

KOZMETİK ÜRÜNLERDE KORUYUCU MADDE KULLANIMI VE KORUYUCU ETKİNLİK TESTLERİ

A.Seher BİRTEKSÖZ TAN, Mayram TÜYSÜZ

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Kozmetik ürünlerdeki mikroorganizma kontaminasyonu tüketici sağlığı açısından önemli risk oluşturmaktadır. Mikrobiyal üremeyi önlemek amacıyla ürünlere koruyucu olarak bilinen farklı kimyasal yapıda bazı maddelerin eklenmesi öngörülmektedir. Ancak ürüne eklenecek koruyucu maddelerin formülasyondaki diğer maddelerle uyumlu ve geniş spektrumlu olmaları, kullanıcı üzerine alerjik, toksik ya da tahriş edici etkilerinin olmaması gerekmektedir. 2005 tarihli Türk Kozmetik Kanunu'na göre, piyasaya sunulan kozmetik ürünlerin güvenlik değerlendirmesinin kullanımına sunuldukları hedef kitlenin sağlığı açısından yapılması zorunludur. Bu derlemede ülkemizde de yaygın kullanım alanına sahip kozmetik preparatlarda kullanılan koruyucu maddeler; özellikleri, ürünlere eklenme ilkeleri ve etkinliğinin belirlenmesi için uygulanan testler açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: koruyucu etkinlik testi, koruyucu madde, kozmetik ürün

SUMMARY

The Use of Preservatives in Cosmetic Products and Their Efficiency Testing

Possible microorganism contamination in the widely used cosmetic products may lead to important risks in terms of consumer health. Therefore, there is a requirement of adding preservatives, ingredients with different chemical structures aiming the prevention of microbial reproduction against the risk of contamination in cosmetic products. Preservatives added to cosmetic formulations must be compatible with other ingredients, show broad-spectrum efficiency and have no allergic, toxic or irritant effect on consumers. According to Cosmetics Law, safety evaluation of cosmetic products marketed must be performed for the purpose of health of the target audience. In this review, preservative materials used in widely-used cosmetic products in our Country were evaluated with respect to their properties, principles of their addition to products and tests applied for determination of their efficiency.

Keywords: cosmetic product, preservative effectiveness test, preservative material

GİRİŞ

Kozmetik terimi Latince “süs, güzellik” anlamındaki “cosmos” kelimesinden türetilmiştir. Sağlık Bakanlığının 24/3/2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanunu'na göre kozmetik ürün “İnsan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya

vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan bütün preparatlar veya maddeler” şeklinde tanımlanmaktadır⁽³⁷⁾.

Dünyanın kuruluşundan bu yana insan yaşamında önemli yer tutan kozmetik ürünler, mikrobiyolojik açıdan steril olma zorunluluğu olmayan ancak tüketici sağlığı açısından uygun kalitede olması gerekli olan ürünlerdir⁽³⁶⁾. Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontamine olabildikleri ilk kez 1946 yılında Yeni Zelanda'da, *Clostridium tetani* ile kontamine olan

İletişim adresi: A.Seher Birteksöz Tan. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel: (0212) 440 00 00/13523

e-posta: seherbirteksoz@hotmail.com

Alındığı tarih: 17.12.2012, Yayına kabul: 28.03.2013

talk pudrasının kullanılması sonucu ortaya çıkan bebek ölümleri ile fark edilmiştir⁽¹⁾. Yapılan çalışmalarda kozmetik ürünlerin çeşitli mikroorganizmalar ile kontamine olabileceği ve aralarında, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* türleri ve *Staphylococcus aureus* gibi önemli patojen mikroorganizmalar olduğu belirlenmiştir^(1,6,19,27). Patojen mikroorganizma içermemesi gereken kozmetik ürünlerin güvenlik ve etkinliğini sağlayan kurallara uygun olarak üretilmesi ve uygun koruyucu madde ile korunması gerekmektedir. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik yönden korunması ile ilgili kurallar dünyada Kozmetik, Tuvalet ve Koku Birliği (Cosmetic Toiletry and Fragrance Association-CTFA), Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration-FDA) ve Avrupa Birliği Komisyonu gibi kuruluşlar, ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmeliklerle düzenlenmiştir. Sağlık Bakanlığı tarafından Avrupa Birliği Kozmetik Mevzuatının 76/768/EEC sayılı Konsey Direktifi ile 96/335/EC sayılı komisyon kararına paralel olarak 24/3/2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanunu'nun yedinci maddesine dayanılarak hazırlanan yönetmelikte konuya ilişkin usul ve esaslar belirlenmiştir⁽³⁸⁾.

