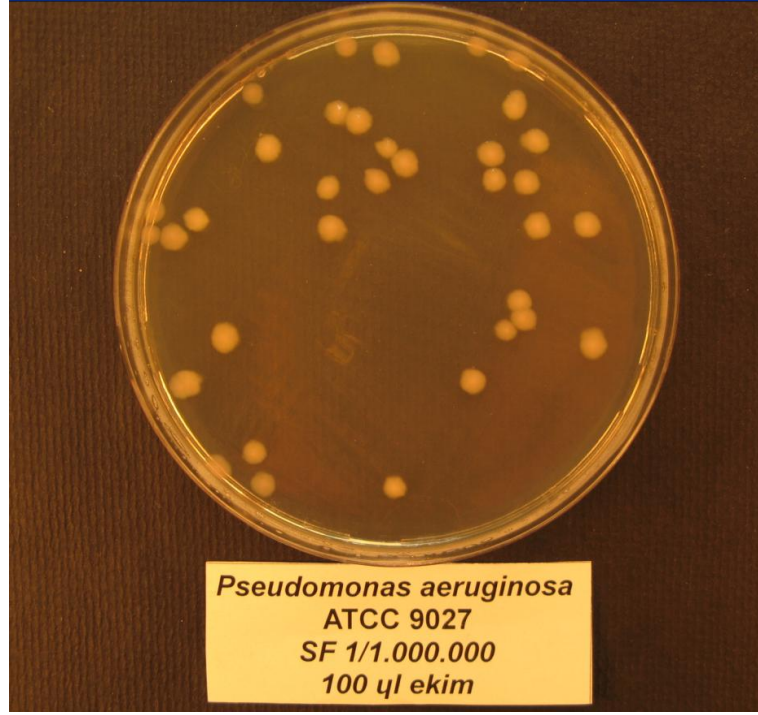
Amerikan Farmakopesine göre şampuan örneklerinde mikroorganizma sayısı (kob/ml-g) Resim 1., 2., 3., 4. ve 5.’de gösterilmiştir.



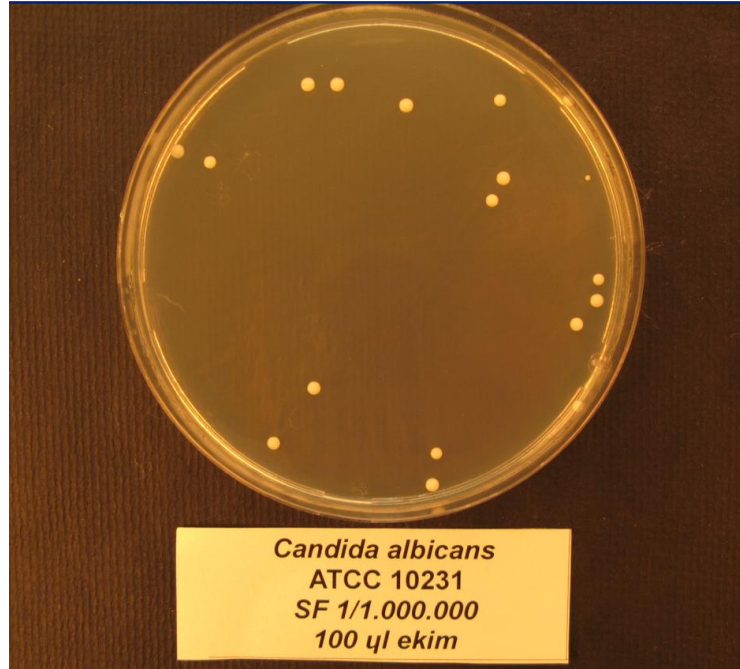
Resim 1. *Staphylococcus aureus*'un Amerikan Farmakopesi'ne göre yapılan başlangıç inokülasyonu



Resim 2. *Escherichia coli*'nin Amerikan Farmakopesi'ne göre yapılan başlangıç inokülasyonu



Resim 3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Amerikan Farmakopesi'ne göre yapılan başlangıç inokülasyonu



Resim 4. *Candida albicans*'ın Amerikan Farmakopesi'ne göre yapılan başlangıç inokülasyonu