Kozmetik ürünlerde mikrobiyal kontaminasyon

Kozmetik ürünlerde görülen ve ürünün bozunmasına neden olan mikrobiyal kontaminasyon ham madde kaynaklı, üretim aşamasında ya da ürünün tüketici tarafından kullanımı sırasında oluşabilmektedir. Kontaminasyon, ürününün üretiminde kullanılan su, ham madde, yardımcı maddeler, paketlenme materyali, personel, üretim tesisi ve donanımı, çevre ve depolama kaynaklı olabilmektedir^(2,22,28,35,39).

Kozmetik ürün formülasyonları, içerdikleri su, karbon ve azot kaynakları, mineraller ve eser elementler, oksijen (aerobik organizmalar), uygun sıcaklık ve uygun pH değeri ile mikroorganizma üremesi için uygun ortamlardır. Ayrıca ürün formülasyonlarında bulunabilecek karbondhidratlar, şeker ve yağ alkoller, yağ asitleri, protein ve peptidler, aminoasitler, glikozitler, steroidler, vitaminler ve bitkisel ham maddeler mikroorganizma üremesini destekleyici ortam oluşturan maddelerdir. Ürüne giren mikroorga-

nizmalar, çeşitli hidrolitik enzimleri ile üründe bulunan maddeleri metabolize ederek ürünün kokusu, rengi, viskozitesi ve performansında istenmeyen değişiklikler meydana getirirken, bu değişiklikler ürünün bozunmasına ve sonuçta kullanıcının zarar görmesine yol açabilir⁽²³⁾. Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontaminasyonu sonucu, bütünlüğü bozulmuş deri infekte olabilir ve mikroorganizmalar tarafından üretilen endotoksin ve metabolitler ciltte aşınma, irritasyon veya alerjiye neden olabilir⁽³¹⁾.

Kozmetik ürünlerde koruyucu madde kullanımı

Koruyucu maddeler, kozmetik ürünlerin başlıca bakteri, maya ya da küf şeklindeki mantarlar ile kontamine olma olasılığına karşı genellikle bitmiş ürüne, üremelerini engellemek ya da ürünün kimyasal olarak bozunmasını önlemek amacıyla eklenen kimyasal maddelerdir⁽²⁹⁾. Koruyucu olarak kullanılan maddeler mikroorganizmaları öldürücü veya üremelerini durdurucu özelliktedir. Ürünlerdeki koruyucu maddelerin ürünün raf ömrü ve kullanım süresi boyunca korumayı sağlamak için yeterli konsantrasyonda olması gerekmektedir. Burada önemli olan, koruyucu madde miktarının hem tüketiciyi mikroorganizmalardan yeterli derecede koruması hem de tüketicinin epitel hücrelerine toksik ve iritan etkisinin olmaması ve aşırı duyarlılık gibi önemli problemlere yol açmamasıdır^(18,32). Bu nedenle, koruyucu olarak kullanılacak maddenin ürüne girebilecek her türlü mikroorganizmaya karşı düşük konsantrasyonlarda etkili olması, tüketici üzerinde alerjik, toksik ya da tahriş edici etkisinin olmaması, üretim sırasında ve ürünün raf ömrü boyunca (değişen sıcaklık ve pH değerlerinde) kararlı olması, formülasyondaki diğer maddelerle geçimli olması, renksiz ve kokusuz olması, suda çözünebilir olması, ürünün fiziksel özelliklerini değiştirmemesi, mikroorganizmaları ortama adapte olmamaları için hemen öldürmesi, yasa ve yönetmeliklere uygun olması ve ucuz ve kolay ulaşılabilir olması gibi bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir^(3,20,26,36).

Koruyucu maddelerin kimyasal ve biyolojik etkinliği genel olarak ürün formülasyonundaki diğer maddelerden ve fiziksel şartlardan etkilenebilir. Koruyucu etkinliğini değiştirebilen

faktörler ürünün pH'sı, içerdiği yüzey etkin madde, protein, inorganik ve organik maddeler, su, ambalaj şekli, üretim yapılan fabrikanın hijyeni, ham maddelerin olası mikrobiyal kontaminasyonu, saptanan raf ömrü ve bitmiş ürünün tüketici tarafından kötü kullanımı olduğu belirlenmiştir^(3,32,34).

Koruyucu maddeler genel olarak mikroorganizmaların sitoplazma (konjugasyon mekanizması, ribozomlar, nükleik asitler, tiyol grupları, amino grupları), hücre duvarı ve sitoplazma zarı (membran potansiyeli, enzimler, zar geçirgenliği) üzerine etki eden kimyasal maddelerdir⁽¹⁵⁾.

Biyolojik olarak etkin olan koruyucu maddelerin mikroorganizmaları öldürürken tüketiciye zarar verebileceği bilindiğinden bu durum yönetmelik ve yasalarla düzenlenmiştir⁽³⁵⁾. Kullanılan kozmetik koruyucu maddelerin izin verilen maksimum konsantrasyonları, hangi ürünlerde kullanımlarının sınırlandırıldığı ve kullanılmasına izin verilmeyen kimyasal maddelerin listeleri bu yönetmeliklerde belirtilmiştir.

Kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucu maddeler

1- Parabenler (Paraben ve paraben tuzları)

Parahidroksibenzoik asit olarak bilinirler. p-Hidroksibenzoik asit esterleri olan metil, etil, propil, butil ve benzil parabenler ideal koruyucu maddenin birçok özelliğine sahip olmaları nedeniyle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde en sık kullanılan koruyucu maddelerdir. Parabenler membran potansiyelini bozarak etki gösteren ve mantarlara karşı oldukça etkili olan ancak, bakterilere özellikle parabenleri karbon kaynağı olarak kullanabilen *Pseudomonas*'lara karşı daha az etkili olan koruyucu maddelerdir. Genellikle kombinasyon halinde kullanılırlar. Kozmetik Yönetmeliği'ne göre tek bir ester için % 0.4, ester karışımları için ise izin verilen maksimum konsantrasyon % 0.8'dir^(30,38). Genel olarak toksik veya mutajenik etkilerinin olmadığı bilinen parabenlerin, son zamanlarda yapılan çalışmalar ile östrojenik özelliklerinin olduğu, kontakt alerjiye neden olabildikleri belirlenmiştir⁽⁴⁾. Östrojenik aktivitelerinin bulunması, özellikle koltuk altına uygulanan ürünlerde, meme

kanseri ile ilişkileri olabileceğini düşündürmüştür⁽⁷⁾. Ayrıca yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalar ile parabenlerin, spermatogenezi ve hormon salgılanmasını olumsuz yönde etkileyerek üreme sisteminin fonksiyonlarını bozduğu da gösterilmiştir^(24,25).

2- Asetilaseton ile reaksiyona giren koruyucu maddeler

Formaldehit, DMDM hidantoin, katerniyum 15, diazolidinil üre, sodyum hidroksimetilglisinat ve methamin' dir. Doğal antimikrobik koruyucular arasında, hem geniş spektruma sahip hem de suda çözünen tek madde formaldehit'tir. Ancak keskin kokusu ve düşük kararlılığı kullanımını sınırlamaktadır. Kozmetik ürünlerde zararlı etkilerinden dolayı serbest formaldehit kullanımı azaltılırken, yerine formaldehit salanlar kullanılmaya başlanmıştır. Kozmetik Yönetmeliği'ne göre aerosollerde kullanılmaması gereken serbest formaldehitin izin verilen maksimum konsantrasyonu ağız hijyeni ürünleri dışında % 0.2, ağız hijyeni ürünlerinde ise % 0.1'dir. Hücredeki proteinleri denatüre ederek etki gösteren imidazolidinil üre, diazolidinil üre, dimetil dimetilol hidantoin (DMDM hidantoin) ve katerniyum 15 ise bakterilere karşı oldukça etkilidir. Ancak mantarlara karşı çok az etkili olmaları nedeniyle antifungal özelliği olan koruyucu maddeler ile kombinasyon halinde kullanılması önerilmektedir^(5,36,38).

3- İzotiyazolinonlar

Metilkloroizotiyazolinon, metil izotiyazolinon ve benzizotiyazolinon'dur. Proteinlerin tiyol gruplarını denatüre ederek aktif transport ve glikoz oksidasyonunu etkileyen izotiyazolinonlar (metilkloroizotiyazolinon ve metil izotiyazolinon) geniş spektrumlu biyositlerdir. Çok düşük konsantrasyonlarda bile birçok Gram negatif, Gram pozitif bakterilere ve mantara etkilidirler. Metilizotiyazolinon için Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyon % 0.01'dir^(5,29,38).

4- Organik Alkoller

Fenoksietanol, benzil alkol ve fenetil alkol'dür. Organik alkollerden, lipid ve proteinleri etkileyerek membran yapısını bozan benzil

alkol, Gram pozitif bakterilere oldukça etkili, Gram negatif bakteriler ve mantarlara karşı zayıf etkili bir koruyucu maddedir. Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyon % 1'dir. Diğer koruyucu maddelerle kombinasyon halinde kullanılan ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı oldukça etkili bir koruyucu madde olan fenoksietanol de membran yapısını bozarak etki gösterir^(5,36,38).