Resim 5. *Aspergillus niger*'in Amerikan Farmakopesi'ne göre yapılan başlangıç inokülasyonu

Şampuan bazına %0.30, 0.50, 0.70 oranlarında eklenen A, %0.20, 0.60, 1.00 oranlarında eklenen B, %0.30, 0.65, 1.00 oranlarında eklenen C ve %0.10, 0.11, 0.12 oranlarında eklenen D koruyucuları *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *A.niger*'e karşı etkili bulunmuştur. Amerikan, İngiliz ve Japon farmakopelerine göre yapılan koruyucu etkinlik test yöntemleri arasında bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 5: Amerikan Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)		
			0. gün	14. gün	28. gün
A	0.30	<i>S. aureus</i>	1.0×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	2.5×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	8.3×10^5	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.2×10^5	<50	<50
		<i>A.niger</i>	2.4×10^5	<50	<50
	0.50	<i>S. aureus</i>	3.2×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	1.3×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.0×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	4.8×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	3.8×10^5	<50	<50
	0.70	<i>S. aureus</i>	1.1×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	1.0×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.2×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	7.4×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.6×10^3	<50	<50
B	0.20	<i>S. aureus</i>	5.2×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	3.0×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	6.3×10^5	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	6.4×10^5	<50	<50
		<i>A.niger</i>	4.0×10^4	<50	<50
	0.60	<i>S. aureus</i>	9.2×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	8.3×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.0×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	2.5×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.0×10^3	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	4.5×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	4.8×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	7.5×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	5.4×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.3×10^4	<50	<50

Tablo 5 (devamı): Amerikan Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)		
			0. gün	14. gün	28. gün
C	0.30	<i>S. aureus</i>	9.3×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	6.0×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	8.2×10^5	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	5.5×10^5	<50	<50
		<i>A.niger</i>	2.8×10^4	<50	<50
	0.65	<i>S. aureus</i>	1.0×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	4.0×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	7.4×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.3×10^5	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.0×10^4	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	2.6×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	2.5×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.5×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.0×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.5×10^3	<50	<50
D	0.10	<i>S. aureus</i>	7.5×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	7.2×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.0×10^5	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	4.6×10^5	<50	<50
		<i>A.niger</i>	5.4×10^5	<50	<50
	0.11	<i>S. aureus</i>	1.2×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	4.3×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.0×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	8.5×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	3.2×10^3	<50	<50
	0.12	<i>S. aureus</i>	8.6×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	3.6×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	2.3×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.0×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	3.0×10^4	<50	<50

Tablo 6: İngiliz Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)				
			0. gün	48. saat	7. gün	14. gün	28. gün
A	0.30	<i>S. aureus</i>	6.2×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	2.6×10^5	2.5×10^3	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	2.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.3×10^5	<50	<50	<50	<50
	0.50	<i>S. aureus</i>	5.5×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.3×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.0×10^5	<50	<50	<50	<50
	0.70	<i>S. aureus</i>	3.6×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.6×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	5.0×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	8.3×10^3	<50	<50	<50	<50
B	0.20	<i>S. aureus</i>	2.0×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	8.2×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	7.5×10^4	1×10^2	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	3.8×10^5	1×10^2	<50	<50	<50
	0.60	<i>S. aureus</i>	4.3×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	6.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	6.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.1×10^4	<50	<50	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	5.8×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	7.1×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.4×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	5.0×10^3	<50	<50	<50	<50

Tablo 6 (devamı): İngiliz Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)				
			0. gün	48. saat	7. gün	14. gün	28. gün
C	0.30	<i>S. aureus</i>	6.1×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	5.0×10^5	4.0×10^3	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.2×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	5.3×10^4	4.5×10	<50	<50	<50
	0.65	<i>S. aureus</i>	8.3×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.5×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	6.1×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.6×10^4	<50	<50	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	5.6×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.4×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	4.0×10^3	<50	<50	<50	<50
D	0.10	<i>S. aureus</i>	4.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.7×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.0×10^5	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	9.0×10^4	<50	<50	<50	<50
	0.11	<i>S. aureus</i>	4.5×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	3.4×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A.niger</i>	6.7×10^3	<50	<50	<50	<50
	0.12	<i>S. aureus</i>	1.2×10^3	<50	<50	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.3×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	3.0×10^4	<50	<50	<50	<50
		<i>A. niger</i>	6.0×10^3	<50	<50	<50	<50