5- Asidik koruyucu maddeler

Dehidroasetik asit, benzoik asit, sorbik asit, salisilik asit, formik asit ve propionik asit'tir. Benzoik asit ve salisilik asit sitoplazmik membranın kemiozmotik dengesini bozarak daha çok antifungal etkinlik gösterirler ve Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyonları % 0.5'tir. Yönetmeliğe göre salisilik asit ve tuzlarının şampuanlar hariç üç yaşın altındaki çocuklar için olan ürünlerde kullanılması yasaklanmıştır. Benzer şekilde etki gösteren ve Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyonları sırasıyla % 0.6 ve % 2 olan sorbik asit ve propionik asit de yine mantarlara karşı etkili bakterilere karşı zayıf etkili asidik koruyuculardandır. Dehidroasetik asit ve tuzlarının da Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyonu % 0.6'dır ve aerosollerde kullanılmaları yasaklanmıştır^(5,36,38).

6- Halojenlenmiş bileşikler

Kloroasetamid, klorobutanol, kloroksilenol, klorfenesin, diklorobenzil alkol, iodopropinilbutilkarbamat, metildibromoglutaronitril'dir. Lipid ve proteinleri etkileyerek membran yapısını bozan klorobutanol, kloroksilenol ve diklorobenzil alkolün Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyonları sırasıyla % 0.5, % 0.5 ve % 0.15'tir^(5,36,38).

7- Kuaterner amonyum bileşikleri

Benzalkonyum klorid, benzetonyum klorit, klorhekzidin, hexamidin düsetionat, poliaminopropil biguanid'dir. Bakterilere karşı oldukça etkili ancak küflere karşı zayıf etkili olan, benzalkonyum klorür ve benzetonyum klorürün Kozmetik Yönetmeliği'ne göre izin verilen maksimum konsantrasyonları % 0.1'dir.

Ancak benzetonyum klorürün yalnızca durulanan ürünlerde kullanılmasına izin verilmiştir. Klorhekzidin için ise izin verilen maksimum konsantrasyon % 0.3'dür^(36,38).

8- Alkoller

Etil alkol (etanol) ve isopropil alkol'dür. Konsantrasyona bağlı olarak geniş etki spektrumuna sahip olan alkoller, kozmetik ürünlerde hem koruyucu hem de iyi birer çözücü olarak kullanılabilir. Lipid ve proteinleri etkileyerek membran yapısını bozan etil alkol % 15 - % 20 konsantrasyonlarda koruyucu olarak kullanılırken ürün içerisinde % 15'in altında bulunması durumunda ürün koruyucusuz olarak nitelendirilir^(5,36).

Kozmetik ürünlerin farklı formlarda üretilmiş olmaları ve kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların çeşitliliğine bağlı olarak kozmetik ürünlerde farklı koruyucular seçilerek kullanılmaktadır. Örneğin pudra (makyaj pudraları, banyo sonrası kullanılacak pudralar, hijyenik pudralar) gibi düşük su konsantrasyonuna sahip ürünlerde özellikle mantar kontaminasyonlarına karşı etkili olan parabenler kullanılırken, şampuan gibi ürünlerde *Pseudomonas*'lar, enterik bakterilere karşı etkili izotiyazolinonlar veya DMDM hidantoin gibi koruyucu maddelerin seçilerek kullanılması önerilmektedir⁽¹³⁾.

Kozmetik ürünlerin içerisindeki koruyucu maddelerin hem geniş spektrumlu olmaları hem de sinerjistik etki göstermeleri istendiğinden genellikle kombinasyon halinde kullanılmaları önerilmektedir. Ancak birkaç koruyucu madde bu özelliğe sahiptir (Tablo 1). Örneğin önemli antibakteriyel özellik gösteren ancak düşük

Tablo 1. Bazı koruyucu maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri⁽¹⁰⁾.

Koruyucu	Bakteri		Maya	Küf
	Gram pozitif	Gram negatif		
Benzalkonyum klorür	++	(++)*	(++)	+
Benzoik asit ve tuzları	++	(++)	+	+
Benzil alkol	++	+	+	+
Klorhekzidin	++	++*	(++)	+
Krezol	(++)	+	+	+
Etanol	++	++	(++)	(++)
Parabenler	(++)	+	(++)	(++)
Fenol	(++)	+	+	+
Fenoksietanol	(++)	++	+	+
Sorbik asit	(++)	(++)	++	(++)
Tiomersal	++	(++)	(++)	+

++ aktif, (++) orta derece aktive, + zayıf aktive, **Pseudomonas* türlerine karşı zayıf aktive

antifungal aktiviteye sahip olan imidazolidinil üre bu nedenle, parabenlerle kombine edilerek iki koruyucu maddenin geniş spektrumlu olmaları sağlanabilmektedir^(10,11,13,16).

Koruyucu maddeler dışında kozmetik ürünlere eklenen antimikrobiyal etkili maddeler

Kozmetik ürünlerde koruyucu maddelere ek olarak mikroorganizmaların üremesini engelleyen antimikrobiyal etkili birçok madde bulunmaktadır. Bunlar alkoller, esansiyel bitki yağları ve ekstraları, kelat ajanları, fenolik antioksidanlar ve koku verici gibi maddelerdir⁽⁴²⁾. Ayrıca ürünlerin düşük miktarlarda su içermesi de ürünü koruduğundan doğal koruyucu olarak kabul edilmektedir.

Bitki yağları ve ekstraları binlerce yıldır değişik amaçlar için kullanılmıştır. Alternatif tıp ve doğal tedavi amaçlı olarak kullanılan bitkisel yağ ve ekstraları aynı zamanda tüketicilerin etkili, güvenilir ve doğal ürünlere isteğinin artması sebebiyle gıda ve ilaç sanayiinde de koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. *Thymus vulgaris* (kekik), *Calamintha officinalis* (yabani oğul otu), *Lonicera caprifolium* (hanımeli) ve *Melaleuca alternifolia* (hint defnesi) gibi bitkiler alternatif tıp, doğal tedavi, gıda ve kozmetik sanayiinde koruyucu olarak kullanılan ve antimikrobiyal etkinliği bilinen bitkilerdir^(14,42). Dilüsyonla aktivitelerinin azalması ve etkinliklerinin pH'ya bağımlı olması nedeniyle ürün formülasyonlarında bunların kullanımı sınırlıdır⁽¹³⁾.

Kelat ajanlarından etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), laktik asit, sitrik asit ve fitik asit mikroorganizmaların hücre membranlarının permeabilitesini artırarak onları antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlı hale getiren maddelerdir⁽⁴²⁾. EDTA tek başına antimikrobiyal ajan olarak kabul edilmezken koruyucu maddelerle (örneğin benzalkonyum klorür, parabenler vb.), antibiyotiklerle ve katyonik yüzey aktif maddelerle birlikte (örneğin kuaterner amonyum bileşikleriyle) mikroorganizmalara karşı sinerjistik etki gösterebilmektedir. EDTA, Gram negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakarit yapıyı bozarak hücre membranını daha duyarlı hale getirir^(10,17).

Ayrıca kaprillik glikol, yağ asitleri ve monoesterleri, fenetil alkol, etilheksilgliserin, propilen

glikol, farnesol ve pentilen glikol gibi birçok kimyasal maddenin antimikrobiyal özelliği olduğu gösterilmiştir^(35,42).

Koruyucu etkinlik testleri

Koruyucu etkinlik testleri, kozmetik ürünlerin içerdiği koruyucu maddelerin etkinliğinin denetim ve güvenlik değerlendirilmelerinin yapılması amacıyla uygulanan testlerdir. Bu testler ürünlerin yeterli korunması için gerekli olan koruyucunun tipini ve minimum koruyucu madde miktarını belirlemek için yapılmaktadır. Ürün geliştirme aşaması sırasında kozmetik ürünün formülasyonunda bulunması planlanan koruyucunun; etkinliği, depolama ve kullanım süresince ürünün mikrobiyolojik olarak stabilitesini sağlayacağı güvencesinin değerlendirilmesi gereklidir. Bu değerlendirme bir tarama-zorlama (challenge) testi aracılığı ile yapılır. Bu testler ürünün üretiminden normal depolama ve kullanım koşullarında tamamen tüketilinceye kadar bozulma veya enfekte olma riskine karşı, formülde yer alan koruyucular tarafından korunabileceği konusunda bir güvence vermesi nedeniyle, bütün kozmetiklere uygulanması zorunludur^(12,40). Günümüzde bu testler Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia, USP), İngiliz Farmakopesi (British Pharmacopeia, BP), Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopeia, EP), Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) ve American Society for Testing and Materials (ASTM) gibi kurumlar tarafından belirlenen farklı yöntemlere göre yapılmaktadır.

Tarama testi, bitmiş ürün formülünün yapay kontaminasyona maruz bırakılarak mikrobiyal kontaminasyon riskinin değerlendirilmesine dayanır. Kullanılan tüm yöntemlerde esas, test örneğinin farklı mikroorganizmalar ile bir araya getirilmesinden sonra, farklı zamanlarda alınan test örneklerinde canlı kalan mikroorganizma sayısının belirlenmesidir. Uygulanan yöntemler, deney mikroorganizmaları, kullanılan besiyerleri, örneklerin saklanma koşulları ve testin uygulanışı açısından farklılık göstermektedir⁽³⁴⁾. Testlerin tekrarlanabilirliğinin sağlanması için kullanılacak mikroorganizmalar ülkelerin resmi koleksiyonlarından alınmış suşlardan olmak üzere *Escherichia coli*, *P.aeruginosa*,

S.aureus, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*'dir.