Tablo 7: Japon Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)		
			0. gün	14. gün	28. gün
A	0.30	<i>S. aureus</i>	2.7×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	6.0×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.0×10^5	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	9.6×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	3.1×10^4	<50	<50
	0.50	<i>S. aureus</i>	1.3×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	3.7×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.6×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.5×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.0×10^3	<50	<50
	0.70	<i>S. aureus</i>	1.0×10^3	<50	<50
		<i>E. coli</i>	3.0×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	5.7×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	1.0×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	2.4×10^3	<50	<50
B	0.20	<i>S. aureus</i>	8.3×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	7.9×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	8.2×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	7.3×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	5.0×10^4	<50	<50
	0.60	<i>S. aureus</i>	8.0×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	4.1×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	1.3×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	5.0×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	8.1×10^3	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	4.0×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	7.0×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.4×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	4.6×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.5×10^4	<50	<50

Tablo 7 (devamı) : Japon Farmakopesi koruyucu etkinlik test metoduna göre koruyucuların test günlerindeki ekim sonuçları

Koruyucu	Konsantrasyon %	Mikroorganizma	Mikroorganizma Sayısı (kob/ml-g)		
			0. gün	14. gün	28. gün
C	0.30	<i>S. aureus</i>	1.7×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	5.4×10^5	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.6×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	6.0×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	9.1×10^4	<50	<50
	0.65	<i>S. aureus</i>	1.0×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	3.0×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	3.1×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	2.3×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	6.5×10^4	<50	<50
	1.00	<i>S. aureus</i>	4.9×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	6.4×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	6.0×10^2	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	4.9×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.2×10^3	<50	<50
D	0.10	<i>S. aureus</i>	6.3×10^5	<50	<50
		<i>E. coli</i>	6.0×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	7.0×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	6.1×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	4.8×10^5	<50	<50
	0.11	<i>S. aureus</i>	7.0×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	7.1×10^4	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	4.5×10^4	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	8.1×10^4	<50	<50
		<i>A.niger</i>	1.0×10^4	<50	<50
	0.12	<i>S. aureus</i>	6.5×10^4	<50	<50
		<i>E. coli</i>	8.2×10^3	<50	<50
		<i>P. aeruginosa</i>	5.4×10^3	<50	<50
		<i>C. albicans</i>	5.0×10^3	<50	<50
		<i>A.niger</i>	7.3×10^3	<50	<50

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikrobiyolojik bakımdan iyi kalitede bir preparatın hazırlanması en çok aseptik şartlarda sağlanabilirse de, kozmetiklerin tatbik edildiği bölgelerin normal mikrobiyal florası olduğundan steril şartlarda hazırlanması gerekli olmayıp, mikroorganizma sayısının sınırlandırılması ve koruyucu ilave edilmesi gerekir. Kozmetiklere katılan koruyucular; uygun olmayan pH değerleri ile yapımda bulunan doğal ve sentetik makromoleküllere ya da plastik kaplara bağlanarak etkinliklerini kaybederler. Bu nedenle üretici, bitmiş preparatın yeterince korunduğundan emin olmalıdır (3).

Koruyucu sistemlerin yeterli ve uygun olması, sadece üretim sırasında mikrobiyal kontaminasyonu önlemekle kalmamalı, kullanım sırasında kolayca bulaşabilecek mikroorganizmaların sayılarını önemli ölçüde azaltmalıdır. Ayrıca, renksiz, kokusuz olmalı, toksik etkisiyle, iritan etkisi olmamalı ve geniş antimikrobiyal spektruma sahip olmalıdır. Ayrıca tüketici için güvenilir olması, etken ve yardımcı maddelerle geçimli olması arzulanır (3).