Bu testlerin tümünde, test tek bir hücre için değil, hücre popülasyonlarına bağlı olduğundan, deney mikroorganizmalarının hazırlanması, antimikrobiyal maddenin etkinlik sonuçlarını etkilemesi açısından oldukça önemlidir. Genellikle deneylerde kullanılan bakteri konsantrasyonları 1×10^8 koloni oluşturan birim/mL (kob/mL), ürün içerisinde ulaşılan konsantrasyon miktarı ise 1×10^6 kob/mL'dir. Küf veya maya konsantrasyonu kullanılan etkinlik testine göre 1×10^4 - 1×10^6 kob/mL arasında değişmektedir. Tüm test metodlarında ürün içine eklenen mikroorganizma miktarının % 1'i geçmemesi gerekmektedir. Uygulanan test yöntemine göre değişmekle birlikte, genel olarak 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerde mikroorganizma sayımları için ürün, içindeki koruyucu maddenin etkinliğini ortadan kaldırmak amacıyla nötralizana alınmakta, nötralizasyon edilen bu örneklerden, uygun seyreltmeler yapılarak, sayım uygulanmaktadır.

Test sonucu, her test yönteminin değerlendirme kriterleri doğrultusunda belirlenmektedir. USP ve CTFA'nın belirlediği test değerlendirme kriterlerine göre 14. günde belirlenen bakteri sayılarının başlangıç sayısına göre en az 2-log azalması, 28. günde 14. gündeki sayıya göre artış olmaması; mantar sayısının ise 14. ve 28. günlerde başlangıç sayısına göre artış göstermemesi gerekmektedir. EP ve BP'ne göre ise bakteri sayılarının 2. gün 2-log, 7. gün 3-log azalmış olması ve 28. günde yapılan sayımlarda artmaması; mantar sayılarının ise 14. günde 2-log azalması ve 28. günde artmaması gerekmektedir. ASTM'nin belirlediği değerlendirmede ise bakteri ve maya başlangıç sayılarının her yedi

günlük test periyotlarında en az % 99.9 azalma göstermesi, 28. günde belirlenen mantar sayılarının en az % 90 azalmış olması ve test periyodu boyunca artmaması kriter olarak kabul edilmektedir.

Uygun nötralizasyon seçimi

Uygulanan testte, kozmetik ürünlerin içeriğinde bulunan koruyucu olarak kullanılan antimikrobiyal ajanların test mikroorganizmalarına karşı etkinliğinin belirlenebilmesi için, antimikrobiyal ajanları inaktive edebilecek en uygun nötralizasyon yönteminin bulunması son derece önemlidir⁽⁸⁾. Nötralizasyon işlemi kimyasal, dilüsyon ve filtrasyon olmak üzere üç farklı yöntemle yapılabilmektedir⁽³⁴⁾. Dilüsyon yöntemi ile nötralizasyon, antimikrobiyal ajanın aktivitesinin ortadan kaldırılmasına kadar kültür besiyerinde sulandırılması esasına dayanmaktadır. Fenol ve alkollerin nötralizasyonu örnek olarak verilebilir. Membran filtrasyon yöntemi ise genel olarak antibiyotiklerin aktivitesinin gidermek için kullanılmaktadır. Bu yöntemin esası solüsyon halindeki örneğin filtreden süzülmesine dayanmaktadır⁽⁹⁾. Kimyasal nötralizasyon ise sık kullanılan bir yöntemdir⁽²¹⁾. Bu yöntemde değişik kimyasal maddeleri içeren besiyerleri kullanılarak koruyucu maddeler nötralizasyon edilmektedir. Ancak kullanılan nötralizasyonun ürün içerisindeki tüm antimikrobiyal ajanları inaktive edebilmesi ve mikroorganizmalara karşı toksik olmaması gibi bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir^(9,21). Bu nedenle kullanılacak nötralizasyonun uygunluğu, nötralizasyon çalışmalarını ile araştırılmaktadır⁽⁴¹⁾. Uygun nötralizasyon, validasyon çalışmaları kapsamında nötralizasyon toksisite ve nötralizasyon etkinlik testleri

Tablo 2. Bazı antimikrobiyal maddelere karşı kullanılan nötralizasyon edici ajanlar⁽¹⁶⁾.

Antimikrobiyal ajan	Nötralizasyon edici ajan
Benzoik asit ve p-hidroksibenzoik asit esterleri	Dilüsyon veya Tween 80
Bronopol	Sistin hidroklorür
Klorheksidin	Lubrol W ve yumurta lesitin veya Tween 80 ve lesitin
Formaldehit	Amonyum iyonları
Glutaraldehit	Glisin
Halojenler	Sodyum tiyosülfat
Hekzaklorofen	Tween 80
Civa bileşikleri	Tiyoglikolik asit
Fenolik dezenfektanlar	Dilüsyon veya Tween 80
Kuaterner amonyum bileşikleri	Lubrol W ve lesitin veya Tween 80 ve lesitin
Sülfonamidler	p-aminobenzoik asit

ile belirlenmektedir. Deney sırasında kozmetik ürünlerin içerdiği tüm antimikrobiyal etkili koruyucu maddeleri inaktive edebilen ve deney mikroorganizmalarına karşı toksik etki göstermeyen nötralizan, uygun nötralizan olarak kabul edilmektedir. Genel olarak yapılan çalışmalarla Dey-Engley besiyerinin etkili bir nötralizan ortam olduğu gösterilmiştir^(8,33). Bazı antimikrobiyal maddelere karşı kullanılan nötralize edici ajanlar Tablo 2’de gösterilmiştir⁽¹⁶⁾.

Sonuç

Kozmetik ürünlerdeki mikroorganizma kontaminasyonu tüketici sağlığı açısından önemli bir risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle tüm kozmetik ürünlere formülasyondaki diğer maddelerle uyumlu, geniş spektrumlu ve kullanıcı üzerine alerjik, toksik ya da tahriş edici etkisi olmayan koruyucu maddeler seçilerek eklenmektedir. Kozmetik ürünlere kontamine olma olasılığına karşı mikrobiyal üremeyi önlemek amacı ile ilave edilen koruyucu maddelerin güvenilirliği yanı sıra etkinliğinin belirlenmesi de büyük önem taşımaktadır. Kozmetik ürünlere standart olarak koruyucu kapsamında kabul edilen maddelerin yanı sıra antimikrobiyal etkinliği olan ancak koruyucu olarak kabul edilmeyen birçok madde eklendiğinden, koruyucu etkinlik testleri sırasında hem koruyucunun hem de antimikrobiyal etkili maddelerin aktivitesini inaktive edebilecek uygun nötralizan seçimi büyük önem taşımaktadır. Kozmetik ürünlere eklenen ve koruyucu kapsamında kabul edilmeyen antimikrobiyal etkili maddelerin bu kategoride değerlendirilmesi, yapılan koruyucu etkinliğinin belirlenmesi amaçlı çalışmalarda daha güvenilir ve standart sonuçların alınmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Baird RM. Contamination of non-steril pharmaceuticals in hospital and community environments, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.374-84, Blackwell Science, Oxford (1998).
2. Brannan DK, Dille JC. Type of closure prevents microbial contamination of cosmetics during consumer use, *Appl Environ Microb* 1990;56(5):1476-79. PMID:2339896 PMCID:184433
3. Beveridge EG. Microbial spoilage and preservation of pharmaceuticals products, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.355-73, Blackwell Science, Oxford (1998).
4. Charnock C, Finsrud T. Combining esters of parahydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity, *J Clin Pharm Ther* 2007;32(6):567-72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00854.x> PMID:18021333
5. Common cosmetic preservatives. "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.227-81, Taylor&Francis Group, New York (2006).
6. Curry JC, Brannan DK, Geis PA. History of cosmetic microbiology, "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.3-17, Taylor&Francis Group, New York (2006).
7. Darbre PD. Underarm cosmetics and breast cancer, *J Appl Toxicol* 2003;23(2):89-95. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.899> PMID:12666152
8. Dey BP, Engley FB. Methodology for recovery of chemically treated *Staphylococcus aureus* with neutralizing medium, *Appl Environ Microb* 1983;45(5):1533-37. PMID:6870240 PMCID:242496
9. Denyer SP, Hodges NA. Sterilization control and sterility assurance, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.439-52, Blackwell Science, Oxford (1998).
10. Denyer SP, Wallhaeusser KH. Antimicrobial preservatives and their properties, "Denyer S, Baird R (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals*, 1. baskı" kitabında s.251-73, Ellis Horwood Limited, West Sussex (1990).
11. Doorne HV. Interactions between preservatives and pharmaceutical components, "Denyer S, Baird R (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals*, 1.baskı" kitabında s.274-91, Ellis Horwood Limited, West Sussex (1990).
12. European Commission. The SCCS's Notes Of Guidance For The Testing of Cosmetic Substances and Their Safety Evaluation. Guidelines on microbiological quality of the finished cosmetic product. 8th revision, s.75-76 (2012).
13. Geis PA. Preservation strategies, "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.163-80, Taylor&Francis Group, New York (2006).
14. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.