Uygun ve yerinde kullanılan koruyucu, doğru paketlenme ile üründe kontaminasyon riskini azaltır. Koruyucular, kozmetik formülasyona ilave edildiğinde tüketicinin kullanımı boyunca ürünün bütünlüğünü muhafaza etmeli, raftaki dayanma süresini uzatmalı ve imalat süresince olan mikrobiyal gelişmeyi önlemelidir. Ancak ilave edilen koruyucunun %100 mikrobiyal kontaminasyonu engellemesi mümkün değildir (3, 71).

Koruyucunun geçerliliğini muhafaza etmesi için formülasyonda koruyucu seçimi sırasında, mutlaka pH göz önüne alınmalıdır. Nötral veya zayıf alkali kozmetik preparatlar içine, koruyucu olarak sadece asit pH aralığında etkili olan koruyucu madde ilave edilemez (3).

Propilen glikol koruyucu ya da penetrasyonu arttırıcı olarak kullanılır. Hem allerjik, hem iritan reaksiyonlara neden olur (72).

Özdemir ve ark. (42) kozmetik preparatlarda 13g/l'lik konsantrasyonda kullanılan propilen glikolün ve 6,5lg/l'lik konsantrasyonda kullanılan potasyum sorbatın *C. albicans*'ın üremesine engel olduğunu bulmuşlardır. Propilen glikol ve potasyum sorbat kombinasyonunun ise 10g/l'lik konsantrasyonda *C. albicans*'ın üremesini inhibe ettiğini saptayarak ve koruyucu kombinasyonlarının sinerjik etkisini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda kullanılan D koruyucusu % 31±1.0 propilen glikol, %13±0.5 benzil alkol ve %1.25±0.1 metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon karışımından oluşur ve %0.10, 0.11 ve 0.12 konsantrasyonlarında *C. albicans*'ın üremesini inhibe etmiştir. B koruyucusu %18-22 diazolinidil üre, % 18-22 sodyum benzoat ve %9-11 potasyum sorbat karışımından oluşur ve % 0.20, 0.60 ve 1.00 konsantrasyonlarında *C. albicans*'ın üremesini inhibe etmiştir. Özdemir ve ark. sonuçlarıyla bizim sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Koruyucu kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitesi belirgin şekilde açıktır. Kozmetik ürünlerin bileşimlerinin ve ortam koşullarının da mikrobiyal kontaminasyonu etkilediği bilinmektedir. İki veya daha fazla sayıda koruyucunun bir araya getirilmesiyle oluşturulan sistemler, hem o sistemin aktivitesini arttıracak hem de koruyucu konsantrasyonu düşeceğinden bunların istenmeyen etkilerinin de önüne geçilmiş olacaktır (5).

Kozmetik ürünlerden şampuanlarda: *P. aeruginosa*, diğer *Pseudomonas*lar, koliform basiller, *Burkholderia cepacia* üremesi gözlenmektedir (41). Sree-iam ve ark. (73) %1'lik paraben konsantrasyonun (%10 metil paraben ve %2 propil paraben) sudaki mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu ve parabenlerin aktivitesinin EDTA ile sinerjik etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda propil paraben (%4.50-5.50) ve metil paraben (%13.50-16.50) içeren A koruyucusu bronopol (%4.50-5.50) ve fenoksietanol (%72.50-77.50) ile birlikte kullanılmış ve koruyucu etkinliğin saptanmasında kullanılan Amerikan, Japon ve İngiliz Farmakopesi önerisi test

mikroorganizmaları olan *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *A.niger*'e karşı etkili bulunmuştur.

Rahalli ve ark. (74) benzoik asidin bakteri ya da *C. albicans*'ın azalmasına karşı önemli bir etkiye sahip olmadığını, ancak sorbik asit ve benzil alkol ile kombinasyonun *C.albicans*, *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin inhibisyonunda sinerjik etki gösterdiğini ve bu üç koruyucunun ayrıca *A. niger*'in üremesini azaltarak sinerjik etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda benzoik asit (12 ± 0.5), fenoksietanol (80 ± 1.0) ve dehidroasetik asit (8 ± 0.3) içeren C koruyucusu, koruyucu etkinliğin saptanmasında kullanılan Amerikan, Japon ve İngiliz Farmakopesi önerisi test mikroorganizmaları olan *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *A.niger*'e karşı etkili bulunmuştur.

Metilizotiazolinon/Metilkloroizotiazolinon (MI/MCI) düşük konsantrasyonlarda bile çok etkilidir. Bu koruyucu sistemi çeşitli endüstriyel uygulamaların, tuvalet ve kozmetik ürünlerinin korunmasında yaklaşık yirmi yıldır sıklıkla kullanılmaktadır. MI/MCI kombinasyonunun güçlü duyarlılık etkisi yıllardır bilinmektedir (75). Çalışmamızda kullandığımız D koruyucusu propilen glikol (31 ± 1.0), benzil alkol (13 ± 0.5) ve metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon (1.25 ± 0.1) karışımından oluşur. Düşük konsantrasyonda metilizotiazolinon ve metilkloroizotiazolinon karışımı içeren D koruyucusu, koruyucu etkinlik test mikroorganizmaları olan *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *A.niger*'e karşı etkili bulunmuştur.

Amerika Birleşik Devletlerinde MI/MCI kombinasyonunun kozmetik ürünlerde izin verilen kullanım oranı leave-on ürünlerde 7,5 ppm iken rinse-off ürünlerde 15 ppm'dir. Japonya'da ise rinse-off ürünlerde 15 ppm kullanılmasına izin verilmişken leave-on ürünlerde kullanımına izin verilmez (75).

Samadi ve ark. (76) İngiliz ve Amerikan Farmakopelerinin her ikisine göre, göz damlalarında kullanım esnasında mikrobiyal kontaminasyonun önemini ve koruyucuların antimikrobiyal etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Tüm göz damlalarında her iki farmakopeye göre antimikrobiyal etkinlik testinde benzer sonuçlar bulmuşlardır. Çalışmamızda kullanılan tüm koruyucuların denenen konsantrasyonları Amerikan, İngiliz ve Japon Farmakopelerine göre etkili bulunmuştur. Farklı Farmakopelerin karşılaştırıldığı çalışmamızda kozmetik preparat kullanılması karşın, Samadi ve ark. çalışmasında kullandıkları göz damlası preparatlarında saptadıkları sonuçlara benzer sonuçlar bulunmuştur.

Bu bulgularımızın ışığı altında:

Bir koruyucunun karakteristik en önemli özelliği güvenilirliğidir. Biyolojik olarak aktif maddeler oldukları için toksik, iritasyon yapıcı ve duyarlılık riskleri vardır. Uzun süreli kozmetik ürün kullanımı tüketicide koruyucuların kümülatif etki yaratmasına sebep olabilir. Koruyucuların yüksek kullanım oranı hem tüketicide iritasyon yapabilir hem de işletmeye maliyet olarak etki eder. Bir kozmetik ürün bileşiminde kullanım yüzdesi en fazla olan hammadde sudur ve mikrobiyolojik kontaminasyona özellikle eğilim gösterir. Koruyucuların Farmakopede belirtilen antimikrobiyal etkinlik test yöntemlerine göre değerlendirilmesini ve ürüne konulan koruyucuların etkili olduğu minimum kullanım oranının saptanarak kullanılması gerektiği görüşündeyiz.

Şampuanlarda genellikle gram negatif bakteriler (*P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*) ürer. Suda çözünmeyen paraben gibi koruyucular suda sıklıkla bulunan *P. aeruginosa* gibi bakterilere karşı etkili kılmak için ürün formülasyonuna mutlaka fenoksietanol ya da bronopol gibi suda çözünebilir koruyucular ilave edilmeli, doğru seçilen etkin koruyucu kombinasyonları ile sinerjik etki sağlanmalıdır.