- <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
PMid:10438227
15. Hugo WB. Mode of action of non-antibiotic antibacterial agents, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.256-62, Blackwell Science, Oxford (1998).
 16. Hugo WB, Russell AD. Evaluation of non-antibiotic antimicrobial agents, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.229-55, Blackwell Science, Oxford (1998).
 17. Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Appl Microbiol* 2004; 96(2):244-53.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02135.x>
PMid:14723685
 18. Lee E, An S, Choi D, Moon S, Chang I. Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives, *Contact Dermatitis* 2007; 56(3):131-6.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01001.x>
PMid:17295686
 19. Lundov MD, Zachariae C. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008, *Int J Cosmetic Sci* 2008;30(6):471-4.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00475.x>
PMid:19099548
 20. Lundov MD, Moesby L, Zachariae C, Johansen JD. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy, *Contact Dermatitis* 2009;60(2):70-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01501.x>
PMid:19207376
 21. Mehrgan H, Elmi F, Fazeli MR, Shahverdi AR, Samadi N. Evaluation of neutralizing efficacy and possible microbial cell toxicity of a universal neutralizer proposed by the CTPA, *Iran J Pharm Res* 2006;3(5):173-8.
 22. Mulhall R, Schmidt E, Brannan DK. Microbial environment of the manufacturing plant, "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.73-96, Taylor&Francis Group, New York (2006).
 23. Naki Sivri N. Türkiye piyasasında mevcut bazı kozmetiklerin gama radyasyonla dekontaminasyonu, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Kongre kitabı, s.230-49, Samsun (2005).
 24. Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice, *Arch Toxicol* 2002;76(7): 423-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00204-002-0360-8>
PMid:12111007
 25. Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system, *Food Chem Toxicol* 2002;40(12):1807-13.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00204-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00204-1)
 26. Orth DS. Principles of preservation, "Denyer S, Baird R (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals*, 1. baskı" kitabında s.241-50, Ellis Horwood Limited, West Sussex (1990).
 27. Pack LD, Wickham MG, Enloe RA, Hill DN. Microbial contamination associated with mascara use, *Optometry* 2008;79(10):587-93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.optm.2008.02.011>
PMid:18922495
 28. Payne DN. Microbial ecology of the production process, "Denyer S, Baird R (eds). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals*, 1. baskı" kitabında s.53-67, Ellis Horwood Limited, West Sussex (1990).
 29. Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives, *Dermatol Ther* 2004;17(3):251-63.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04028.x>
PMid:15186371
 30. Scott EM, Gorman SP. Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives, "Hugo WB, Russell AD (eds). *Pharmaceutical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s. 201-28, Blackwell Science, Oxford (1998).
 31. Smart R, Spooner DF. Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics, *J Soc Cosmet Chem* 1972;23:721-37.
 32. Smith CN, Alexander BR. The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation, *Toxicol In Vitro* 2005;19(7):963-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.014>
PMid:16055304
 33. Sutton SV, Wrzosek T, Proud DW. Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions, *J Appl Bacteriol* 1991;70(4):351-4.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02948.x>
PMid:2055795
 34. Sutton SVW. Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing, "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.111-45, Taylor&Francis Group, New York (2006).
 35. Steinberg DC. Global regulation of preservatives and cosmetic preservatives, "Geis PA (ed). *Cosmetic Microbiology*, 2. baskı" kitabında s.215-26, Taylor&Francis Group, New York (2006).
 36. Steinberg D. Preservatives for Cosmetics, 2. baskı,

- s.1-129, Allured Publishing Co., Illinois, USA (2006).
37. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kozmetik Kanunu, Resmi Gazete, Sayı.5324, (2005).
38. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kozmetik Yönetmeliği, Resmi Gazete, Sayı.25823, (2005).
39. Underwood E. Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry, "Hugo WB, Russell AD (eds). Pharmaceutical Microbiology, 6. baskı" kitabında s.339-54, Blackwell Science, Oxford (1998).
40. The United States Pharmacopoeia, <51> Anti-microbial Effectiveness Testing, USP 24 - NF 19, The United States Pharmacopoeial Convention, Inc (2000).
41. The United States Pharmacopoeia, Validation of Microbial Recovery from Pharmacopoeial Articles, USP 29 - NF 24, The United States Pharmacopoeial Convention, Inc (2005).
42. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E et al. Self-preserving cosmetics, *Int J Cosmetic Sci* 2009; 31(3):163-75.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00492.x>
PMid:19302511