Çalışmamızda kullanılan 4 farklı koruyucunun test mikroorganizmalarına karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Ticari olarak tüketicie sunulan kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucuların etkin oldukları mikroorganizmalar ve ürünün son kullanım tarihlerinin ve özellikle saklama koşullarının ürün etiketinde belirtilmesinin ve her formülasyon değişikliğinde de ürünlerde koruyucu etkinlik testlerinin yapılmasının insan sağlığı ve üretici firma için gerekliliğini düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

1. Yazan Y. (Ed), (2004). Kozmetik Bilimi. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Ştd.
2. Türkoğlu M, Pekmezci E. (2003). Kozmetolojiye Giriş. ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret A.Ş., İstanbul.
3. Kabukçu B. (1997). Türkiye’de Üretilen ve Kullanılan Şampuanların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolleri Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (Danışman: Prof. Dr. A Ahmet).
4. Şen G. (1992). Ülkemizde Bebekler İçin Üretilen Kozmetiklerin Mikrobiyolojik Açıdan İncelenmesi. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, (Danışman: Prof. Dr. D. Mücahit).
5. Duman S. (1998). Kozmetik Emülsiyonlarda Prezervatif Etkinliği. E.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, (Yard. Doç. Dr. Ö. Özgen).
6. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C. (2009). Self-preserving cosmetics. *Int J Cosmet Sci*, 31(3):163-175.
7. Bloomfield SF, Baird R, Leak RE, Leech R. (1998). Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals Cosmetics and Toiletries. Ellis Horwood Limited, England.
8. Gruvberger B, Bruze M. (1997). Preservatives. *Clinics in Dermatology*, 15(4):493-497.
9. Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. (2001). Contact Dermatitis to Cosmetics. *Clinics in Dermatology*, 19(4):502-515.
10. Russell A. D. (2003). Challenge testing: Principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*, 25(3):147-153.
11. Orth DS, Kabara JJ, Denyer SP, Tan SK. (Eds), (2006). Cosmetic and Drug Microbiology. Informa Healthcare USA, New York.
12. Kabara JJ, Orth DS. (Eds), (1997). Preservative-free and Self Preserving Cosmetics and Drugs. Marcel Dekker, New York.
13. Hugo WB, Russell AD. (Eds), (1998). Pharmaceutical Microbiology. 6th ed, Blackwell Science Ltd, London.
14. Jimenez L. (Ed), (2004). Microbial Contamination Control in The Pharmaceutical Industry. Marcel Dekker, New York.

15. Barel OA, Paye M, Maibach HI. (Eds), (2001). Handbook of Cosmetic Science and Technology. Marcel Dekker, New York.
16. Sasseville D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic Therapy*, 17(3):251–263.
17. Castanedo MP, Zug KA. (2009). Patterns of cosmetic contact allergy. *Dermatol Clin*, 27(3):265-280.
18. Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethyl paraben, Propyl paraben and Butylparaben. (1984). *Journal of The American Collage of Toxicology*, 3(5):147-209.
19. Rietschel RL, Fowler JF. (2008). Fisher's Contact Dermatitis 6. BC Decker, Hamilton.
20. Charnock C, Finsrud T. (2007). Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achive increased antimicrobial activity. *J Clin Pharm Ther*, 32(6):567-72.
21. Doron S, Friedman M, Falach M, Sadovnic E, Zvia H. (2001). Antibacterial effect of parabens against planktonic and biofilm *Streptococcus sobrinus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(6):575–578.
22. Block SS. (1991). Disinfection, Sterilization and Preservation. 6th ed, Lea&Febiger, London.
23. Altuğ T. (2009). Gıda Katkı Maddeleri. 3. baskı, Sidas Medya Ltd Şti, İzmir.
24. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. (2004). Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours, *J. Appl. Toxicol*, 24(1):5-13.
25. Sonia MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10):1335–1373.
26. Hernández B, Ortiz-Frutos FJ, García M, Palencia S, García MC, Iglesias L. (2002). Contact Urticaria From 2-Phenoxyethanol. *Contact Dermatitis*, 47(1):54.
27. Marier EL, Lampel HP, Bhutani T, Jacob SE. (2009). Hand dermatitis: A focus on allergic contact dermatitis to biocides. *Dermatol Clin*, 27(3):251-264.
28. Biebl KA, Warshaw EM. (2006). Allergic contact dermatitis to cosmetics. *Dermatol Clin*, 24(2):215-232.

29. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. (2002). Determination of bronopol and its degradation products by HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 29(1-2):387-392.
30. Bryce DM, Croshaw B, Hall JE, Holland VR, Lessel B. (1978). The activity and safety of the antimicrobial agent bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol). *J Soc Cosmet Chem*, 29:3-24.
31. Groot AC, White IR, Flyvholm M, Lensen G, Menn'e T, Coenraads P. (2010). Formaldehyde-releasers in cosmetics: Relationship to formaldehyde contact allergy. *Contact Dermatitis*, 62(1):2-17.
32. Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. (2001). *Int J Toxicol*, 20(Suppl 3):23-50.
33. Smolinske SC. (1992). Handbook of Food, Drug and Cosmetic Excipients. CRC Press LLC, Florida.
34. Mikami E, Goto T, Ohno T, Matsumoto H, Nishida M. (2002). Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 28(2):261-267.
35. Davidson PM, Sofos NJ, Branen AL. (Eds), (2005). Antimicrobials in Foods. 3rd ed, CRC Press Taylor&Francis Group.
36. Harry M, Pylypiw JR, Maureen T, Grether T. (2000). Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2):299-304.
37. Kanerva L, Elsner P, Wahlberg JE, Malbach HI. (2000). Handbook of Occupational Dermatology. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.
38. Reinhard E, Waeber R, Niederer M, Maurer T, Maly P, Scherer S. (2001). Preservation of products with MCI-MI in Switzerland. *Contact Dermatitis*, 45(5):257-264.
39. Akyol A, Bolat A, Ekmekçi P. (2003). Metil (kloro) izotiazolinon (Kathon CG) ile gelişen mesleki allerjik kontakt dermatit. *T Klin J Alerji-Astım*, 5(2):85-87.
40. Farrington JK, Martz EL, Wells SJ, Ennis CC, Holder J, Levchuk JW, Avis KE, Hoffman S, Hitchins AD, Madden JD. (1994). Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic. *Appl Environ Microbiol*, 60(12):4553-4558.

41. Özalp M. (1998). Kozmetik ürünlerde görülen mikrobiyolojik kontaminasyonlar. *Kozmetoloji Dergisi*, 1(3):167-176.
42. Özdemir H. (1998). Ege Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Üretilen Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik İncelenmesi ve Koruyucu Maddelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Saptanması. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, (Danışman: Prof. Dr. U Fusun).
43. Brannan DK, Dille JC. (1990). Type of Closure Prevents Microbial Contamination of Cosmetics During Consumer Use. *Appl Environ Microbiol*, 56(5):1476-1479.
44. Jackson ME. (1995). Diazolidinyl ürea: a toxicologic and dermatologic risk assesment as a preservative in consumer products, *J. Toxicol.-Cut.&Ocular Toxicol.*, 14(1):3-21.
45. Final report on the safety assessment of phenoxyethanol. (1990). *Journal of The American Collage of Toxicology*, 2(2):259-277.
46. Final report on the safety assessment of sorbic acid and potassium sorbate (1988). *International Journal of Toxicology*, 7(6):837-880.
47. Parlak Ş. (2007). Gıda Koruyucu Maddesi Olan Bifenil'in İnsan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Anormalliği ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, (Danışman: Doç. Dr. R Eyyüp).
48. Burnett LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. (2010). Final report on the safety assessment of methylisothiazolinone, *International Journal of Toxicology*, 29(3):187S-213S.
49. Final report on the safety assessment of sodium dehydroacetate and dehydroacetic acid (1985). *International Journal of Toxicology*, 4(3):123-159.
50. Rieger MM. (2000). Harry's Cosmeticology. 8th ed, Chemical Publishing Co, New York.
51. Campana R, Scesa C, Patrone V, Vittoria E, Baffone W. (2006). Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: Health risk and efficacy of preservative. *Lett Appl Microbiol*, 43(3):301-306.

52. Geis PA. (2006). *Cosmetic Microbiology*. 2nd ed, Taylor&Francis Group, New York.
53. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds), (2002). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Ştd.
54. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E, Öcalmaz Ş, Seber E. (2004). *Staphylococcus aureus*'un identifikasyonunda kullanılan üç metodun değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34(4):211-214.
55. Gülbandır A. (2009). Kütahya yöresinde bulunan burun mukozasındaki *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırması. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 18:1-6.
56. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğukan M, Seyrek A, Yılmaz M. (2006). *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları. *Fırat Tıp Dergisi*, 11(1):45-47.
57. Karatuna O, Yağcı A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38(1):42-51.
58. Güven Ö, Ünver D, Özdemir S, Gönüllü N, Küçükbaşmacı Ö, Altaş K. (2008). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38(3-4):112-116.
59. Fidan I, Gürelık ÇF, Yüksel S, Sultan. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnç ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg*, 19(2):68-70.
60. Rayaman E. (2002). Nötropenik Çocukların Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Bazı Antibiyotiklerin ve A Vitamininin Etkisinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, (Danışman: Yard. Doç. Dr. G Ümran).
61. Gönen S, Kuştimur S. (2000). Dermatofitlerde ve *Candida albicans*'da sodyum klorür toleransının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 30(3-4): 125-126.
62. Altındış M. (Ed), (2010). *Hemşireler İçin Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Ştd, İstanbul.
63. Boynukara B, İlhan Z, Gülhan T. (2002). İthal kozmetik bir deri kreminden *Aspergillus niger* izolasyonu. *YYÜ Vet Fak Derg*, 13(1-2):41-43.

64. Kocabalkan DS. (2002). Saç bakım ürünleri ve ampuanların kullanımında klinik seçim kriterleri. *T. Klin. Kozmetoloji*, 3(2):102- 104.
65. Gökçay E. (2007). Kepee Karşı Etkili ampuan Formüllerinin Hazırlanması ve Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. M.. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. T Murat).
66. Ergun H. (1987). Piyasadaki Bazı Cins ampuan, Saç Toniėi, El Kremi ve Saç Kremlerinin (Balzamların) Mikrobiyolojik Kontrolleri. S.. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, (Danışman: Yard. Doç. Dr. K Kemal).
67. Baran R, Maibach HI. (Eds), (1998). Textbook of Cosmetic Dermatology. 2nd ed, Martin Dunitz Ltd, London.
68. Microbiology and sterility assurance. In: United States Pharmacopoeia. (2009). 32-NF27.
69. Efficacy of antimicrobial preservation. In: British Pharmacopoeia. (1998). p. A252-A253.
70. Preservatives effectiveness test. In: Japan Pharmacopoeia 15. (2007). p. 1732-1734.
71. Mokhtari F. (2008). Developing a test method for determining the effectiveness of antimicrobial preservatives. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(9):984-988.
72. Kaymak Y, Tırnaksız F. (2007). Kozmetik rnlere bağlı istenmeyen etkiler. *Dermatose*, 6(1):39-48.
73. Sree-iam S, Kaewnoppratt S, Pinsuwan S. (1997). Influence of clear liquid shampoo components on preservative activity of parabens. *Thammasat Int J Sc Tech*, 2(2):79-83.
74. Rahali Y, Lheritier AM, Mielcarek C, Bensouda Y. (2009). Optimization of preservatives in a topical formulation using experimental design. *Int J Cosmet Sci*, 31(6):451-460.
75. Fewings J, Menne T. (1999). An update the risk assessment for methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI) with focus on rinse-off products. *Contact Dermatitis*, 41, 1-13.

- 76.** Samadi N, Tarighi P, Fazeli MR, Mehrgan H. (2009). Evaluation of antimicrobial effectiveness of ophthalmic drops according to the pharmacopeial test criteria. *Tums Journals*, 17(1):13-18.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Pelin	Soyadı	Yalçın
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	04.12.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail		Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji	2007
Lise	Ümraniye Lisesi (Y.D.A)	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar-Ge Mikrobiyoloji Sorumlusu	Biota Laboratuvarları	2008-....
2.	Stajyer	Marmara Üniversitesi Hastanesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarları	2 ay
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	orta	iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı Mayıs 2008 ALES	68	69	67
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word, excel, power point	İyi
SAP ; QM ve Ar-Ge modülleri	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin