



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOZMETİK ÜRÜNLERDE KULLANILAN BAZI
FİTOKİMYASAL VE UÇUCU YAĞ KOMBİNASYONLARININ
VE KİTOSAN İLE ENKAPSÜLASYONUNUN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SENA ARAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ÜMRAN SOYOĞUL GÜRER

2020-İSTANBUL

BEYAN

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

SENA ARAL



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli tecrübeleri ile bana ışık tutan, çalışmalarımı titizlik ve özenle yönlendiren değerli danışmanım Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER'e,

Tez çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Turgut TAŞKIN, Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN, Ecz. Esra DALKILIÇ, Arş. Gör. Damla DAMAR ÇELİK, Dr. Öğr. Üyesi Pervin RAYAMAN, Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe YEŞİL DEVECİOĞLU, Prof. Dr. Ali Demir SEZER'e

Enkapsülasyon çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Nanomik Biyoteknoloji Şirketi çalışanlarına ve özellikle benden yardımlarını esirgemeyen kurucu/yönetici Buse BERBER ÖRÇEN'e,

Yüksek lisans eğitimime beraber başladığım ve bu yolda bana yardımcı ve destek olan Yıldız ASLAN, Elif KAYA, Elif MURCAK ve tüm diğer arkadaşlarıma,

Çalışmamızda kullandığımız biberiye ve tarçın uçucu yağlarını temin ettiğimiz Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi, Mesul Müdür İlker DEMİRBOLAT'a ve çalışmamızda kullandığımız krem bazını temin ettiğimiz Barentz Gıda ve Kimya, Satış Mühendisi Sultan ERGÜN'e

Daima yanımda olan bana her zaman destek ve güç veren canım annem Ganime ARAL'a,

Tez çalışmam süresince desteğini her zaman hissettiğim, varlığıyla bana güç veren, karşılaştığım tüm zorluklarla mücadele etmemde beni cesaretlendiren değerli nişanlım Asil ORHAN'a tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komitesi (BAPKO) tarafından desteklenmiştir. Proje No: SAG-C-YLP-170419-0147

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	9
4.1. Kozmetik Ürünlerde Kontaminasyon.....	9
4.2. Kozmetik Ürünlerde Koruyucu Madde Kullanımı.....	10
4.3. Kozmetik Koruyucuların İnsan Sağlığı Üzerine Zararlı Etkileri.....	11
4.4. İlaç Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliği Hakkında Genel Bilgiler.....	11
4.5. Koruyucu Etkinlik Testleri Hakkında Genel Bilgiler.....	12
4.5.1. Challenge test	13
4.6. Krem Hakkında Bilgiler	13
4.7. Biberiye Uçucu Yağı	14
4.8. Tarçın Uçucu Yağı.....	14
4.9. Defne Uçucu Yağı	15
4.10. Çörek Otu Yağı.....	16
4.11. Kateşin	17
4.12. Timokinon	18
4.13. Kitosan.....	19
4.14. Mikroenkapsülasyon Teknolojisi	20
4.14.1. İyonotropik jelyasyon teknolojisi	21
4.15. Antioksidanların Genel Özellikleri.....	22

5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
5.1. Gereç.....	24
5.1.1. Uçucu yağlar ve fitokimyasallar.....	24
5.1.2. Mikroorganizmalar	24
5.1.3. Kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri	25
5.1.4. Çözeltiler	26
5.1.5. Çözücüler.....	27
5.1.6. McFarland standart bulanıklık tüpleri	27
5.1.7. Kullanılan cihazlar.....	27
5.1.8. Antibiyotik ve antifungaller.....	28
5.1.9. Koruyucular	28
5.1.10. Krem bazı	28
5.2. Yöntem	29
5.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri	29
5.2.1.1. Disk difüzyon yöntemi	29
5.2.1.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	29
5.2.1.2.1. Bakteriler için sıvı mikrodilüsyon yöntemi	30
5.2.1.2.2. Mayalar için sıvı mikrodilüsyon yöntemi.....	30
5.2.1.2.3. Küfler için sıvı mikrodilüsyon yöntemi	31
5.2.2. Sinerji testi.....	32
5.2.3. Kitosan ile enkapsülasyon işlemi	33
5.2.3.1. Mikroenkapsülasyon veriminin tayini	34
5.2.3.2. Etken madde salım testi	34
5.2.3.3. Mikrokapsül karakterizasyon verilerinin incelenmesi.....	35
5.2.4. Challenge test	35

5.2.4.1.	Amerikan farmakopesi (USP)	35
5.2.5.	Antioksidatif etkinlik testi	36
5.2.5.1.	Demir (III) indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)	36
5.2.5.1.1.	Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması	36
5.2.5.1.2.	Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler	37
5.2.5.2.	Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)	37
5.2.5.2.1.	Troloksun kalibrasyon eğrisinin hazırlanması.....	38
5.2.5.2.2.	CUPRAC aktivite deneyinde kullanılan çözeltiler	38
5.2.5.3.	DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi	38
5.2.5.3.1.	DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti	38
6.	BULGULAR	39
6.1.	Uçucu Yağlar, Fitokimyasallar ve Kitosanın Antimikrobiyal Etkisi	39
6.2.	Sinerji Testi	43
6.2.1.	<i>P. aureginosa</i> için checkerboard sonuçları.....	43
6.2.2.	<i>S. aureus</i> için checkerboard sonuçları	45
6.2.3.	<i>E. coli</i> için checkerboard sonuçları	47
6.2.4.	<i>C. albicans</i> için checkerboard sonuçları.....	49
6.2.5.	<i>A. niger</i> için checkerboard sonuçları	53
6.3.	Kitosan ile Enkapsülasyon İşlemi	54
6.3.1.	Uçucu yağ ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin antimikrobiyal etkisi.....	54
6.3.2.	Mikroenkapsülasyon veriminin tayini	56
6.3.2.1.	Biberiye-tarçın mikrokapsülünün enkapsülasyon veriminin hesaplanması.....	57

6.3.2.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün enkapsülasyon veriminin hesaplanması	59
6.3.3. Mikrokapsüllerin karakterizasyonu	61
6.3.3.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün karakterizasyon verileri	61
6.3.3.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülün karakterizasyon verileri	63
6.3.4. Salınım testleri	65
6.3.4.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün salınım kinetiğinin incelenmesi.....	65
6.3.4.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün salınım kinetiğinin incelenmesi	65
6.4. Challenge test	67
6.4.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün challenge testi sonuçları	68
6.4.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün challenge testi sonuçları.....	69
6.4.3. Fenoksietanol-kaprilil glikol kombinasyonu challenge testi sonuçları	70
6.5. Antioksidatif Etkinlik Testi	71
6.5.1. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)	71
6.5.2. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini	72
6.5.3. DPPH Radikal süpürücü aktivite tayini.....	74
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
8. KAYNAKLAR	92
9. EKLER.....	124
10. ÖZGEÇMİŞ.....	125

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AET: Antimicrobial Effectiveness Test

ASEAN: The Association of Southeast Asian Nations

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATCC: American Type Culture Collection

CTFA: Cosmetic Toiletry and Fragrances Association

CUPRAC: Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi

DMSO: Dimetil Sülfoksit

ET: Tek Elektron Transferi

FCR: Folin-Ciocalteu Reaktifi

FDA: Food and Drug Administration

FRAP: Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su

gr: Gram

HAT: Hidrojen Atomu Transferi

ISO: International Organization for Standardization

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth

KOB: Koloni Oluşturan Birim

mg: Miligram

MHA: Mueller Hinton Agar

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

mL: Mililitre

MMW: Orta Moleküler Ağırlık

MOPS: Morfolino Propan Sülfonik Asit

OD: Optik Dansite

PCPC: Personal Care Products Council

PDA: Potato Dekstroz Agar

PDI: Polydispersity Index

PET: Preservative Effectiveness Test

ROS: Kolesteril Ester

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

STPP: Sodyum Tripolifosfat

TEAC: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite

TPP: Tripolifosfat

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

USP: United States Pharmacopoeia

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kateşin kimyasal yapısı	18
Şekil 2. Timokinon kimyasal yapısı	19
Şekil 3. Kitosan kimyasal yapısı	20
Şekil 4. <i>P.aeruginosa</i> için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı	44
Şekil 5. <i>S.aureus</i> için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı	46
Şekil 6. <i>E.coli</i> için için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı	48
Şekil 7. <i>C.albicans</i> için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı	50
Şekil 8. <i>A.niger</i> için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı	53
Şekil 9. Biberiye uçucu yağının kalibrasyon eğrisi (234 nm).....	57
Şekil 10. Tarçın uçucu yağının kalibrasyon eğrisi (246 nm).....	57
Şekil 11. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün kalibrasyon eğrisi (234-246 nm)	58
Şekil 12. Kateşin fitokimyasalının kalibrasyon eğrisi (230 nm).....	59
Şekil 13. Timokinon fitokimyasalının kalibrasyon eğrisi (248 nm)	59
Şekil 14. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün kalibrasyon eğrisi (230-248 nm).....	60
Şekil 15. Biberiye-tarçın mikrokapsülün zeta potansiyel verisi	61
Şekil 16. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün boyut ölçümü verisi	62
Şekil 17. Kateşin-timokinon mikrokapsülün zeta potansiyel verisi.....	63
Şekil 18. Kateşin-timokinon mikrokapsülün boyut ölçüm verisi	64
Şekil 19. Kitosan ile enkapsüle edilmiş biberiye-tarçın mikrokapsülünün zamana bağlı salınım kinetiği.....	65
Şekil 20. Kitosan ile enkapsüle edilmiş kateşin-timokinon mikrokapsülünün zamana bağlı salınım kinetiği.....	66
Şekil 21. FeSO ₄ 'ın kalibrasyon eğrisi.....	71
Şekil 22. Numunelerin FRAP değerleri	72

Şekil 23. Troloks kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 24. Numunelerin CUPRAC değerleri	74
Şekil 25. Numunelerin IC ₅₀ değerleri	75

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Biberiye, <i>Rosmarinus officinalis</i>	14
Resim 2. Tarçın kabuğu, <i>Cinnamomum cassia</i>	15
Resim 3. Defne yaprağı, <i>Laurus nobilis</i>	16
Resim 4. Çörek otu, <i>Nigella sativa</i>	17
Resim 5. BİOTEK Epoch 2 mikroplaka okuyucu	33
Resim 6. Krem bazı+koruyucu içeren tüpler	67

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Uçucu yağların antibakteriyel etkisi.....	39
Tablo 2. Uçucu yağların antifungal etkisi	40
Tablo 3. Fitokimyasalların antibakteriyel etkisi.....	40
Tablo 4. Fitokimyasalların antifungal etkisi.....	41
Tablo 5. %1’lik kitosanın antibakteriyel etkisi.....	41
Tablo 6. %1’lik kitosanın antifungal etkisi	42
Tablo 7. Meropenemin antibakteriyel etkisi ve CLSI duyarlılık sınır değerleri	42
Tablo 8. Flukonazol ve Amfoterisin B’nin antifungal etkisi ve CLSI duyarlılık sınır değerleri.....	43
Tablo 9. <i>P.aeruginosa</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri.....	45
Tablo 10. <i>S.aureus</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri	47
Tablo 11. <i>E.coli</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri.....	49
Tablo 12. <i>C.albicans</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri	51
Tablo 13. <i>C.albicans</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri (Devamı).....	52
Tablo 14. <i>A.niger</i> için kombinasyonların MİK/FİK değerleri	54
Tablo 15. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün MİK değerleri.....	55
Tablo 16. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün MİK değerleri.....	56
Tablo 17. Krem örneklerinde Amerikan Farmakopesine göre bulunması gereken mikroorganizma miktarları.....	67
Tablo 18. Mikroorganizmaların 0.gün koloni sayımları	68
Tablo 19. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları.....	68
Tablo 20. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün logaritmik azalma değerleri	69
Tablo 21. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları.....	69

Tablo 22. Fenoksietanol- kaprilil glikol koruyucu kombinasyonunun 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları	70
Tablo 23. Fenoksietanol- kaprilil glikol koruyucu kombinasyonunun logaritmik azalma değerleri	70
Tablo 24. Numunelerin demir (III) indirgeme antioksidan gücü	72
Tablo 25. Numunelerin bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan gücü	73
Tablo 26. Numunelerin DPPH radikali süpürücü aktivitesi.....	75

1. ÖZET

Kozmetik Ürünlerde Kullanılan Bazı Fitokimyasal ve Uçucu Yağ Kombinasyonlarının ve Kitosan ile Enkapsülasyonunun Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması

Öğrenci Adı: Sena ARAL

Danışman Adı: Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER

Anabilim dalı: Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Çalışmamızda, sentetik koruyuculara alternatif olarak kullanılmak üzere uçucu yağların ve fitokimyasalların sinerjik etkileri araştırılmış ve kitosan ile enkapsüle formülü geliştirilmiştir. Seçilen kozmetik üründe formülasyonun koruyucu etkinlik testi ile raf ömrü tayini yapılmış ve antioksidan etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Uçucu yağların, fitokimyasalların ve kitosan ile enkapsüle edilmiş formunun antimikrobiyal etkisi disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve checkerboard yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Standart bakteri, maya ve küf suşları kullanılmıştır. Challenge test yönteminde Amerikan farmakopesine göre formülasyonun koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Kitosan enkapsüle formülasyonların antioksidan etkileri demir (III) indirgeme antioksidan gücü tayini yöntemi (FRAP), bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) ve radikal süpürücü aktivite yöntemi (DPPH) ile saptanmıştır.

Bulgular: Biberiye-tarçın uçucu yağı ve kateşin-timokinon fitokimyasal kombinasyonlarının enkapsüle edilmiş formları, kaplanmamış formlarına göre daha fazla antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Challenge testte biberiye-tarçın mikrokapsülleri bakteriler ve maya için, kateşin-timokinon mikrokapsülleri ise sadece maya için raf ömrünü etkili bir şekilde sağlarken; her iki mikrokapsülün *Aspergillus niger*'e karşı 28. günde raf ömrünü azalttığı görülmüştür. Serbest biberiye-tarçın kombinasyonu ile biberiye-tarçın mikrokapsülünde en yüksek değerde antioksidan etki saptanmıştır.

Sonuç: Antimikrobiyal ve sinerjist etkili biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin sentetik koruyuculara alternatif olarak kozmetik ürünlerde doğal koruyucu olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Uçucu yağ, fitokimyasal, enkapsülasyon, antimikrobiyal etki, antioksidan etki

2. SUMMARY

Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Effects of Some Phytochemical and Essential Oil Combinations and Encapsulation with Chitosan Used in Cosmetic Products

Student Name: Sena ARAL

Name of Supervisor: Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER

Department: Pharmaceutical Microbiology

Objective: In our study, the synergistic effects of essential oils and phytochemicals were investigated for use as an alternative to synthetic preservatives and an encapsulated formula was developed with chitosan. In the selected cosmetic product, shelf life was determined by the protective effectiveness test of the formulation and antioxidant effects were investigated.

Materials and Methods: The antimicrobial effect of essential oils, phytochemicals and chitosan encapsulated form was evaluated by disc diffusion, broth microdilution and checkerboard methods. Standard bacteria, yeast and mold strains were used. The protective efficacy of the formulation was investigated according to the American Pharmacopoeia in the Challenge test method. The antioxidant effects of chitosan encapsulated formulations were determined by the ferric (III) reducing antioxidant power assay method (FRAP), cupric (II) ion reducing antioxidant capacity method (CUPRAC) and free radical sweeping activity method (DPPH).

Results: The encapsulated forms of rosemary-cinnamon essential oil and catechin-thymoquinone phytochemical combinations showed more antimicrobial activity than uncoated forms. In the Challenge test, rosemary-cinnamon microcapsules are for bacteria and yeast, while catechin- thymoquinone microcapsules effectively provide shelf life for yeast only; both microcapsules decreased the shelf life against *A.niger* on the 28th day. Free combination of rosemary-cinnamon and rosemary-cinnamon microcapsules were found to have the highest antioxidant effect.

Conclusion: It has been shown that rosemary-cinnamon and catechin-thymoquinone microcapsules, which we find to be antimicrobial and synergistically effective, can be used as natural preservatives in cosmetic products as an alternative to synthetic preservatives.

Keywords: Essential oil, phytochemical, encapsulation, antimicrobial effect, antioxidant effect

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kozmetik ürünlerdeki koruyucu maddeler, kozmetik ürünlerde kontaminasyona neden olan bakteriler ve maya/küf şeklindeki mantarların üremelerini engellemek ya da ürünün kimyasal olarak bozunmasını önlemek amacıyla genellikle bitmiş ürüne eklenen kimyasal maddelerdir (Sasseville, 2004). Su bazlı tüm kozmetik formülasyonlarda bakteri veya mantar gelişimini önlemek için antimikrobiyal koruyucuların eklenmesi gereklidir. Kremler, losyonlar, pudralar ve şampuanlar mikroorganizma üremesine duyarlı olan ürünlerdir. Su oranı yüksek formülasyonlu kozmetik ürünlerde uygun koruma sağlanamadığı takdirde mikrobiyal kontaminasyon için uygun ortamlar oluşmaktadır. Göz farları ve pudralar gibi toz şeklindeki ürünlerde de çevre koşulları ve kullanıma bağlı olarak kontaminasyon olabilir. Mikrobiyal kontaminasyon, kötü koku, viskozite ve renk değişiklikleri gibi duyuşal değişikliklere neden olmakla kalmaz, aynı zamanda tüketicinin sağlığı açısından da risk yaratabilir (Salvador ve Chisvert, 2007). Kontaminasyonun meydana geldiği kozmetik ürünler özellikle çatlak, yarık ve kesik gibi bütünlüğü bozulmuş vücut yüzeilerine uygulandıklarında derinin alt tabakalarına kolaylıkla geçerek deride irritasyona veya alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (Özyaral ve ark., 1993).

Kozmetik ürünlerde en sık görülen mikroorganizmaların *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter gergoviae* ve *Serratia marcescens* olduğu ve aynı zamanda diğer bakterileri, mayaları ve küfleri içerdiiği bildirilmiştir (The SCCS, 2016).

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, ucuz ve kolay

ulaşılabilir olması gibi bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (Smith ve ark.i 2005; Lundov ve ark., 2009; Steinberg, 2006; Salvador ve Chisvert, 2007).

Kozmetik ürünlerde en çok kullanılan sentetik koruyucular parabenlerdir ve bunlar sıklıkla diğer koruyucular ile birlikte kullanılmaktadırlar. Parabenlerin, antifungal aktivitesinin antibakteriyel aktivitesinden daha yüksek olduğu ve gram pozitif bakterilere karşı etkisinin gram negatiflere kıyasla daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Rietschel ve Fowler, 2001). Kozmetiklerde (şampuanlar, makyaj ürünleri, nemlendirici kremler ve losyonlar, parfümler, ıslak mendiller gibi) koruyucu olarak kullanılan diğer kimyasallara benzil alkol, kaprilit glikol, propilen glikol, bronopol, fenoksietanol, potasyum sorbat, benzoik asit ve benzoik asitin tuzu olan sodyum benzoat ve diazolinidil üre örnek verilebilir (Nair, 2001; Ziosi ve ark., 2013; Wang ve ark., 2002; Bryce ve ark., 1978; Davidson ve ark., 2005; Castanedo ve Zug, 2009; US FDA, 1972).

Son yıllarda sentetik koruyucular; endokrin bozucu özellikleri (parabenler), karsinojenik nitrozaminlere dönüşme potansiyelleri (bronopol), dermatit gibi cilt reaksiyonlarına yol açmaları (fenoksietanol, paraben) nedeniyle dikkat çekmektedir. Günümüzde sentetik koruyucular kadar etkili ancak yan etki potansiyelleri düşük doğal kaynaklı koruyucuların geliştirilmesine yönelik yürütölen çalışmaların sayısı artmıştır (Bloomfield ve ark., 1998; Charnock ve Finsrud, 2007; Oishi, 2002; Park ve ark., 2014; Darbre, 2003; Yim ve ark., 2014; Kaymak ve Tırnaksız, 2007; Biebl ve Warshaw, 2006). Bu nedenle çalışmamızda doğal kaynaklı ürünler (uçucu yağlar ve fitokimyasallar) tercih edilmiştir.

Uçucu yağlar, antioksidan, antimikrobiyal, sindirim uyarıcı ve koku verici özelliklerinden dolayı kozmetik, aromaterapi ve fitoterapide sıklıkla kullanılan doğal ürünlerdir. *Cinnamomum zeylanicum* Nees (Tarçın) (Lauraceae) bitkisinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal, antidiyabetik, antipiretik ve antioksidan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca uçucu yağında major olarak sinnamaldehit ve sinnamoil asetat bileşikleri bulunduğu tespit edilmiştir (Qin ve ark., 2003). *Laurus nobilis* L. (Defne) (Lauraceae) türünden elde edilen uçucu yağın major olarak

sabinen, okaliptol ve terpinen-4-ol bileşikler içerdği ve uçucu yağının antioksidan, antimikrobiyal etkilere sahip olduğu saptanmıştır (Gölükçü ve ark., 2017). *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye) (Lamiaceae) önemli bir tıbbi ve aromatik bitki türüdür (Özcan ve Chalchat, 2008) ve elde edilen uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Zaouali ve ark., 2010; Genana ve ark., 2008). Bu bitkinin uçucu yağında α -pinen, kamfen, mirisen, limonen, kamfor, borneol bileşiklerinin major olarak bulunduğu tespit edilmiştir. *Nigella sativa* L. (çörek otu) (Ranunculaceae) bitkisinden elde edilen yağın ve major etken maddesi olan timokinon bileşiğinin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör ve bakterisit etkiler gösterdiği ve ayrıca diğer antibiyotiklerle sinerjistik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Andhare ve ark., 2016).

Kateşinler, yeşil çayın başlıca polifenolik bileşikleri olup, antioksidan, antimikrobiyal, antifungal ve antitümör özellikleri bilinmektedir (Veluri ve ark., 2004; Hamilton, 1995; Gomes ve ark., 2017). Timokinon (TQ) ve timohidrokinon (THQ) çörek otu esansiyel yağının iki ana bileşenidir ve antibakteriyel ve antifungal etkinliği gösterilmiştir (Aljabre ve ark., 2005). Çalışmamızda yukarıda anlatılan uçucu yağlara ilaveten kateşin ve timokinon fitokimyasal bileşikleri de kullanılacaktır.

Mikroenkapsülasyon aktif bir maddenin (çekirdek materyal) çevresinin bir veya daha fazla kaplama maddesi (duvar materyali) ile sarılıp nanometre, mikrometre ve milimetre aralığında büyüklüğe sahip kapsüllerin (nano/mikrokapsül) elde edilmesinde kullanılan bir teknolojidir. Enkapsülasyon teknolojisi günümüzde ilaç, kimya, kozmetik, gıda ve boya gibi farklı birçok sektörde kullanılmaktadır (Koç ve ark., 2009). Mikroenkapsülasyonun bir dizi temel avantajları vardır. Duyarlı ve kararsız malzemelerin çevresel faktörlerden korunması, işlenebilirliklerinin artırılması, hedeflenen malzemelerin salınım ve zamana bağlı salınımın sağlanması, istenmeyen kokunun veya tadın maskelenmesi ile toksik materyallerin güvenli ve rahat kullanımını sağlar (Ghosh, 2006).

Çalışmamızda mikroenkapsülasyon işleminde kullanacağımız kaplama materyali kitosan olacaktır. Günümüzde uçucu yağların kapsüllemesi için nişasta, selüloz, pektin, guar sakızı, kitosan, dekstran ve siklodekstrin gibi bir dizi taşıyıcı ajan

kullanılmaktadır. Hepsinin arasından, kitosan ve modifiye edilmiş formu, biyouyumlu, biyolojik olarak bozunabilir ve mukoadesif doğası nedeniyle güvenli ve ekonomik taşıyıcı bir ajan olarak tercih edildiği rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2020).

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için önemli bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitosan çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bu durum özellikle kitosanın polikasyonik yapısından kaynaklanmakta ve gıda, ziraat, tıp, eczacılık, kozmetik ve tekstil gibi hijyenin önemli olduğu birçok sektörde geniş çapta antimikrobiyal madde olarak kullanılabilir (Demir ve Seventekin, 2009).

Yapılan bir çalışmada, kitosan filmlerinin *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 üzerinde önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğu ve uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin artırılması amacıyla kitosan filmleri ile birlikte kullanım olanaklarının olduğu bildirilmiştir (Torlak ve Nizamhoğlu, 2009). Bir başka in vitro çalışmada kitosanın % 1-1,5 gibi yüksek konsantrasyonlarda *S.aureus*, % 0,5-1 konsantrasyonlarda *E.coli* üzerinde tam inhibisyon etkisinin olduğu bildirilmiştir (Wang, 1992). Günümüzde, uçucu yağların sağlık ve tıbbi özellikleri için gıdadan gıda ambalajına, bitki ve ürün koruyucuları olarak farklı alanlarda sayısız uygulamaları vardır, ancak doğrudan yüksek ısıya, neme, ışığa veya oksijene maruz kalma nedeniyle yüksek uçuculukları ve düşük stabiliteyi potansiyel kullanımlarını sınırlayabildiği bildirilmiştir (Risalitia L., vd., 2019). *C. zeylanicum* uçucu yağı etkili bir antimikrobiyal ajandır. Bununla birlikte, yüksek uçucu doğası ve düşük stabilitesi verimli bir kapsülleme sistemi gerektirdiği rapor edilmiştir (Matshetshe ve ark., 2018). Çalışmamızda kullanacağımız fitokimyasallardan kateşin yeşil çayda (*Camellia sinensis*) bulunan önemli bir antioksidandır, fakat cilde iyi nüfuz etmedikleri için kozmetik ürünlerde yeşil çayın kullanımının şimdiye kadar sınırlı kaldığı bildirilmiştir (Peres ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, yeşil çay ekstraktından ve yeşil çay ekstraktıyla yüklenen kitosan mikrokapsüllerinden kateşinlerin kutanöz (deri) emilimi değerlendirildiğinde, kitosan mikrokapsüllerinin, kateşinlerin cilde nüfuz etmesini ve enzimatik değişikliklerini etkin bir şekilde önleme yeteneklerini önemli ölçüde geliştirdiği rapor edilmiştir (Wisuitiprot ve ark., 2011). Bu sebeple, seçtiğimiz doğal

kaynakların stabilitesini arttırmak amacıyla enkapsülasyon için kitosan polimeri seçilmiştir.

Uçucu yağların ayrı ayrı antimikrobiyal etkinlik çalışmalarının yanısıra; yaygın kullanılan sentetik kozmetik koruyucular ile uçucu yağ kombinasyonlarının sinerjik antimikrobiyal etkilerinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur. Literatür bilgileri uçucu yağların kozmetikte sentetik koruyuculara alternatif olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (Patrone ve ark., 2010). Bundan dolayı çalışmamızda yalnızca doğal kaynaklı maddelerin bulunduğu bir koruyucu elde edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda fitokimyasal bileşikler ve uçucu yağ kombinasyonlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması ve en güçlü etki sergileyen doğal koruyucu kombinasyonun/larının kitosanla enkapsüle formülünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Kozmetiklerde en sık kontaminasyon nedeni olan mikroorganizmaların *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Candida spp.* ve *Aspergillus spp.* olduğu bildirilmiştir (Anelich, 1996).

Çalışmamızda antimikrobiyal etki tayininde; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 standart suşları ile çalışma planlanmıştır. Ayrıca kitosanla enkapsüle formülün, piyasadaki kozmetik ürünlerde en sık kullanılan fenoksietanol ve kaprilil glikol gibi sentetik koruyucular ile raf ömrü (Amerikan Farmakopesine göre challenge testi ile) ve etkinliği bakımından kıyaslanması amaçlanmıştır.

Literatürlerde, enkapsülasyonunu yapacağımız fitokimyasalların ve uçucu yağların ayrı ayrı antioksidan etkilerini değerlendiren ve güvenliliğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Gholamnezhad ve ark., 2016; Thanekar ve ark., 2013; Singh ve Katiyar, 2011; Miladi ve ark., 2013; Pereira ve ark., 2017; Chao ve ark., 2005; Lee ve ark., 2016). Çalışmamızda kombinasyon haline getirilecek enkapsüle formülün kozmetik amaçlı kullanımı dikkate alınarak antioksidatif etki çalışmasının da yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, fitokimyasal bileşikler (Kateşin, Timokinon) ve uçucu yağ [*Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye), *Cinnamomum cassia* (Tarçın), *Laurus nobilis*

L. (Defne), *Nigella sativa* L. (Çörek otu yağı)] kombinasyonlarının sinerjik etkilerinin araştırılması; en fazla antimikrobiyal etki gösteren kombinasyonun enkapsülasyon formülasyonunun geliştirilmesi; ardından formülasyonda antimikrobiyal etkinin devam edip etmediğinin kontrolü ve formülasyonun koruyucu etkinlik testi (challenge test) ile raf ömrü tayinin yapılması ve son olarak formülasyonun antioksidan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kozmetik Ürünlerde Kontaminasyon

Kozmetik ürünler steril olmayan ürünler olduğundan üretim sırasında hammadde, kullanılan ekipman, üretici materyalleri gibi etmenlerden dolayı mikroorganizmaların kontaminasyonuna her an açık olan ürünlerdir (Özalp, 1998).

Kozmetik ürünlerin bileşiminde bulunan su, organik maddeler mikroorganizmanın gelişimi için elverişli bir ortam sağlar. Mikroorganizma üremesine bağlı olarak bozulmuş bir üründe renk ve ürünün viskozitesinde değişiklikler, koku ve/veya gaz oluşumu görülebilir. Kozmetik ürünlerin steril olmasına ihtiyaç duyulmamasına rağmen belirli mikrobiyolojik limitler dahilinde olması gerekmektedir. Ürünün bu limitlerin içerisinde olması için de üreticinin iyi üretim uygulamaları, koruyucu maddelerin kozmetik ürünlere yasal sınırlar içerisinde yeterli miktarda eklenmesi gibi kriterlere özen göstermesi gerekmektedir (Özalp, 1998; Ravita ve ark., 2009).

Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalar ile kirlenmesi, ürünün bozulmasına neden olabilir ve patojenik olduğunda tüketiciler için ciddi bir sağlık riski oluştururlar (Campana ve ark., 2006).

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından, 2005 yılında yayımlanan Kozmetik Yönetmeliğine dayandırılarak hazırlanan “Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz’da”, kozmetik ürünlerde kesinlikle bulunmaması gereken mikroorganizmaların *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *C. albicans* olduğu belirtilmiştir. Kozmetik ürünler için iki ayrı kategori tanımlanmıştır: “3 yaş altı çocuklara yönelik ürünler, göz bölgesine uygulanan ürünler ve mukoz membranlara uygulanan ürünler için toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (bakteri, maya ve küf) 1 g veya mL’inde, 10^2 kob/g-mL’den fazla olmaması ve diğer ürünler için toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı 10^3 kob/g-mL’den fazla olmaması belirlenmiştir” (T.C. Sağlık Bakanlığı TİTCK, 2005).

Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA)'a göre kozmetik ürünler hakkında gelen mikrobiyoloji raporlarında en çok rastlanan patojen mikroorganizma *P. aeruginosa*'dır (Sivri, 2005).

Mikrobiyoloji çalışmaları değerlendirildiğinde; şampuan, el kremi, saç toniği ve saç kremi örneklerinde *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter* cinsi bakteriler ile *Candida parapsilosis* ve *Aspergillus flavus* mantarlarına rastlanıldığı bildirilmiştir. (Anelich ve Korsten, 1996; Behravan ve ark., 2000; Hugbo ve ark., 2005).

Hugbo ve arkadaşlarının çalışmasında değerlendirilen 6 krem ve 4 losyondan oluşan ticari kozmetik ürünlerde *Staphylococcus* türleri ve diğer gram-pozitif kokların en baskın üreyen bakteriler olduğu ve gram-negatif bakteri türlerine ise pek rastlanılmadığı bildirilmiştir. Küf ve maya kontaminasyonunun büyük ölçüde *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* ve *Microsporum* türlerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. İncelenen bu kozmetik ürünlerin genellikle resmi kılavuzlarda belirtilen mikrobiyal sınır standartlarını karşılamadığı görülmüş ve bu tür ürünlerin tüketicilerin sağlık durumunu ve ürünlerin stabilite profillerini olumsuz yönde etkileyebileceği rapor edilmiştir (Hugbo ve ark., 2005).

4.2. Kozmetik Ürünlerde Koruyucu Madde Kullanımı

Kullanım ve depolama sırasında kozmetiklerin mikrobiyolojik kontaminasyonunu önlemek için, genellikle bitmiş ürüne koruyucu maddeler eklenir (Lundov ve ark., 2009).

Kozmetik için ideal koruyucunun; renksiz, kokusuz, suda çözünür, toksik olmayan, alerjik olmayan, tahriş edici olmayan, geniş bir pH aralığında etkili ve geniş bir mikrobiyal spektrumun büyümesini inhibe edici olması gerektiği belirtilmiştir (Fransway, 1991).

Koruyucu maddelerin mikroorganizmaları öldürürken tüketiciye zarar verebileceği bilindiğinden bu durum yönetmelik ve yasalarla düzenlenmiştir (Steinberg, 2006). Kullanılan koruyucu maddelerin izin verilen maksimum konsantrasyonları, hangi ürünlerde kullanımlarının sınırlandırıldığı ve kullanılmasına izin verilmeyen kimyasal

maddelerin listeleri bu yönetmeliklerde belirtilmiştir. (Birteksöz ve Tüysüz, 2013). Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik olarak korunması ile ilgili kurallar dünyada Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa Birliği (AB) gibi kuruluşlar, ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan yönetmeliklerle belirlenmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2005).

4.3. Kozmetik Koruyucuların İnsan Sağlığı Üzerine Zararlı Etkileri

Kozmetik ürünlerdeki koruyucular ve koku bileşenlerinin en temel alerjen kaynakları olduğu bildirilmiştir (Biebl, 2006).

Kozmetiklerde kullanılan sentetik koruyucuların, ürünü ilk uygulamada ya da uygulamadan yıllar sonra hafif cilt tahrişinden, meme tümörlerini indüklemeye potansiyeli olan östrojenik aktiviteye kadar istenmeyen etkilere yol açtığı bilinmektedir (Harvey, 2004).

Parabenler, kozmetikte en sık kullanılan koruyuculardır, ancak alerjik kontakt dermatit vakaları tanımlandıktan sonra topikal ilaçlarda daha az popüler hale gelmişlerdir (Rietschel ve Fowler, 2001). Özellikle koltuk altına uygulanan ürünlerde koruyucu olarak kullanılan parabenlerin östrojenik aktivitelerinin bulunması sebebiyle meme kanseri ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Darbre, 2003).

Serbest formaldehitin, kısmen tahriş edici, hassaslaştırıcı ve potansiyel kanserojen etkisinin olduğunu bildiren çalışmalar sebebiyle, kozmetik ürünlerinde kullanımı azalmıştır (Groot ve ark., 2010).

Metilizotiazolinon içeren ıslak mendillerin kullanımı sonucunda kontakt dermatit olduğu bildirilmiştir (Chang ve ark., 2014).

Diazolidinil üre ile temas alerjisi prevalansı 1996-2002 yılları arasında ABD'de, % 2,7 ile % 3,7 arasında değişmektedir (Marks ve ark., 2000; Pratt ve ark., 2004).

4.4. İlaç Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliği Hakkında Genel Bilgiler

İlaçlar kombine edildiklerinde birbirleri ile 4 farklı şekilde etkileşirler. Bunlar sinerjistik, antagonist, aditif ve indifferens etkileşimleridir (Aktaş, 2014). İlaç kombinasyonlarının

in vitro etkinliğini ölçen testler: checkerboard (dama tahtası) yöntemleri (mikrodilüsyon, makrodilüsyon, agar dilüsyon), zamana bağlı öldürme yöntemi (time-kill method), disk diffüzyon yöntemi ve E test yöntemidir. Bu testlerin sonuçlarına göre kombinasyonun etkisi, ilaçlar tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha yüksekse sinerjizmden, düşükse antagonizmden, toplamına eşitse aditif ya da indiferan etkiden söz edilir. Sinerjinin bir diğer tanımı olarak tek başına bir antibiyotiğin MİK değerine oranla, aynı antibiyotiğin kombinasyon MİK'inde en az dört kat düşüş de kullanılmaktadır. Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ilaç kombinasyonlarının in vitro etkisini ölçmede en sık kullanılan yöntemdir (Bal, 1999). Bu yöntemde, araştırılmak istenen farklı ilaçların, değişik konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde bir araya getirilerek kombinasyon etkinlikleri test edilmektedir. İlaçların kombinasyondan elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) elde edilmektedir. Bu yöntemde sinerji $FİKİ \leq 0.5$, aditif etkileşim $FİKİ = 1$ ve antagonizma $FİKİ = 2$ baz alınarak tanımlanır. Yeni kaynaklar, 4'ten büyük bulunan FİKİ değerlerinin antagonizma olarak tanımlanması gerektiğini belirtmekte, kesin sınırlarla tanımlanan sinerji ($FİKİ \leq 0.5$) ve antagonizma ($FİKİ > 4$) dışındaki durumlar için ($0.5 < FİKİ \leq 4$) tanımlanamayan (indiferans) teriminin kullanılmasının daha doğru olacağı bildirmektedir (Özseven ve ark., 2012).

4.5. Koruyucu Etkinlik Testleri Hakkında Genel Bilgiler

Koruyucu etkinlik testi, bitmiş üründe koruyucuların etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. Koruyucu etkinlik testi başlangıçta, üretim süreci sırasında veya sonrasında üründe bulunan mikroorganizmaları inhibe etmek için kullanılan antimikrobiyallerin etkisini ölçmek amacıyla tasarlanmıştır (Halla ve ark., 2018). Bu testler genel olarak değişik farmakopelerde Challenge Test, Koruyucu Etkinlik Testi (PET) veya Antimikrobiyal Etkinlik Testi (AET) olarak adlandırılmaktadır (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011).

Koruyucu etkinliğinin saptanması için standart yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; Avrupa, Amerikan ve Japon Farmakopeleri, Kişisel Bakım Ürünleri Konseyi (PCPC) (CTFA-M1'den CTFA-M7'ye), Güneydoğu Asya Ülkeleri Birliği

(ASEAN), Amerikan Test ve Malzeme Derneği (ASTM) ve Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO 11930 standardı) gibi kuruluşlarda açıklanmıştır (Halla ve ark., 2018).

4.5.1. Challenge test

Challenge testi, ürün geliştirme sırasında koruyucu sistemin zaman içindeki etkinliğini ve stabilitesini belirlemek için kullanılır. Test, ölçülen miktarda ürünün, bilinen miktarlarda mikroorganizmalarla (bakteri, maya ve küf) aşılmasını içerir (Cundell ve ark., 2010). Mikroorganizma sayısındaki azalma oranları, resmi mevzuat belgelerinde belirtilen kabul kriterlerine göre bu süre içinde ölçülür (Sandle, 2016; Booth, 2014).

Bu testlerin ürünün üretiminden, normal depolama ve kullanım koşullarında tamamen tüketilinceye kadar bozulma veya enfekte olma riskine karşı, formülasyonda bulunan koruyucular tarafından korunabileceği konusunda bir güvence vermesi sebebiyle, bütün kozmetiklere uygulanması zorunludur (Birteksöz ve Tüysüz, 2013).

Bu testlerde kullanılması önerilen mikroorganizmalar Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) gibi resmi hücre kültürü koleksiyonlarından elde edilmektedir. En yaygın kullanılan test suşları gram-pozitif bakterilerden *S.aureus*, gram-negatif bakterilerden *E.coli* ve *P.aeruginosa*, mantarlardan *C. albicans* ve *A.niger*'dir (Stewart ve ark., 2016).

4.6. Krem Hakkında Bilgiler

Cilt bakımı için kozmetik formülasyonların çoğu, yağ/su emülsiyonu, su/yağ emülsiyonu veya çift emülsiyon (yağ-su-yağ veya su-yağ-su) dan oluşur. Dermatolojik bir bakış açısından, su/yağ emülsiyonu daha iyi bir seçimdir, çünkü cilt üzerinde oluşan lipid tabaka, yağda çözünen aktif bileşenleri tercih eder (Costa ve Santos, 2017). Cilt nemlendirme fonksiyonlu temel krem formülasyonları tipik olarak; yumuşatıcılar (% 10-40), nemlendiriciler (% 1-5), koyulaştırıcılar (% 0,1-0,5), emülgatörler (% 1-6),

stabilizatörler (% 0,01-0,2), koruyucular (% 0,01-0,5) ve nötrleştiriciler (% 0,01-0,05) gibi basit bileşenlerden oluşur (Scalia ve Mezzena, 2009).

4.7. Biberiye Uçucu Yağı

Biberiye, *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae familyasına aittir ve dünya çapında ticarileştirilmiş bir bitkidir. Uçucu yağı ve ekstresi gıda koruma ve çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılır (Olmedo ve ark., 2013; Gao ve ark., 2014).

Biberiye uçucu yağının başlıca bileşenleri, % 20 α -pinen, %20 1,8-sineol, % 18 kafur, % 7 kamfen, % 6 β -pinen, % 5 borneol, % 5 mirsen, % 3 bornil asetat, % 2 terpineol, linalol, limonen, terpineol ve karyofilen'dir (Simon ve ark., 1984; Uçar ve ark., 2015). Biberiye uçucu yağının, antibakteriyel, antifungal, insektisit, antioksidan ve hepatoprotektif etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ojeda-Sana ve ark., 2013; Soylu ve ark., 2010; Zoubiri ve Baaliouamer, 2011; Ojeda-Sana ve ark., 2013; Aminand Hamza, 2005).



Resim 1. Biberiye, *Rosmarinus officinalis* (<https://www.rafinera.com/blog>, Erişim tarihi: 9 Haziran 2020).

4.8. Tarçın Uçucu Yağı

Tarçın, *Cinnamomum* cinsi, Lauraceae familyasına aittir ve 300'den fazla yaprak dökmeven aromatik ağaç ve çalı türü içerir (Ranasinghe ve ark., 2012). Tarçının kabuğu, yaprakları, çiçekleri ve meyveleri kullanılarak elde edilen uçucu yağı, kozmetik veya gıda ürünlerinde kullanılır (Nabavi ve ark., 2015).

Tarçın (*Cinnamomum Cassia*) kabuk uçucu yağının temel aktif bileşeni bir fenilpropanoid olan sinnamaldehit (3-fenil-2-propenal fenol; C₉H₈O) dir (Önenç ve Açıkgöz, 2011).

Tarçın uçucu yağlarının, ekstraktlarının ve bileşenlerinin, patojenlere, gıda ve kozmetiklerin bozulmasından sorumlu gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Yap ve ark., 2013; Al-Mariri ve Safi, 2014; Bardajı ve ark., 2016; Saleem ve ark., 2015).

Tarçın uçucu yağının çok iyi bir antioksidan aktivite gösterdiği de bildirilmiştir (Murcia ve ark., 2004; Hsu ve ark., 2012).



Resim 2. Tarçın kabuğu, *Cinnamomum cassia*

(www.indiamart.com/proddetail/cinnamomum-cassia, Erişim tarihi: 9 Haziran 2020).

4.9. Defne Uçucu Yağı

Defne, *Laurus nobilis* L., Lauraceae familyasına ait Akdeniz bölgesine özgü bir bitkidir ve yaygın bir baharat olarak kullanılır. Defne bitkisi, uçucu yağında bulunan biyoaktif bileşikler bakımından zengin bir bitki olarak kabul edilmiştir (Patrakar ve ark., 2012).

Defne bitkisi, önceki çalışmalarla kanıtlanan geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Gıda koruma, böcek ilacı hazırlama, antioksidan olarak, kanser, epilepsi, gastrointestinal sorunların ve romatizmal durumların tedavisinde kullanıldığına dair

bilimsel raporlar vardır. (Bennett et al., 2013; Muñiz-Márquez et al., 2013; Panza et al., 2011; Ramos et al., 2012; Saabet al., 2012; Xu et al., 2014).

Et gibi gıdalarda bozulmalara karşı defne uçucu yağının antibakteriyel özelliğinin büyük ölçüde etkisi olduğu düşünülen bir çalışmada, oksijenli monoterpen bileşikleri ve fenolik bileşenler bakımından zengin defne uçucu yağının güçlü bir in vitro antibakteriyel ve antioksidan özellikleri olduğu bildirilmiştir (Ramos ve ark., 2012).



Resim 3. Defne yaprağı, *Laurus nobilis* (Marques ve ark.,2016).

4.10. Çörek Otu Yağı

Çörek otu, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), yeşil-mavi renkli çiçekleri ve siyah üç köşeli tohumları ile tek yıllık bir çiçekli bitkidir. Güney ve Güneybatı Asya'ya kadar dünyanın farklı yerlerinde yetiştirilmekte ve kullanılmaktadır. Tohumları, bitkinin aktif bileşenlerinin kaynağıdır (Gholamnezhad ve ark., 2016; El Tahir ve Bakeet, 2006).

Çörek otu, zengin tarihi bir geçmişi olan bir bitkisel ilaç olarak, geleneksel olarak çeşitli hastalıklar, kısırlık, ateş, öksürük, bronşit, astım, kronik baş ağrısı, migren, baş dönmesi, göğüs tıkanıklığı, felç, hemiparezi, sırt ağrısı, dismenore, obezite, diyabet, romatizma, hipertansiyon, hazımsızlık, ishal gibi gastrointestinal bozukluklar ve dizanteri dahil olmak üzere birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadır (Abdul ve Yassen, 2017; Durmuşkahya ve Öztürk, 2013; Nasir ve ark., 2014).

Deneysel çalışmalarda, çörek otu yağının ve ekstraktlarının çok çeşitli mikroplara, özellikle de birçok antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kamil, 2013; Morsi, 2000).

Çörek otunun antimikrobiyal özelliklerinin timohidrokinon ve melanin gibi aktif bileşiklerinden kaynaklandığı bulunmuştur (Al Yahya, 1986).

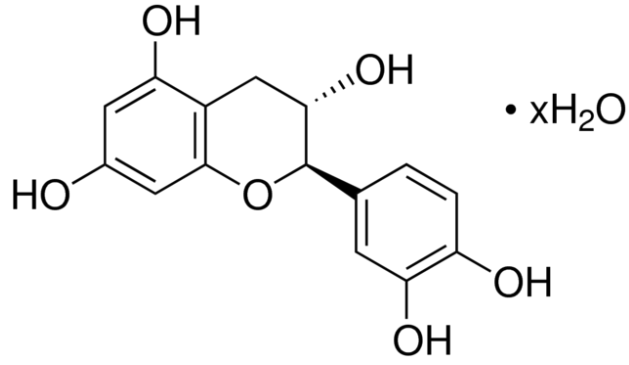


Resim 4. Çörek otu, *Nigella sativa* (Kooti ve ark., 2016).

4.11. Kateşin

Kateşinler, çeşitli meyveler, sebzeler ve bitki bazlı içeceklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan flavonoid sınıfına ait polifenolik bileşiklerdir. Üzüm, elma, armut, kiraz gibi meyveler ve yeşil çay bazı önemli kateşin kaynaklarıdır (Kondo ve ark., 2002).

Kateşin ve B tipi prosiyanidin, yeşil yapraklı veya kök sebzelerde bulunmasının yanı sıra, yeşil fasulye gibi baklagillerde de tespit edilmiştir (Gadkari ve Balaraman, 2015). Yeşil çay kateşinlerinin, hayvan çalışmalarında; deri, akciğer, yemek borusu, mide, karaciğer, ince bağırsak, kolon, mesane, prostat ve meme bezlerindeki kanser gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur (Chung ve ark., 2000). Kateşin, antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, immünomodülatör ve antitümör aktiviteleri de dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir (Friedman, 2007).



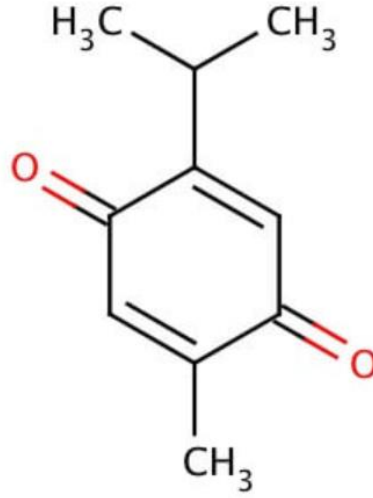
Şekil 1. Kateşin kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/22110?, Erişim tarihi: 9 Haziran 2020).

4.12. Timokinon

Nigella sativa (*N. sativa*) *Ranunculaceae* botanik ailesine aittir ve *N. sativa* tohumu yağından; timokinon, timohidrokinon, ditimokinon, timol, karvakrol, nigellimin-N-oksit, nigellisin, nigellidin ve alfa-hedrin dahil olmak üzere çok sayıda aktif bileşen izole edilmiştir (Aljabre ve ark., 2015).

Timokinon, siyah çörek otu tohumlarının uçucu yağında bulunan, antioksidan aktivitelere sahip en önemli biyoaktif bileşendir (Hajhashemi ve ark., 2004).

Nigella sativa, timokinon, timohidrokinon, ditimokinon, timol, karvakrol, nigellisin, nigellimin-N-oksit, nigellidin ve alfa-hedrin gibi aktif bileşen içeriği ile antibakteriyel, antiparaziter ve anti-inflamatuar gibi çeşitli farmakolojik özellikler göstermektedir. (Randhawa ve Al-Ghamdi, 2002).



Şekil 2. Timokinon kimyasal yapısı (www.scbt.com/p/thymoquinone-490-91-5, Erişim tarihi: 9 Haziran 2020).

4.13. Kitosan

Kitosan, doğada yaygın olarak bulunan bir amino polisakkarit olan kitinin deasetilleştirilmesiyle elde edilir. Kitin; yengeç, ıstakoz, karides gibi kabuklu hayvanlarda, böceklerin iskeletinde, planktonlarda ve mantarların hücre duvarlarında doğal bir polimer olarak bulunmaktadır (Struszczyk ve ark., 2001; İmamoğlu, 2011).

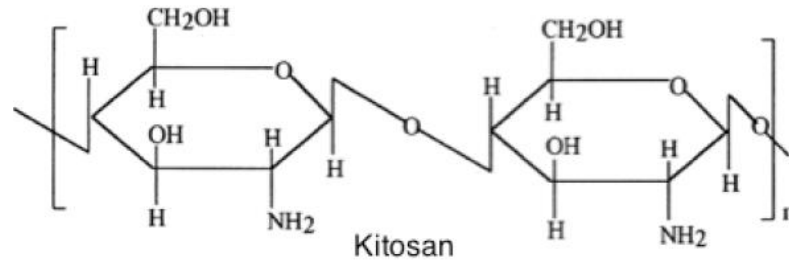
Kitosan, deasetilasyon derecesini farklı oranlarda belirleyen glukozamin ve N-asetilglukozaminden oluşan bir polimerdir. Asidik koşullarda amino grubunun protonlanması ile katyonik bir özelliğe sahiptir ve toksik olmayan, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, antimikrobiyal özellikler gösterir (Cota-Arriola ve ark., 2013).

Kitosanın molekül ağırlığı 50-2000 kiloDalton (kDa) arasında değişmektedir. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlığına göre sınıflandırılır. (Gökçe, 2008).

Kitosan, çekirdek maddeleri kaplamak için bir kapsül malzemesi olarak kullanılabilir çünkü katyonik polimer olan bu doğal polimerler (aljinat, pektin, ksantan, karagenan, selüloz, vb.), negatif yüklü olan sentetik polimerler olan metal iyonları ve tripolifosfat (TPP) gibi maddelerle çapraz bağlanabilir (Luo ve Wang, 2014; Woranuch ve Yoksan, 2013).

Kitosan; asetik asit, laktik asit, formik asit, tartarik asit, malonik asit ve sitrik asit gibi organik asitlerin olduğu ortamlarda çözünerek polikatyonik bir polimer haline gelmektedir (Demir ve Seventekin, 2009).

Kitosanın uygulama alanları, gıda, kozmetik, eczacılık (kontrollü ilaç salınımı), biyoteknoloji, medikal (yara bandı), atık su arıtımı, tekstil ve ziraat şeklinde sıralanabilir (İmamoğlu, 2011).



Şekil 3. Kitosan kimyasal yapısı (Olcay, 2015).

4.14. Mikroenkapsülasyon Teknolojisi

Koazervasyon tekniği ile elde edilen jelatin mikrokapsülleri üzerine 1930'lu yıllarda yapılan bir çalışma mikroenkapsülasyon teknolojisinin başlangıcı olarak bilinir. Bu yöntemde, mikro/nanopartiküller faz ayrımı, sıcaklık, çözücü olmayan çözelti, tuz veya geçimli olmayan polimer eklenmesi ve polimer-polimer etkileşimi sonucu oluşurlar. 1950'li yıllarda endüstrideki uygulaması Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde başlamıştır. Bugün mikroenkapsülasyon teknolojisi eczacılık (% 68), gıda (% 13), kozmetik (% 8), tekstil (% 5), biyomedikal (% 3), ziraat (% 2) ve elektronik (% 1) endüstrilerinde uygulanmaktadır (Özdemir, 2019).

Mikroenkapsülasyon tekniği, seçilen çekirdek materyalin kullanım amacına uygun olarak etkinliğini arttırmayı amaçlar (Paulo ve Santos, 2017).

Mikroenkapsüle edilen ürün ve mikrokapsül özellikleri birçok faktörden etkilenebilir. Bu faktörlere bağlı olarak mikrokapsülün partikül büyüklüğü dağılımı, morfolojisi, ürün verimi, partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği ve çekirdek materyalin salınım hızı etkilenebilir. Mikrokapsüllerin yapısı; tek çekirdekli kaplama, çok

çekirdekli kaplama ve çekirdek materyalinin küçük damlalar halinde kaplama materyalinin içerisine dağılması ile oluşan matriks tip kaplama olarak sınıflandırılabilir. Kaplama materyalleri enkapsülasyon etkinliği ve mikrokapsül stabilitesinde önemli rol oynadığından kaplama materyalini yüksek etkinlikte seçmek oldukça önemlidir. Ayrıca mikroenkapsülasyon işleminde kullanılan kaplama materyalinin biyouyumlu, biyo çözümlü, toksik olmayan ve düşük maliyetli olması gerekir (Ye ve ark., 2018).

Mikrokapsüllerin partikül büyüklüğü 1µm ile nanometre arasında değişen boyutlarda olabilmekte ve ortalama partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden polidispersite indeksi (PdI) değeri zetasizer partikül ölçüm cihazında ölçülmektedir (Jayanudin ve ark., 2016).

Mikrokapsüller tablet, jelatin kapsül, süspansiyon ya da jel şeklinde kullanılabilir. Mikrokapsül çeperi olarak kullanılacak polimer örnekleri doğal (agar, albumin, arap zamkı, dekstran, glüten, jelatin, kazein, kitosan, kollajen, nişasta, mum, pektin vb.) ve sentetik (akrilik polimerler, poli üretanlar, polistiren, selüloz ve selüloz türevler, silikon vb.) olabilir. Mikrokapsüllerin karakterizasyonu yapılırken çeper kalınlığı, geçirgenlik, partikül büyüklüğü ve dağılımı, salım özellikleri, zeta potansiyeli, akış özellikleri ve etkin madde içeriği kontrol edilmelidir. Zeta potansiyeli süspansiyonlarda stabilite için önemlidir ve partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyel ölçümü, dağılım mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılım kontrolünün anahtarıdır. Zeta potansiyeli ölçümü zetasizer cihazı ile ölçülmektedir. Zetasizer cihazı belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır (Cheng ve ark., 1991; Benita, 2005; Gürsoy, 2002).

4.14.1. İyonotropik jelasyon teknolojisi

Kitosan ile nanoenkapsülasyon işleminde iyonotropik jelasyon tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır (Rajabi ve ark., 2019). İyonotropik jelleşme yönteminde, organik çözücü içerisinde hazırlanmış polimer çözeltisine farklı konsantrasyonlardaki

tripolifosfat (TPP) eklenir ve oluşan mikro/nanopartiküller santrifügasyon yöntemiyle ayrılır.

Bodmeier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kitosan içerisine damlatma yöntemiyle sodyum tripolifosfat (STPP) eklenmesinin kitosan mikrokapsüllerinin verimliliğini arttırdığı gösterilmiştir. Bu yöntem günümüzde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir (Bodmeier ve ark., 1989).

Kitosanın STPP ile iyonik jelleşmesi yöntemiyle oluşturulan mikrokapsüllerin protein, gen, ilaç, vitamin ve farklı fenolik bileşikler kapsülleme kapasitesinin de yüksek olduğu gösterilmiştir (Hosseini ve ark., 2013).

4.15. Antioksidanların Genel Özellikleri

Organizma içinde bulunan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı antioksidatif korunma sistemi mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken bir kısmı ise serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltır. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonunu engelleyen, durduran, yavaşlatan bileşiklerdir (Devasagayam, 2004).

Fitokimyasallar ve uçucu yağların antioksidatif özellikleri, içerdikleri bileşenlerin yapısında bulunan flavonoid sınıfına ait polifenolik bileşiklerden ve fenolik hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu yağların antioksidatif etkisi içerdikleri etken maddelerin miktarına, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün tipine, ekstraksiyon yöntemine göre değişkenlik göstermektedir. Farag ve ark.'nın, uçucu yağların kimyasal kompozisyonu ile antioksidatif aktiviteleri arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, timolün yüksek antioksidatif gücünün, yapısında yer alan fenolik grupların oksidasyonun ilk basamağında açığa çıkan peroksit radikallerinin oluşumunu azaltmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir (Bayaz, 2014; Farag ve ark., 1989). Antioksidanlar serbest radikalleri doğrudan nötralize edebilirler, peroksid konsantrasyonunu azaltıp okside olmuş membranı onarabilirler, reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimini azaltabilirler. En çok bilinen antioksidan maddeler polifenoller, flavonoidler, vitamin E (tokoferoller ve tokotrienoller), vitamin C (askorbik asit),

karotenoidler, glutatyon, bakır ve selenyum vb. gibi elementlerdir (Yapar ve Tanrıverdi, 2016).

Antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla etkisini göstermektedir (Aydın, 2012). Radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu), hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitesinin artırılması, antioksidan etki mekanizmalarını oluşturur (Taşkın, 2011).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET) ve hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT) olarak iki sınıfta toplanabilir. ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgenğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır (Görünmezoğlu, 2008). Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü, ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü, Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi, DPPH kullanarak “radikal süpürücü aktivite” ölçüm yöntemi, CUPRAC (bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemleri ET esaslı analiz yöntemlerindedir (Aydın, 2012).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Uçucu yağlar ve fitokimyasallar

Laurus nobilis L. (Defne) (NU-KA Defne Essencia)

Rosmarinus officinalis L. (Biberiye) (Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi)

Cinnamomum cassia (Tarçın) (Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi)

Nigella sativa L. (Çörek otu) (Fitomer- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi)

Kateşin (Sigma 22110)

Timokinon (Santa Cruz sc-215986)

5.1.2. Mikroorganizmalar

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Escherichia coli ATCC 8739

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

5.1.3. Kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri

Mueller Hinton Agar (Oxoid CM 337 B.0500)

Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (Oxoid 90922)

Sabouraud Dekstroz Agar (Oxoid OX.CM 041 B.0500)

Potato Dekstroz Agar (Oxoid CM 139 B.0500)

Tryptic Soy Agar (Oxoid OX.CM 131 B.0500)

Tryptic Soy Broth (Oxoid OX.CM 132 B.0500)

L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri (Biosera LM-R1640/500)

Morfolino Propan Sülfonik Asit (Fisher Scientific BP308-500)

Etil alkol (Jt Baker 8025.2500)

Dimetil sülfoksit (Fisher Scientific BP231-100)

Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500)

MMW Kitosan (Sigma 448877)

Asetik Asit (Sigma 695092)

Alüminyum Folyo

Cam Deney Tüpleri

Steril Plastik Petri Kapları (Firatmed FR.026)

Polipropilen 96 Kuyucuklu Düz Tabanlı Steril Mikroplaka (VWR 734-2327)

Polipropilen 96 Kuyucuklu U Tabanlı Steril Mikroplaka (VWR 734-2328)

Sodyum Tripolifosfat (Sigma 247367)

Steril Pamuklu Eküvyon Çubuk (Lp Italiana L112298)

Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Rainin 17001116)

Plastik Pastör pipeti (3ml'lik) (Isolab 17001118)

Enjektör (2.5, 5, 10 ml) (Set Inject 103023043)

Steril FalkonTüpü (Orlab L111547)

0,2 µm'lik Filtre (Sartorius 16534-K)

Steril Antibiyogram Diski (Bioanalyse Blank Disk)

2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma T1253)

Iron(III) chloride hexahydrate (Sigma 236489)

N- Hexane (Merck 1.04367.2500)

Neocuproine (Sigma N1501)

Ammonium acetate (Fisher Scientific 10102946001)

5.1.4. Çözeltiler

% 0,85 NaCl

%3 Tween 80

HCl

TPTZ

FeCl₃.6H₂O

Asetat tamponu

DPPH

Neocuprain

Cu(II)_x2H₂O

NH₄Ac

5.1.5. Çözücüler

Dimetil sülfoksit

Etil alkol % 96

5.1.6. McFarland standart bulanıklık tüpleri

Standart bulanıklık tüpleri 0,05 mL % 1,175 BaCl₂, 9,95 mL % 1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmış (Rayaman, 2010) ve ayrıca ticari olarak temin edilen McFarland 0,5 (1x10⁸ kob/mL) standart tüpü esas alınmıştır.

5.1.7. Kullanılan cihazlar

Hassas terazi (Precisa)

Etüv (Binder-Nüve)

Pastör Fırını (Binder)

Otoklav (Hirayama)

Mikroskop (Olympus)

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

pH metre (WTW)

Manyetik Karıştırıcı (IKA)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Uğur)

Su banyosu (Nüve)

Otoklav poşeti (Isolab)

McFarland bulanıklık tüpleri

Vorteks (Benchmark)

Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek Epoch 2)

Soğutmalı Santrifüj (Beckman-Coulter)

Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin Sonoplus)

UV Kabin (Biosafety Cabinet Class II A2)

5.1.8. Antibiyotik ve antifungaller

Meropenem (Acros 462810010)

Flukonazol (World Medicine)

Amfoterisin B (Fisher Scientific BP928-250)

Meropenem Disk (10 mcg) (MEM-10)

Flukanozol Disk (25 mcg) (FLU)

5.1.9. Koruyucular

1,2-Octanediol % 98 (Kaprilil glikol) (Sigma 213705)

Fenoksietanol (İlmor)

5.1.10. Krem bazı

Emulfeel SGP CHI (Barentz)

5.2. Yöntem

5.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri

Fitokimyasal bileşiklerin, uçucu yağların ve kitosanın antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemi ve sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

5.2.1.1. Disk difüzyon yöntemi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak mikroorganizmaların 18-24 saatlik agar plağındaki tek düşmüş kolonilerinden steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde McFarland 0,5 [$1-2 \times 10^8$ kob/mL (bakteri) / $1-5 \times 10^6$ kob/mL (maya)] bulanıklığına eşdeğer inokulum süspansiyonları hazırlanmıştır. İnokulum süspansiyonu bakteriler için Mueller Hinton Agar (MHA), mayalar için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) yüzeyine inoküle edilmiştir. Fitokimyasal ve uçucu yağ örneklerinin emdirilmiş olduğu diskler (disk çapı 6 mm) steril bir pens yardımı ile agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha sonra bakteri içeren besiyerleri 16-18 saat süreyle 35 ± 2 °C'de, maya içeren besiyerleri ise 48 saat süreyle 35 ± 2 °C'de inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı bir kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Yöntemin pozitif kontrolü için antibakteriyel etkinlik testinde meropenem (10 µg/disk), antifungal etkinlik testinde ise flukonazol (25 µg/disk) diskleri kullanılmıştır. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (CLSI, 2012; NCCLS, 2004; Naeini ve ark, 2009).

5.2.1.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Çalışmamızda kullanılan fitokimyasallar, uçucu yağlar ve kitosanın minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır.

5.2.1.2.1. Bakteriler için sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın 18-24 saatlik Mueller Hinton Agar (MHA) plağındaki tek düşmüş kolonilerden steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde McFarland 0,5 bulanıklığı (1×10^8 kob/mL) standardına eşdeğer bir inokülüm süspansiyonu hazırlanmıştır. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikropiğin her kuyucuğuna 100 µL % 0,5 oranında Tween 80 ilaveli Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) konulmuştur. Ardından test edilecek olan örneklerden ilk kuyucuğa 100 µL konulup fitokimyasalların, uçucu yağların ve kitosanın ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır. Daha sonra 0,5 McFarland bulanıklığına eş değerde hazırlanan bakteri süspansiyonu 1:10 oranında seyreltilerek 1×10^7 kob/mL inokülüm yoğunluğu elde edilmiştir. Hazırlanan inokülüm, içerisinde test edilecek maddelerin bulunduğu mikrodilüsyon plakalarına 5 µL inoküle edilerek final konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olan inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Her mikropiakta pozitif kontrol olarak meropenem (64-0,031 µg/mL) antibiyotiği, negatif kontrol olarak KAMHB besiyeri (sterilite kontrol) ve bakteri süspansiyonu (üreme kontrol) kuyucukları bulundurulmuştur. Mikrodilüsyon plakaları 16-20 saat boyunca $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük madde / ilaç konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak değerlendirilmiştir (CLSI, 2012).

5.2.1.2.2. Mayalar için sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 kılavuzunda önerilen mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. SDA yüzeyinde 24 saatte üreyen maya kolonilerinden FTS içerisinde McFarland 0,5 bulanıklığı ($1-5 \times 10^6$ kob/mL) standardına eşdeğer bir inokülüm süspansiyonu hazırlanmıştır. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon piğinin her kuyucuğuna pH 7 olacak şekilde 0,165 molar Morfolino Propan Sülfonik Asit (MOPS) ile tamponlanmış L-glutamin eklenmiş sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyerinden 100 µL konulduktan sonra üstüne test edilecek olan örneklerden ilk kuyucuğa 100 µL konulup fitokimyasalların, uçucu

yağların ve kitosanın ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır. 0,5 McFarland bulanıklığına eş değerde hazırlanmış olan maya süspansiyonu $0,5-2,5 \times 10^3$ kob/mL inokülüm yoğunluğuna ayarlandıktan sonra kuyucuklara 100 µL aktarılmıştır. Her mikropakta pozitif kontrol olarak flukonazol (64- 0,125 µg/mL), sterilite kontrolü olarak RPMI-1640 besiyeri ve üreme kontrolü olarak maya süspansiyonu kuyucukları bulundurulmuştur. Mikrodilüsyon plakları 35 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üremede belirgin azalmanın görüldüğü, flukonazol için ise kontrol kuyucuğuna göre en az %50 daha berrak olan ilk kuyucuğun değeri minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilmiştir (Ergin ve Arıkan, 2002; CLSI, 2008; Omran ve ark., 2018).

5.2.1.2.3. Küfler için sıvı mikrodilüsyon yöntemi

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M-38-A kılavuzunda önerilen mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır Patates dekstroza agar (PDA)'da 7 günlük küf kolonileri üzerine 5 mL % 0,85'lik NaCl ve 50 µL Tween 80 karışımı dökülmüş ve koloniler üzerinde hafif çalkalama hareketleri yapılarak konidyumlar toplanmıştır. İnokülüm süspansiyonunun final konsantrasyonu 0,09 - 0,13 arasında değişen bir optik yoğunluğa (OD) göre spektrofotometrede (600 nm) $0,4-5 \times 10^4$ kob/mL'ye ayarlanmıştır. pH 7 olacak şekilde 0,165 molar Morfolino Propan Sülfonik Asit (MOPS) ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyerinden 100 µL konulduktan sonra üstüne test edilecek olan örneklerden ilk kuyucuğa 100 µL konulup fitokimyasalların, uçucu yağların ve kitosanın ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır Daha sonra kuyucuklara, hazırlanmış küf spor süspansiyonundan 100 µL aktarılmıştır. Her mikropakta pozitif kontrol olarak amfoterisin B (16 - 0,031 µg/µL), sterilite kontrolü olarak RPMI-1640 besiyeri ve üreme kontrolü olarak küf süspansiyonu kuyucukları bulundurulmuştur. Mikrodilüsyon plakları 7 gün boyunca 28 °C' de inkübe edildikten sonra üremenin tam inhibe olduğu en düşük madde / ilaç konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak değerlendirilmiştir (NCCLS, 2002; Tokarzewski ve ark., 2012; Wang ve ark., 2018).

5.2.2. Sinerji testi

Sinerji çalışması 96 kuyucuklu mikroplaklar kullanılarak checkerboard (dama tahtası) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir fitokimyasal ve uçucu yağların ayrı ayrı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri saptandıktan sonra bu değerler göz önüne alınarak kombinasyonlarda kullanılacak dozlar MİK değerlerinin subMİK konsantrasyonları olarak ayarlanmıştır. Pozitif kontrol olarak bakteriler için meropenem antibiyotiği, mantarlar için flukonazol ve amfoterisin B antifungal ilaçlar kullanılmıştır. Bakteriler ve mayalar 24-48 saat $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de küfler ise 7 gün 28°C 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra madde kombinasyonlarının sinerjik etkileri mikroplak okuyucuda (BİOTEK Epoch 2) 535-625 nm aralığında tespit edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen MİK değerlerine göre, kitosan ile enkapsülasyon işlemi için en etkili kombinasyonlar seçilmiştir. Fitokimyasal ve uçucu yağ kombinasyonlarından elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) elde edilmiştir. Daha sonra kombinasyonda yer alan etken maddelerin FİK değerleri toplanarak FİK indeksi (FİKİ) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre etken maddeler arasındaki ilişkiler aşağıda yer alan FİK indeksine göre belirlenmiştir. (Bonapace ve ark., 2000; Nikkhah ve ark., 2017).

$FİKA = B'nin\ varlığında\ A'nın\ MİK\ değeri / Tek\ başına\ A'nın\ MİK\ değeri$

$FİKB = A'nın\ varlığında\ B'nin\ MİK\ değeri / Tek\ başına\ B'nin\ MİK\ değeri$

$\Sigma\ FİK\ indeksi = FİKA + FİKB$

$\Sigma\ FİK\ indeksi \leq 0,5$ sinerjik etki

$\Sigma\ FİK > 0,5$ ve ≤ 1 aditif etki

$\Sigma\ FİK > 1 - < 4$ indiferaan etki

$\Sigma\ FİK > 4$ ise antagonist etkileşim olarak değerlendirilmiştir.



Resim 5. BİOTEK Epoch 2 mikrolaka okuyucu

5.2.3. Kitosan ile enkapsülasyon işlemi

Fitokimyasal bileşikler ve uçucu yağların kitosan ile iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak yapılan mikro/nanoenkapsülasyon işlemi Nanomik Biyoteknoloji firmasıyla iş birliği içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kitosan, % 1'lik asetik asit içinde tamamen çözüldükten sonra pH'sı 3,5-5 aralığında bir değere ayarlanarak protonasyonu sağlanmıştır.

Negatif yüklü sodyum tripolifosfat (STPP) ile fitokimyasal bileşikler ve uçucu yağlar karıştırılmış ve sulu ortamda tamamen çözülmüş olan pozitif yüklü kitosanın çapraz bağlanmalar yapması sağlanmıştır. Çapraz bağlar ile bağlanan TPP ve kitosana Tween 80 eklenerek manyetik karıştırıcıda (800 rpm) belirli bir süre karıştırılmış ve mikroenkapsülasyon işlemi tamamlanmıştır (Sudardshan ve ark., 1992). Kaplama materyali olarak 25 mL kitosan (% 1'lik), 22,5 mL STPP (% 0,25'lik), 0,25 mL Tween 80 üzerine 2,5 mL biberiye-tarçın (uçucu yağ) ve 2,5 mL timokinon-kateşin (fitokimyasal) kombinasyonları eklendikten sonra ultrasonik homojenizatör ile 2 dk

boyunca parçacıklar daha küçük boyutlara ayrılmıştır (Keawchaoon ve Yoksan, 2011). Kitosan ile mikroenkapsülasyonun salınım değerlendirme testleri Nanomik Biyoteknoloji Şirketi tarafından yapılmıştır.

Fitokimyasal ve uçucu yağların kitosan ile mikroenkapsülasyon işlemleri sonucunda mikrokapsüllerin MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Çalışmamızda, doğal bir biyopolimer olan kitinin % 75-85 oranında deasetilasyonundan elde edilen orta moleküler ağırlıklı kitosan (Sigma) kullanılmıştır.

5.2.3.1. Mikroenkapsülasyon veriminin tayini

Mikroenkapsülasyon veriminin tayini Khalili ve arkadaşlarının yöntemi geliştirilerek uygulanmıştır (Khalili ve ark., 2015). Bunun için enkapsülasyon işleminden hemen sonra enkapsülasyon çözeltisi 10 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve UV spektrofotometrede absorbansı ölçülmüştür. Gözlemlenen optik dansite (OD) verisi, enkapsülasyon prosedürüne göre kitosansız hazırlanan bir referans yağ emülsiyonunun OD değeriyle karşılaştırılmıştır. Enkapsülasyon verimi % = [(OD (kontrol)-OD (örnek)] / OD (kontrol)] x 100 formülüne göre hesaplanmıştır (Khalili ve ark., 2015).

5.2.3.2. Etken madde salım testi

Salım testi Zhavah ve arkadaşlarının yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Zhavah ve ark., 2015). Fitokimyasal ve uçucu yağların UV spektrumu alınmış, hangi absorbans değerinde pik verdiği kontrol edilmiş ve kalibrasyon eğrisi çıkartılmıştır. Daha sonra enkapsüle edilmiş materyalden belli bir miktar alınıp salım yapacağı ortam taklit edilmiştir. Bunun içine enkapsüle edilmiş materyalden 1 mL alınmış ve üstüne 1 mL etanol çözeltisi eklenmiştir. Son çözelti 25°C'de 24 saat su banyosunda bekletildikten sonra 10 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilip süpernatanttan 1 mL çekilmiş ve tekrar aynı miktarda etanol eklenmiştir (Yağlar etanolde çözünebildiği için etanol tercih edilmiştir). Fitokimyasal ve uçucu yağların UV absorbansına bakılarak oluşturulan

kalibrasyon eğrisinden süpernatantın konsantrasyon tayini yapılmıştır. Bu işlem belirli zaman aralıklarıyla tekrarlanmıştır (Zhaveh ve ark., 2015).

5.2.3.3. Mikrokapsül karakterizasyon verilerinin incelenmesi

Mikrokapsüllerin boyut ve zeta potansiyel ölçüm analizleri Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında Malvern Zetasizer 90 Zetax cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsülleri, distile su ile 1/100 oranında seyreltilmiş, 10 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınarak Malvern Zetasizer cihazında ölçülmüştür.

5.2.4. Challenge test

5.2.4.1. Amerikan farmakopesi (USP)

Amerikan farmakopesi testine göre koruyucu etkinlik testinin aşamaları uygulanmıştır. Testte *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC 16404 standart suşları kullanılmıştır. Mikroorganizma suşlarından taze kültürler hazırlanmıştır. Bakteriler Tryptic Soy Agar (TSA)'da $32,5 \pm 2,5$ °C'de 18-24 saat, maya SDA'da $22,5 \pm 2,5$ °C'de 44-52 saat ve küfler ise PDA'da $22,5 \pm 2,5$ °C'de 5-7 günde üretilmiştir. Bakteri ve maya süspansiyonu % 0,85 NaCl içeren steril FTS, küf süspansiyonu ise % 0,05 polisorbitat 80 içeren steril FTS ile hazırlanmıştır. Her mikroorganizma için inokülasyon miktarı % 1'i aşmamış ve her ürün 10^5 - 10^6 kob/ mL-gr mikroorganizma ve küf sporu ile inoküle edilmiştir. Ürün 5 farklı gruba ayrılmıştır. 5 adet steril tüpe koruyucu etkinliği belirlenecek örnekten (krem bazı) 10 gr konulmuştur. Her bir tüpe belirtilen standart test mikroorganizmalarından 10^5 - 10^6 kob/mL olacak şekilde mikroorganizma inoküle edilmiştir. Mikroorganizma içeren örneklerden 1 mL-gr alınarak 9 mL nötralizan içeren besiyerine konulmuştur. Nötralizanlı besiyeri içeriği; TSB + % 1,5'lik Tween 80 olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra 0,1 mL alınan örnekler katı besiyerlerinin yüzeyine ekilmiştir. Bakteriler TSA besiyerinde 32 - 35 °C'de 18-24 saat, maya SDA

besiyerinde 22-25 °C de 2-3 gün ve küf PDA besiyerinde 22-25 °C de 6-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. 0., 14. ve 28. günlerde ürünlerden ekimler yapılmıştır. Ekim sonrası petride üreyen koloniler sayılmıştır. Değerlendirilirken; bakterilerde 14. günkü sayımda başlangıç sayımından en az 2 logaritmalık azalma olmalı, 28. günkü sayımda ise 14. güne göre artış olmamalıdır. Maya ve küfte ise 14. ve 28. günkü sayımlarda başlangıç sayımına göre artış olmamalıdır. Bu değerler kozmetik ürün içindeki koruyucunun aktif olduğunu gösterir (US,32-NF27, 2009).

5.2.5. Antioksidatif etkinlik testi

5.2.5.1. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

Ferrik iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli deneyi (FRAP), Benzie ve Strain (1996) metoduna göre yapılmıştır (Benzie ve Strain, 1996). FRAP ayırıcı 10 µL etken madde, 190 µL FRAP ve kör için ise 10 µL distile su üzerine 190 µL FRAP konularak hazırlanmış ve köre karşı absorbans artışı 4. dakikada 593 nm’ de ölçülmüştür. 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 mL TPTZ çözeltisi (10 mM TPTZ’nin 40 mM HCl’deki çözeltisi) ve 2,5 mL 20 mM FeCl₃.6H₂O’nin karıştırılması ile hazırlanmış ve 37 °C de 30 dk bekletilmiştir. Maddelerin 593 nm’deki absorbans değerleri, FeSO₄.7H₂O (62,5-1000 mM) ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine ait değerlerle karşılaştırılmak suretiyle, FRAP değeri (mM/L Fe⁺²), 1 mM Fe (III)’ün Fe (II)’e indirgenmesi olarak ifade edilmiştir.

5.2.5.1.1. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Kalibrasyon grafiğinin elde edilmesi için önce FeSO₄.7H₂O’ın 1000 mM’lık çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 500 mM, 250 mM, 125 mM ve 62,5 mM olan çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltilere FRAP deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 4. dakikada 593 nm’de köre karşı ölçülmüştür. Deney beş kez tekrarlanmış ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla FeSO₄.7H₂O kalibrasyon grafiği çizilmiş ve regresyon denklemi [$y=12,86x-0,006610$ ($R^2=0,9986$)] elde edilmiştir (Şekil 5) (Taşkın T, 2011).

5.2.5.1.2. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler

40 mM HCl çözeltisinin hazırlanması; 820 µL der. HCl (% 37'lik) 250 mL' lik balon jodede distile su ile hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

10 mM TPTZ çözeltisinin hazırlanması; 0,3120 g TPTZ, 100 mL 40 mM HCl'de 50 °C 'deki su banyosunda çözündürülüp hazırlanmıştır.

20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltisi; 1,35 g FeCl₃.6H₂O bir miktar suda çözüldükten sonra 250 mL'lik balon jodede hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) çözeltisi; 3,1 g NaCH₃COO.3H₂O 600 mL distile suda çözüldükten sonra üzerine glasiyel asetik asit eklenip pH 3,6 olarak ayarlanmış ve 1 L'lik balon jodede yine distile suyla hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

5.2.5.2. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemle yapılmıştır (Apak ve ark., 2004). Bir deney tüpü içerisine 60 µL bakır (II) çözeltisi, 60 µL neokuproin (Nc) çözeltisi ve 60 µL amonyum asetat (NH₄Ac) tampon çözeltisinden sırasıyla eklenmiştir. Üzerine farklı konsantrasyonlardaki maddeden 60 µL ve 10 µL de EtOH çözücüsü eklenmiştir. Toplam hacim 250 µL olacak şekilde hazırlanan tüpler ağzı kapalı olarak oda sıcaklığında 60 dk reaksiyonun oluşması için bekletilmiştir. Süresi biten her bir örneğin, içerisinde etken madde yerine EtOH içeren referans çözeltiliye karşı oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin absorbanları karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de ölçülmüştür.

5.2.5.2.1. Troloksun kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Troloksun kalibrasyon eğrisinden doğru denkleminin [$y=3,055x+0,2344$ ($R^2=0,9933$)] elde edilebilmesi için öncelikle troloksun 4,0 mM 10 mL'lik stok çözeltisi etanol ile hazırlanmıştır. Bu çözeltinin etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,025-0,25 mM aralığındaki çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltilere CUPRAC metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 450 nm'de referans çözeltiliye karşı kaydedilmiştir.

5.2.5.2.2. CUPRAC aktivite deneyinde kullanılan çözeltiler

7.5×10^{-3} M Neokuprain çözeltisi; 0,156 g neokuprain bir miktar etanolda çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jodede hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

10^{-2} M Cu (II) $\times 2H_2O$ çözeltisi; 0,171 g Cu (II) $\times 2H_2O$ bir miktar dH₂O çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jodede hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

1 M NH₄Ac çözeltisi; 7,71 g NH₄Ac bir miktar dH₂O çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jodede hacmine tamamlanıp hazırlanmıştır.

5.2.5.3. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi

Farklı etken maddelerin serbest radikal süpürücü aktiviteleri DPPH yöntemi ile değerlendirilmiştir. 240 µL DPPH (0,1 mM) solüsyonu, 10 µL etken maddeler ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra etanole karşı 517 nm de mikropilaya okuyucu kullanılarak okutulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen veriler IC₅₀: mg/mL olarak ifade edilmiştir (Wei ve ark., 2010).

5.2.5.3.1. DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti

0,1 mM DPPH çözeltisi; 0,0099 g DPPH bir miktar metanol ile çözüldükten sonra 250 mL'lik balon jodeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanarak hazırlanmıştır.

6. BULGULAR

6.1. Uçucu Yağlar, Fitokimyasallar ve Kitosanın Antimikrobiyal Etkisi

Tarçın, biberiye ve defne uçucu yağlarının *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel, *C. albicans*'a karşı antifungal etkili oldukları görülmüştür. Çörek otu yağı sadece *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Tarçın ve biberiye uçucu yağının *A. niger*'e karşı antifungal etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 1, 2).

Tablo 1. Uçucu yağların antibakteriyel etkisi

Bakteriler	Çörek otu yağı		Biberiye yağı		Tarçın yağı		Defne yağı	
	(%100)		(%100)		(%100)		(%100)	
	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	15,46	12,50	29,15	0,049	17,13	25,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	40,15	0,1	19,28	0,39	42,35	1,56	-	0,19
<i>E. coli</i> ATCC 8739	-	-	15,69	3,12	40,75	0,78	17,34	0,78

(-: Etkisiz)

Tablo 2. Uçucu yağların antifungal etkisi

Maya ve küf	Çörek otu yağı (%100)		Biberiye yağı (%100)		Tarçın yağı (%100)		Defne yağı (%100)	
	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)	Disk (mm/zon)	MİK (%v/v)
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11,4	0,19	22,29	0,049	62,39	0,0000059	26,23
<i>A. niger</i> ATCC 16404	-	-	-	1,56	-	3,12	-	-

(-: Etkisiz)

Fitokimyasallardan timokinon çalışmada kullanılan tüm bakterilere karşı etkili bulunurken; kateşinin *E. coli* hariç *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca, her iki fitokimyasalında *C. albicans* ve *A. niger*'e karşı antifungal etkili oldukları saptanmıştır (Tablo 3, 4).

Tablo 3. Fitokimyasalların antibakteriyel etkisi

Bakteriler	Timokinon (14 700 µg/mL)		Kateşin (48 000 µg/mL)	
	Disk (mm/zon)	MİK (µg/mL)	Disk (mm/zon)	MİK (µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	4,64	7 350	-	24 000
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	14,31	0,028	-	187,5
<i>E. coli</i> ATCC 8739	-	3 675	-	-

(-: Etkisiz)

Tablo 4. Fitokimyasalların antifungal etkisi

Maya ve küf	Timokinon		Kateşin	
	(14 700 µg/mL)		(48 000 µg/mL)	
	Disk (mm/zon)	MİK (µg/mL)	Disk (mm/zon)	MİK (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7,58	28,71	-	12 000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	-	3 675	-	12 000

(-: Etkisiz)

Kitosan *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkili bulunmuş, *C. albicans* ve *A. niger*'e karşı antifungal etki göstermemiştir (Tablo 5, 6).

Tablo 5. %1'lik kitosanın antibakteriyel etkisi

Bakteriler	Kitosan
	(%1) MİK (%v/v)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0,25

Tablo 6. %1’lik kitosanın antifungal etkisi

Maya ve küf	Kitosan
	(%1)
	MİK
	(%v/v)
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	-
<i>A.niger</i> ATCC 16404	-

(-: Etkisiz)

Kontrol olarak çalıştığımız antibiyotik ve antifungal ilaçların antimikrobiyal etkisi tablo 7 ve tablo 8’ de gösterilmiştir.

Tablo 7. Meropenemin antibakteriyel etkisi ve CLSI duyarlılık sınır değerleri

Bakteriler	Meropenem		CLSI	
	(Potens: % 82,2)			
	Disk (10µg) (mm/zon)	MİK (µg/mL)	Disk (10µg) (mm/zon)	MİK (µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	26,1	0,5	Kalite kontrol aralığı belirlenmemiştir	
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	38,18	0,06	Kalite kontrol aralığı belirlenmemiştir	
<i>E.coli</i> ATCC 8739	38,01	0,03	Kalite kontrol aralığı belirlenmemiştir	

Tablo 8. Flukonazol ve Amfoterisin B'nin antifungal etkisi ve CLSI duyarlılık sınır değerleri

Maya ve küf	Flukonazol (Potens: % 99)		CLSI	
	Disk (25 µg) (mm/zon)	MİK (µg/mL)	Disk (25 µg) (mm/zon)	MİK (µg/mL)
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	18,27	0,25	Kalite kontrol aralığı belirlenmemiştir	
<i>A.niger</i> ATCC 16404	Amfoterisin B (Potens: % 100)		CLSI	
	MİK (µg/mL)		MİK (µg/mL)	
	1,0		0,5 – 4,0	

6.2. Sinerji Testi

6.2.1. *P. aureginosa* için checkerboard sonuçları

Sinerjik etki çalışmasında biberiye, tarçın, defne uçucu yağları ile timokinon ve kateşin kombinasyonları şekil 4'de gösterildiği gibi yapılmıştır. Biberiye-tarçın, tarçın-timokinon, tarçın-defne ve biberiye-defne kombinasyonlarının en etkili kombinasyonlar olduğu saptanmıştır. MİK sonuçlarına göre hesaplanan FİK indeksine göre biberiye-tarçın ve tarçın-timokinon kombinasyonlarının sinerjik, tarçın-defne ve biberiye-defne kombinasyonlarının ise indiferan olduğu belirlenmiştir (Tablo 9).

MADDE KOMBİNASYONU + MİKROORGANİZMA							MADDE KOMBİNASYONU + BESİYERİ					
	1 ↓ (1)	2 ↓ (2)	3 ↓ (3)	4 ↓ (4)	5 ↓ (5)	6 ↓	7 ↓ (1)	8 ↓ (2)	9 ↓ (3)	10 ↓ (4)	11 ↓ (5)	12
A → (1)	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5		1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	
B → (2)	2+1	2+2	2+3	2+4	2+5		2+1	2+2	2+3	2+4	2+5	
C → (3)	3+1	3+2	3+3	3+4	3+5		3+1	3+2	3+3	3+4	3+5	
D → (4)	4+1	4+2	4+3	4+4	4+5		4+1	4+2	4+3	4+4	4+5	
E → (5)	5+1	5+2	5+3	5+4	5+5		5+1	5+2	5+3	5+4	5+5	
F												
G	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK
H	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK

Şekil 4. *P.aeruginosa* için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı

1: biberiye yağı, **2:** tarçın yağı, **3:** defne yağı, **4:** timokinon, **5:** kateşin, **AK:** antibiyotik kontrol, **PK:** pozitif kontrol, **NK:** negatif kontrol (üreme kontrolü), **KÖR:** besiyeri

Tablo 9. *P.aeruginosa* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Biberiye-Tarçın	Tarçın-Timokinon	Tarçın -Defne	Biberiye-Defne
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	3,12 / 12,5			
FİK Biberiye	0,25			
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,012 / 0,049			
FİK Tarçın	0,25			
FİKİ	0,5 (Sinerjik)			
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)		0,003 / 0,049		
FİK Tarçın		0,06		
Timokinon MİK(µg/mL) (kombinasyon / tek)		459,37 / 7 350		
FİK Timokinon		0,062		
FİKİ		0,12 (Sinerjik)		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)			0,049 / 0,049	
FİK Tarçın			1	
Defne MİK(%vv) (kombinasyon / tek)			25,0 / 25,0	
FİK Defne			1	
FİKİ			2 İndiferan(etkisiz)	
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)				12,5 / 12,5
FİK Biberiye				1
Defne MİK(%vv) (kombinasyon / tek)				25,0 / 25,0
FİK Defne				1
FİKİ				2 İndiferan(etkisiz)

6.2.2. *S. aureus* için checkerboard sonuçları

Sinerjik etki çalışmasında çörek otu yağı, biberiye, tarçın, defne uçucu yağları, ve timokinon, kateşin kombinasyonları şekil 5’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Biberiye-tarçın, tarçın-timokinon ve tarçın-defne kombinasyonlarının en etkili kombinasyonlar olduğu saptanmıştır. MİK sonuçlarına göre hesaplanan FİK indeksine göre biberiye-tarçın, tarçın-timokinon ve tarçın-defne kombinasyonlarının sinerjik olduğu belirlenmiştir (Tablo 10).

MADDE KOMBİNASYONU + MİKROORGANİZMA							MADDE KOMBİNASYONU + BESİYERİ					
	1 ↓ (1)	2 ↓ (2)	3 ↓ (3)	4 ↓ (4)	5 ↓ (5)	6 ↓ (6)	7 ↓ (1)	8 ↓ (2)	9 ↓ (3)	10 ↓ (4)	11 ↓ (5)	12 ↓ (6)
A → (1)	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6
B → (2)	2+1	2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+1	2+2	2+3	2+4	2+5	2+6
C → (3)	3+1	3+2	3+3	3+4	3+5	3+6	3+1	3+2	3+3	3+4	3+5	3+6
D → (4)	4+1	4+2	4+3	4+4	4+5	4+6	4+1	4+2	4+3	4+4	4+5	4+6
E → (5)	5+1	5+2	5+3	5+4	5+5	5+6	5+1	5+2	5+3	5+4	5+5	5+6
F → (6)	6+1	6+2	6+3	6+4	6+5	6+6	6+1	6+2	6+3	6+4	6+5	6+6
G	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK
H	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK

Şekil 5. *S.aureus* için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı

1: çörek otu yağı, **2:** biberiye yağı, **3:** tarçın yağı, **4:** defne yağı, **5:** timokinon, **6:** kateşin, **AK:** antibiyotik kontrol, **PK:** pozitif kontrol, **NK:**negatif kontrol(üreme kontrolü), **KÖR:** besiyeri

Tablo 10. *S.aureus* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri

<i>S.aureus</i> ATCC 6538	Biberiye-Tarçın	Tarçın-Timokinon	Tarçın-Defne
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,049 / 0,39		
FİK Biberiye	0,13		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,2 / 1,56		
FİK Tarçın	0,12		
FİKİ	0,26 (Sinerjik)		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)		0,2 / 1,56	
FİK Tarçın		0,13	
Timokinon MİK(µg/mL) (kombinasyon / tek)		0,0035 / 0,028	
FİK Timokinon		0,26	
FİKİ		0,21 (Sinerjik)	
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)			0,2 / 1,56
FİK Tarçın			0,13
Defne MİK(%vv) (kombinasyon / tek)			0,024 / 0,19
FİK Defne			0,13
FİKİ			0,26 (Sinerjik)

6.2.3. *E. coli* için checkerboard sonuçları

Sinerjik etki çalışmasında biberiye, tarçın, defne uçucu yağları ve timokinon fitokimyasal kombinasyonları şekil 6'da gösterildiği gibi yapılmıştır. Biberiye-tarçın, tarçın-timokinon ve tarçın-defne kombinasyonlarının en etkili kombinasyonlar olduğu saptanmıştır. MİK sonuçlarına göre hesaplanan FİK indeksine göre biberiye-tarçın, tarçın-timokinon ve tarçın-defne kombinasyonlarının sinerjik etkili olduğu görülmüştür (Tablo 11).

MADDE KOMBİNASYONU + MİKROORGANİZMA						MADDE KOMBİNASYONU + BESİYERİ						
	1 ↓ (1)	2 ↓ (2)	3 ↓ (3)	4 ↓ (4)	5	6	7 ↓ (1)	8 ↓ (2)	9 ↓ (3)	10 ↓ (4)	11	12
A → (1)	1+1	1+2	1+3	1+4			1+1	1+2	1+3	1+4		NK
B → (2)	2+1	2+2	2+3	2+4			2+1	2+2	2+3	2+4		NK
C → (3)	3+1	3+2	3+3	3+4			3+1	3+2	3+3	3+4		NK
D → (4)	4+1	4+2	4+3	4+4			4+1	4+2	4+3	4+4		NK
E												
F	AK	AK	AK									
H	PK	PK	PK							KÖR	KÖR	KÖR
H	PK	PK	PK							KÖR	KÖR	KÖR

Şekil 6. *E.coli* için için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı

1: biberiye, **2:** tarçın, **3:** defne, **4:** timokinon, **AK:** antibiyotik kör, **PK:** pozitif kontrol, **NK:** negatif kontrol (üreme kontrolü), **KÖR:** besiyeri

Tablo 11. *E.coli* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri

<i>E.coli</i> ATCC 8739	Biberiye-Tarçın	Tarçın-Timokinon	Tarçın -Defne
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,39 / 3,12		
FİK Biberiye	0,125		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,098 / 0,78		
FİK Tarçın	0,126		
FİKİ	0,25 (Sinerjik)		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon/ tek)		0,098 / 0,78	
FİK Tarçın		0,126	
Timokinon MİK(μg/mL) (kombinasyon/ tek)		459,37 / 3 675	
FİK Timokinon		0,125	
FİKİ		0,25 (Sinerjik)	
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon/ tek)			0,098 / 0,78
FİK Tarçın			0,126
Defne MİK(%vv) (kombinasyon/ tek)			0,098 / 0,78
FİK Defne			0,126
FİKİ			0,25 (Sinerjik)

6.2.4. *C. albicans* için checkerboard sonuçları

Sinerjik etki çalışmasında çörek otu yağı, biberiye, tarçın, defne uçucu yağları ve timokinon, kateşin fitokimyasal kombinasyonları şekil 7’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Biberiye-tarçın, biberiye-kateşin, tarçın-defne, kateşin-tarçın ve kateşin-timokinon kombinasyonlarının en etkili kombinasyonlar olduğu saptanmıştır. MİK sonuçlarına göre hesaplanan FİK indeksine biberiye-tarçın, biberiye-kateşin, tarçın-defne, kateşin-tarçın, kateşin-timokinon kombinasyonlarının sinerjik etkili olduğu görülmüştür (Tablo 12, 13).

MADDE KOMBİNASYONU + MİKROORGANİZMA							MADDE KOMBİNASYONU + BESİYERİ					
	1 ↓ (1)	2 ↓ (2)	3 ↓ (3)	4 ↓ (4)	5 ↓ (5)	6 ↓ (6)	7 ↓ (1)	8 ↓ (2)	9 ↓ (3)	10 ↓ (4)	11 ↓ (5)	12 ↓ (6)
A → (1)	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6
B → (2)	2+1	2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+1	2+2	2+3	2+4	2+5	2+6
C → (3)	3+1	3+2	3+3	3+4	3+5	3+6	3+1	3+2	3+3	3+4	3+5	3+6
D → (4)	4+1	4+2	4+3	4+4	4+5	4+6	4+1	4+2	4+3	4+4	4+5	4+6
E → (5)	5+1	5+2	5+3	5+4	5+5	5+6	5+1	5+2	5+3	5+4	5+5	5+6
F → (6)	6+1	6+2	6+3	6+4	6+5	6+6	6+1	6+2	6+3	6+4	6+5	6+6
G	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK
H	PK	PK	PK	A.K	A.K	A.K	KÖR	KÖR	KÖR	NK	NK	NK

Şekil 7. *C.albicans* için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı

1: çörek otu yağı, **2:** biberiye yağı, **3:** tarçın yağı, **4:** defne yağı, **5:** timokinon, **6:** kateşin, **F:** flukonazol, **B:** besiyeri, **PK:** pozitif kontrol, **NK:** negatif kontrol (üreme kontrolü), **KÖR:** besiyeri

Tablo 12. *C.albicans* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri

<i>C.albicans</i> ATCC 10231	Biberiye-Tarçın	Biberiye-Kateşin	Tarçın-Defne
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,006/0,049		
FİK Biberiye	0,12		
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,00000074/ 0,0000059		
FİK Tarçın	0,13		
FİKİ	0,25 (Sinerjik)		
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon/ tek)		0,012/0,049	
FİK Biberiye		0,25	
Kateşin MİK(µg/mL) (kombinasyon/ tek)		3 000/12 000	
FİK Kateşin		0,25	
FİKİ		0,5 (Sinerjik)	
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon/ tek)			0,0000015/ 0,0000059
FİK Tarçın			0,25
Defne MİK(%vv) (kombinasyon/ tek)			0,012/0,049
FİK Defne			0,25
FİKİ			0,5 (Sinerjik)

Tablo 13. *C.albicans* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri (Devamı)

<i>C.albicans</i> ATCC 10231	Kateşin-Tarçın	Kateşin-Timokinon
Kateşin MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	1 500/12 000	
FİK Kateşin	0,125	
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,00000074/ 0,0000059	
FİK Tarçın	0,13	
FİKİ	0,26 (Sinerjik)	
Kateşin MİK (µg/mL) (kombinasyon/ tek)		1 500/12 000
FİK Kateşin		0,125
Timokinon MİK(µg/mL) (kombinasyon/ tek)		3,58/28,71
FİK Timokinon		0,124
FİKİ		0,25 (Sinerjik)

6.2.5. *A. niger* için checkerboard sonuçları

Sinerjik etki çalışmasında biberiye, tarçın uçucu yağları ve timokinon, kateşin fitokimyasalların kombinasyonları şekil 8’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon kombinasyonlarının en etkili kombinasyonlar olduğu saptanmıştır. MİK sonuçlarına göre hesaplanan FİK indeksine göre biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon kombinasyonlarının sinerjik etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 14).

MADDE KOMBİNASYONU + MİKROORGANİZMA						MADDE KOMBİNASYONU + BESİYERİ						
	1 ↓ (1)	2 ↓ (2)	3 ↓ (3)	4 ↓ (4)	5	6	7 ↓ (1)	8 ↓ (2)	9 ↓ (3)	10 ↓ (4)	11	12
A → (1)	1+1	1+2	1+3	1+4			1+1	1+2	1+3	1+4		NK
B → (2)	2+1	2+2	2+3	2+4			2+1	2+2	2+3	2+4		NK
C → (3)	3+1	3+2	3+3	3+4			3+1	3+2	3+3	3+4		NK
D → (4)	4+1	4+2	4+3	4+4			4+1	4+2	4+3	4+4		NK
E												
F	AK	AK	AK									
G										KÖR	KÖR	KÖR
H	PK	PK	PK							KÖR	KÖR	KÖR

Şekil 8. *A.niger* için 96 kuyucuklu plakada checkerboard yöntemi planı

1: timokinon, **2:** kateşin, **3:** biberiye, **4:** tarçın, **AK:** antifungal kör, **PK:** pozitif kontrol, **NK:** negatif kontrol (üreme kontrolü), **KÖR:** besiyeri

Tablo 14. *A.niger* için kombinasyonların MİK/FİK değerleri

<i>A.niger</i> ATCC 16404	Biberiye-Tarçın	Kateşin-Timokinon
Biberiye MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,39/1,56	
FİK Biberiye	0,25	
Tarçın MİK (%vv) (kombinasyon / tek)	0,78/3,12	
FİK Tarçın	0,25	
FİKİ	0,5 (Sinerjik)	
Kateşin MİK (µg/mL) (kombinasyon/ tek)		1 500/12 000
FİK Kateşin		0,125
Timokinon MİK(µg/mL) (kombinasyon/ tek)		459,37/3 675
FİK Timokinon		0,125
FİKİ		0,25 (Sinerjik)

6.3. Kitosan ile Enkapsülasyon İşlemi

Sinerjik etki çalışması sonuçlarına göre mikrokapsüllere yüklenen biberiye-tarçın uçucu yağ kombinasyonu miktarı 0,926 mg/mL, kateşin-timokinon fitokimyasal kombinasyonu miktarı 2 mg/mL olarak saptanmıştır.

6.3.1. Uçucu yağ ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin antimikrobiyal etkisi

Biberiye-tarçın uçucu yağ mikrokapsülünün antimikrobiyal etkisi, uçucu yağların tek başına ve kombinasyonlarına göre daha fazla bulunmuştur (Tablo 15).

Kateşin-timokinon fitokimyasal mikrokapsülünün *C.albicans* ve *A.niger*'e karşı antimikrobiyal etkisi fitokimyasalların tek başına ve kombinasyonlarına göre daha etkili bulunmuştur. Bakterilere karşı ise etkisiz olduğu görülmüştür (Tablo 16).

Tablo 15. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün MİK değerleri

Mikroorganizmalar	Biberiye-Tarçın Mikrokapsülü (0,926 mg/mL)
	MİK(mg/mL)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	0,463 mg/mL
<i>S.aureus</i> ATCC 6838	0,116 mg/mL
<i>E.coli</i> ATCC 8739	0,231 mg/mL
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	0,014 mg/mL
<i>A.niger</i> ATCC 16404	0,014 mg/mL

Tablo 16. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün MİK değerleri

Mikroorganizmalar	Kateşin-Timokinon Mikrokapsülü (2 mg/mL)
	MİK (mg/mL)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	-
<i>S.aureus</i> ATCC 6838	-
<i>E.coli</i> ATCC 8739	-
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	0,12 mg/mL
<i>A.niger</i> ATCC 16404	0,25 mg/mL

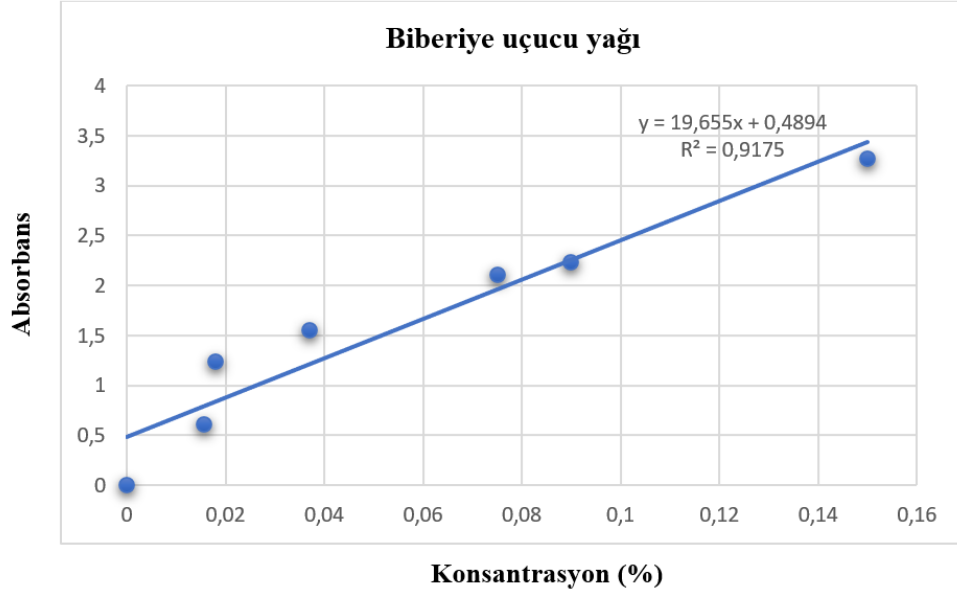
(-: Etkisiz)

6.3.2. Mikroenkapsülasyon veriminin tayini

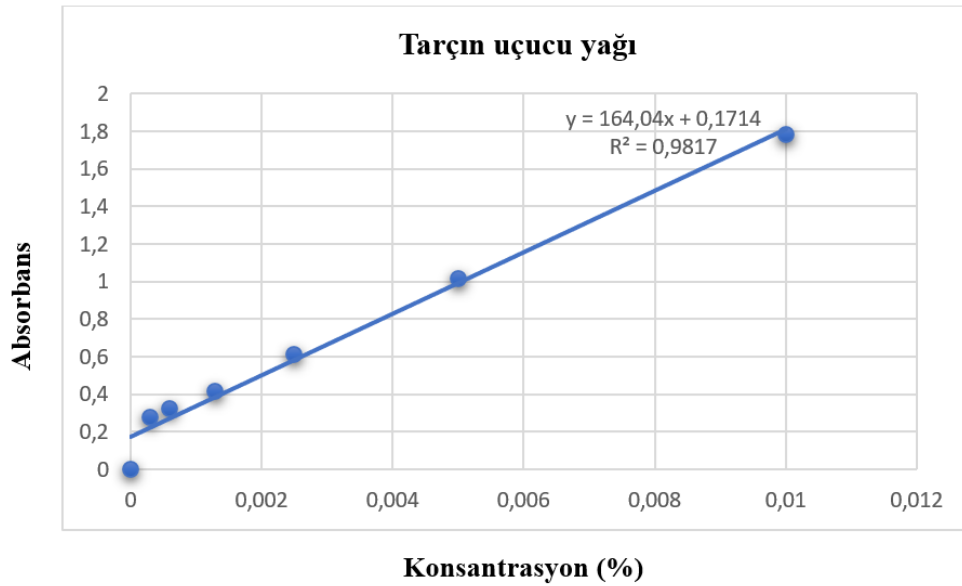
Kitosan ile mikroenkapsülasyonu yapılan uçucu yağ kombinasyonunun %100 kaplama veriminin hesaplanması için biberiye, tarçın ve biberiye-tarçın mikrokapsülünün spektrofotometrede 234-246 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Fitokimyasal kombinasyonun kaplama veriminin hesaplanabilmesi için kateşin, timokinon ve kateşin-timokinon mikrokapsülünün spektrofotometrede 230-248 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Aşağıdaki formüle göre, biberiye-tarçın mikrokapsülünün enkapsülasyon verimliliği % 86,7 (Şekil 9, 10, 11), kateşin-timokinon mikrokapsülünün enkapsülasyon verimliliği % 67,2 olarak hesaplanmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 12, 13, 14).

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times \frac{(\text{OD kontrol} - \text{OD örnek})}{\text{OD kontrol}}$$

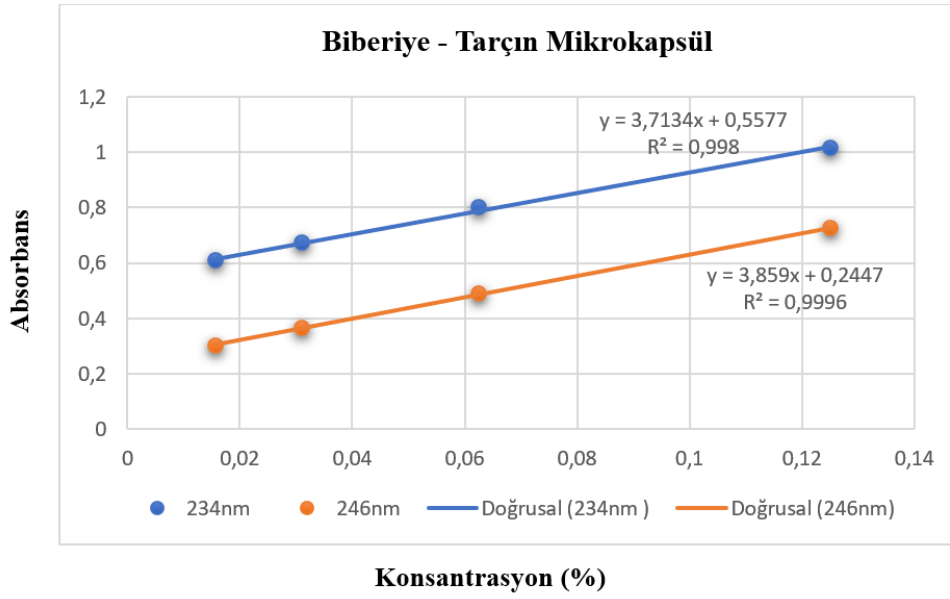
6.3.2.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün enkapsülasyon veriminin hesaplanması



Şekil 9. Biberiye uçucu yağının kalibrasyon eğrisi (234 nm)



Şekil 10. Tarçın uçucu yağının kalibrasyon eğrisi (246 nm)



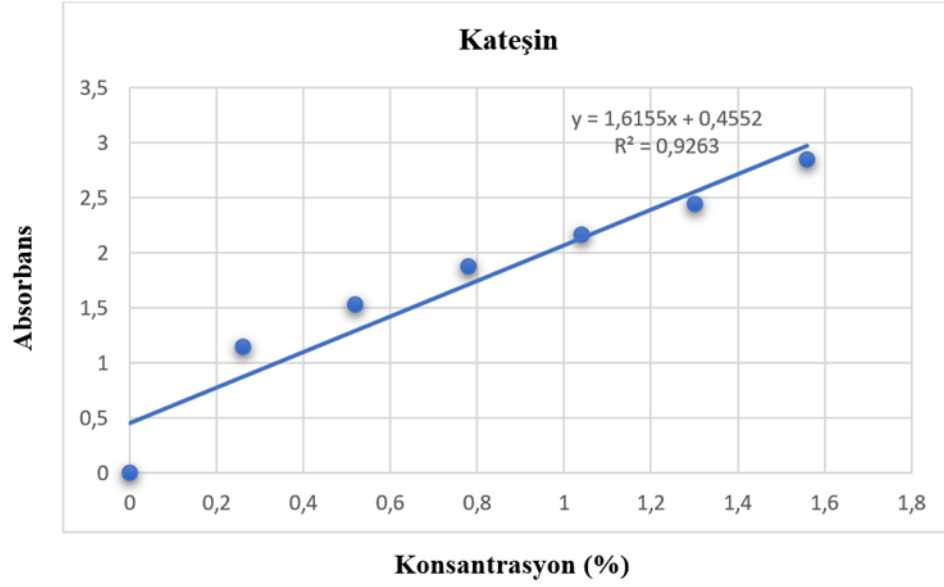
Şekil 11. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün kalibrasyon eğrisi (234-246 nm)

$$\text{Biberiye enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times \frac{(1,55 - 0,673)}{1,55} = \% 56,6$$

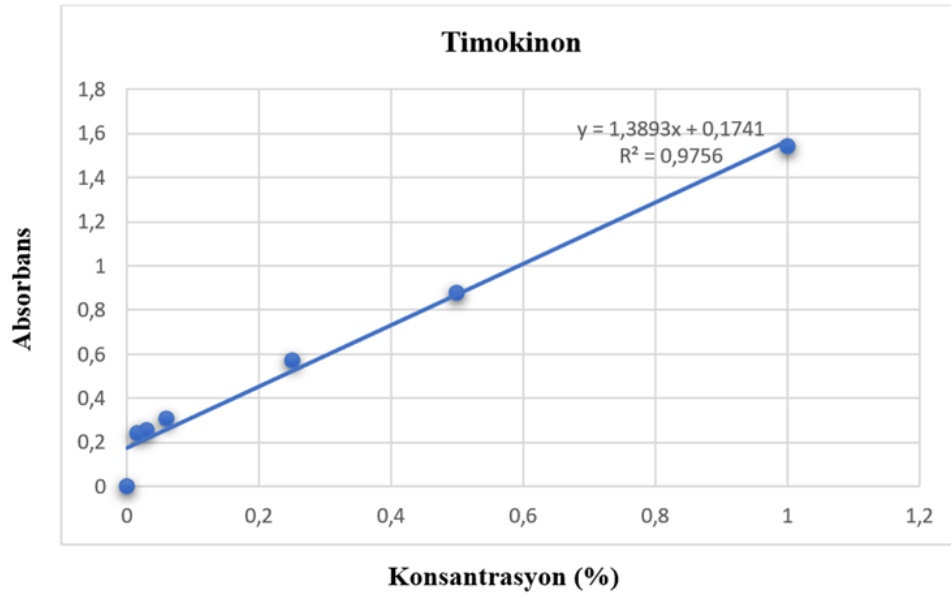
$$\text{Tarçın enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times \frac{(1,782 - 0,301)}{1,782} = \% 99,9$$

$$\text{Biberiye-Tarçın enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{(56,6 \times 2,42) + (99,9 \times 0,8)}{2,5} = \% 86,7$$

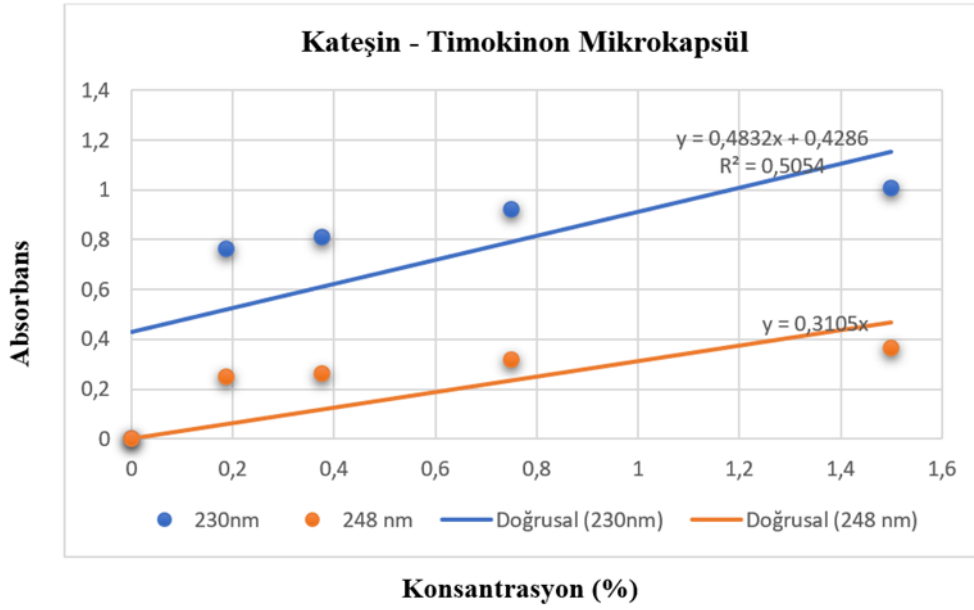
6.3.2.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün enkapsülasyon veriminin hesaplanması



Şekil 12. Kateşin fitokimyasalının kalibrasyon eğrisi (230 nm)



Şekil 13. Timokinon fitokimyasalının kalibrasyon eğrisi (248 nm)



Şekil 14. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün kalibrasyon eğrisi (230-248 nm)

$$\text{Kateşin enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times \frac{(2,844 - 1,008)}{2,844} = \% 64,5$$

$$\text{Timokinon enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times \frac{(0,876 - 0,264)}{0,876} = \% 69,8$$

$$\text{Kateşin-Timokinon enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{(64,5 \times 1,25) + (69,8 \times 1,25)}{2,5} = \% 67,2$$

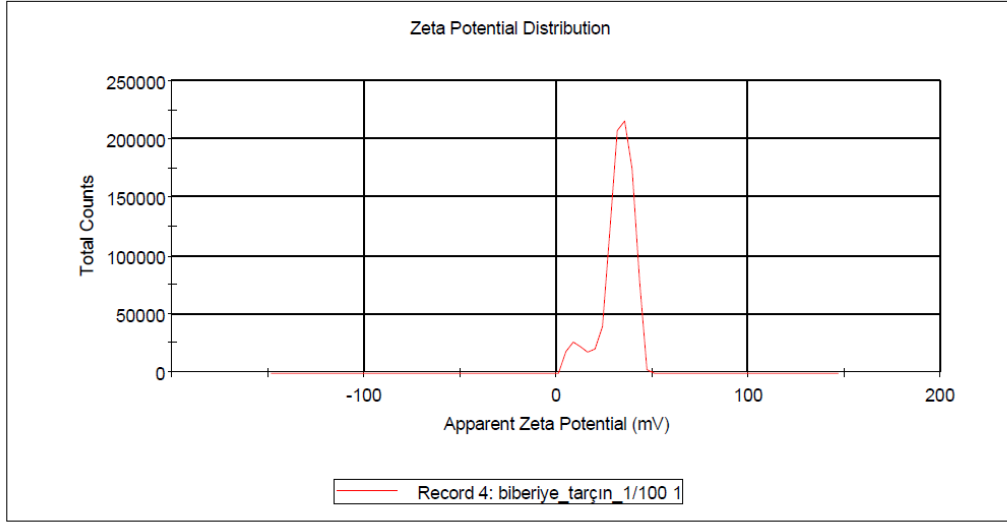
6.3.3. Mikrokapsüllerin karakterizasyonu

6.3.3.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün karakterizasyon verileri

Biberiye-tarçın mikrokapsülünün boyut ve zeta potansiyel ölçüm analizleri sonucunda; zeta potansiyel değeri +32,0 mV, mikrokapsülün boyutu 216,6 nm, parçacık boyutu dağılımı Polidispersite İndeks (PdI) değeri 0,156 olarak bulunmuştur (Şekil 15, 16).

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 32.0	Peak 1: 33.8	91.1	6.03
Zeta Deviation (mV): 8.69	Peak 2: 10.5	8.9	4.02
Conductivity (mS/cm): 0.145	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality: Good			

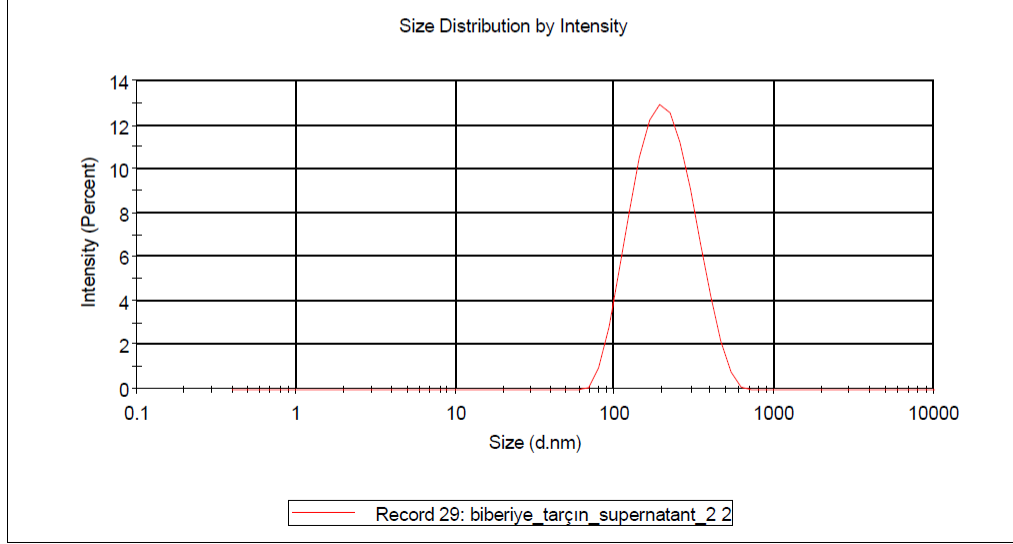


Şekil 15. Biberiye-tarçın mikrokapsülün zeta potansiyel verisi

Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 181.2	Peak 1: 216.6	100.0	92.10
Pdl: 0.156	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.900	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good



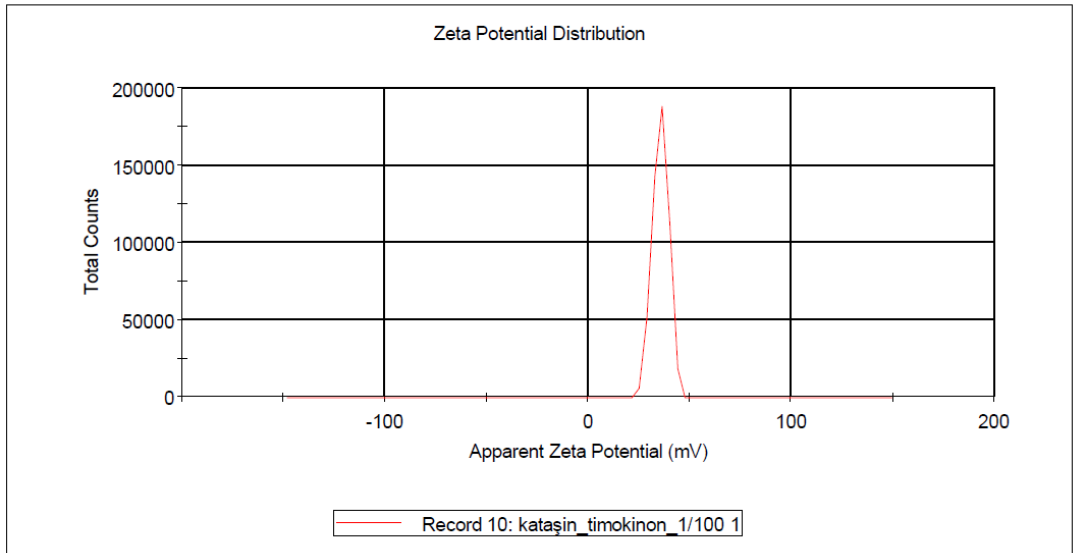
Şekil 16. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün boyut ölçümü verisi

6.3.3.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülün karakterizasyon verileri

Kateşin-timokinon mikrokapsülünün boyut ve zeta potansiyel ölçüm analizleri sonucunda; zeta potansiyel değeri +35,6 mV, mikrokapsülün boyutu 507 nm, parçacık boyutu dağılımı Polidispersite İndeks (PdI) değeri 0,291 olarak bulunmuştur (Şekil 17, 18).

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 35.6	Peak 1: 35.6	100.0	3.93
Zeta Deviation (mV): 3.93	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.103	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

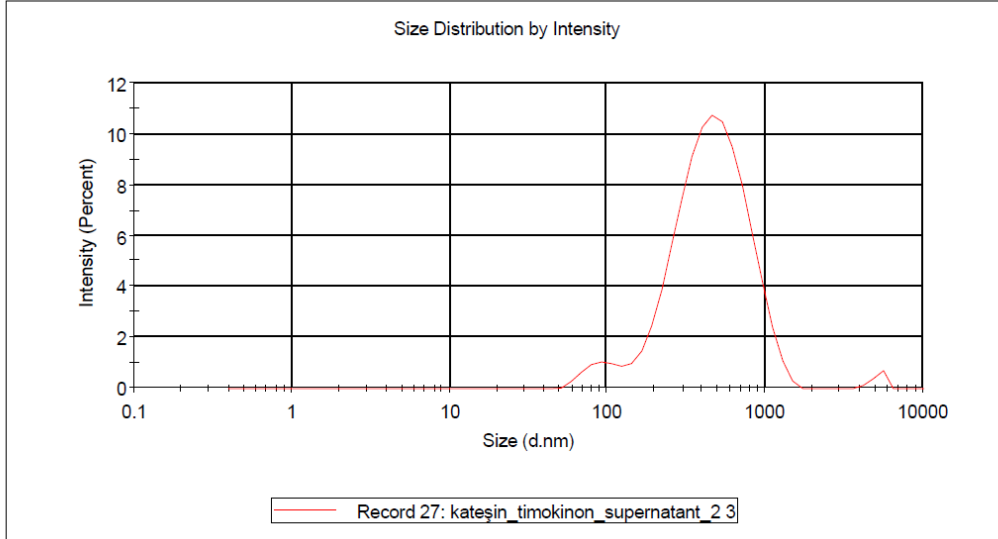


Şekil 17. Kateşin-timokinon mikrokapsülün zeta potansiyel verisi

Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 376.3	Peak 1: 507.0	94.1	247.1
Pdl: 0.291	Peak 2: 92.36	4.7	19.85
Intercept: 0.946	Peak 3: 5179	1.2	486.1

Result quality : Good

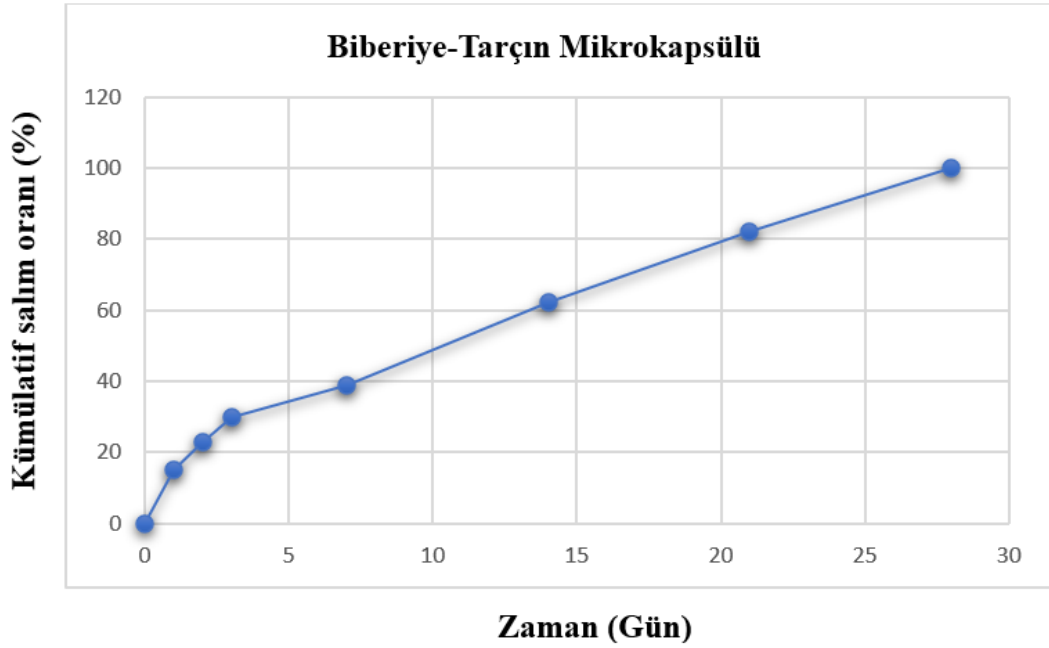


Şekil 18. Kateşin-timokinon mikrokapsülün boyut ölçüm verisi

6.3.4. Salınım testleri

6.3.4.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün salınım kinetiğinin incelenmesi

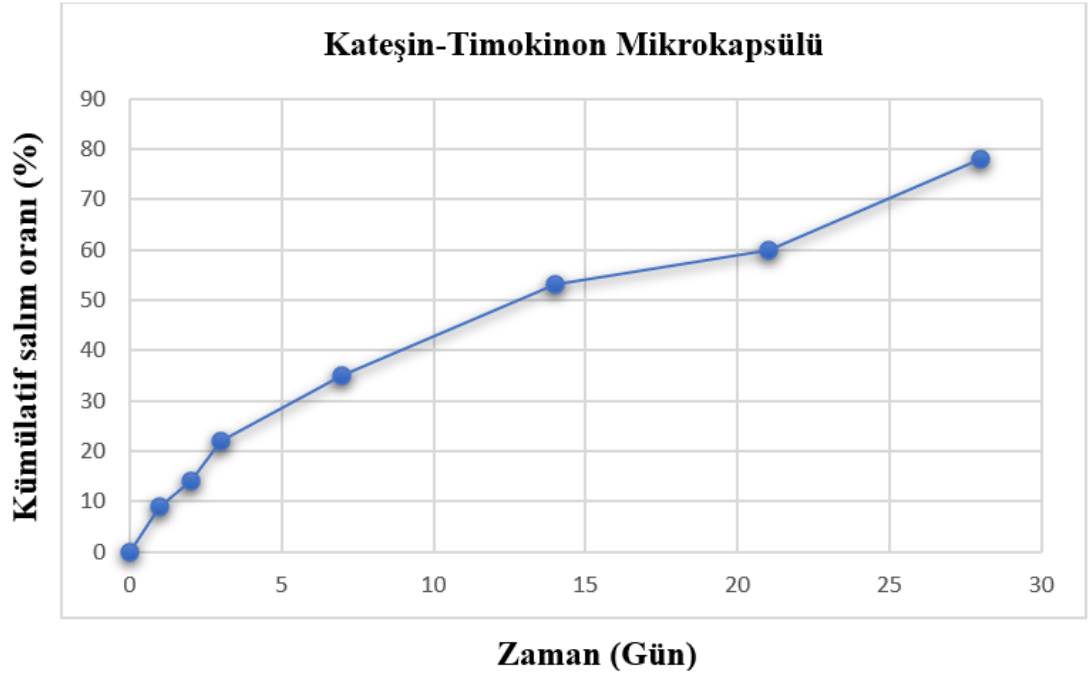
Kitosan ile enkapsüle edilmiş biberiye-tarçın mikrokapsülünün 1., 2., 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde kontrollü salınımı gerçekleşmiş ve 28. gün sonunda %100 oranında serbest bırakıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Kitosan ile enkapsüle edilmiş biberiye-tarçın mikrokapsülünün zamana bağlı salınım kinetiği

6.3.4.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün salınım kinetiğinin incelenmesi

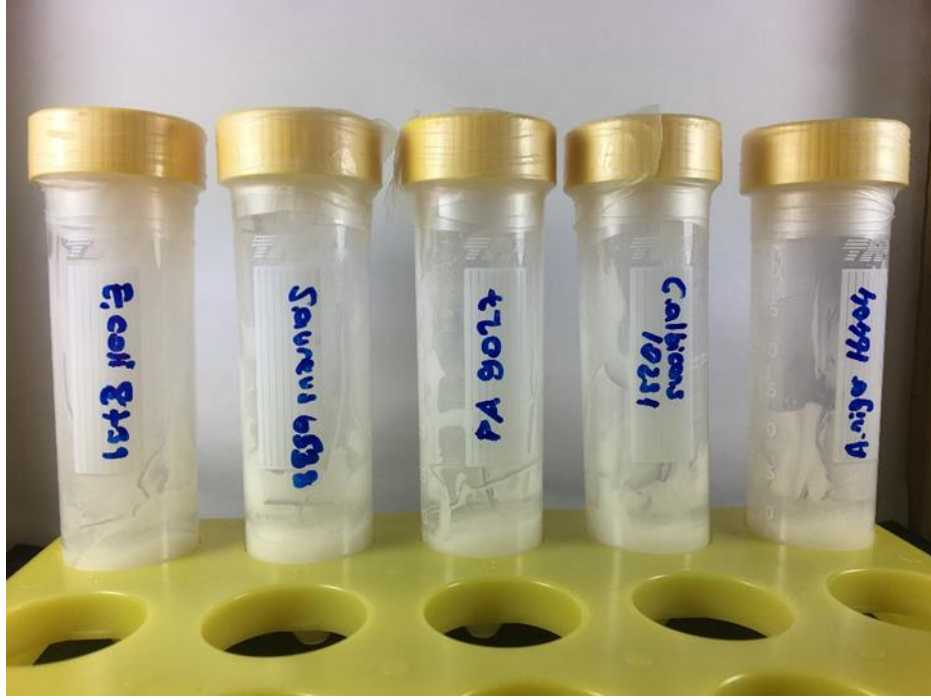
Kitosan ile enkapsüle edilmiş kateşin-timokinon mikrokapsülünün 1., 2., 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde kontrollü salınımı gerçekleşmiş ve 28. gün sonunda % 78 oranında serbest bırakıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Kitosan ile enkapsüle edilmiş kateşin-timokinon mikrokapşülünün zamana bağlı salınım kinetiği

6.4. Challenge test

Krem bazı örneklerinde (Resim 1), Amerikan Farmakopesine göre bulunması gereken mikroorganizma miktarları tablo 17’de, mikroorganizmaların 0.gün koloni sayımları ise tablo 18’de gösterilmiştir.



Resim 6. Krem bazı+koruyucu içeren tüpler

Tablo 17. Krem örneklerinde Amerikan Farmakopesine göre bulunması gereken mikroorganizma miktarları

Mikroorganizmalar	Krem örneklerinde Amerikan Farmakopesine göre bulunması gereken mikroorganizma sayısı (kob/mL-g)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	10 ⁶ kob/mL-g
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	10 ⁶ kob/mL-g
<i>E.coli</i> ATCC 8739	10 ⁶ kob/mL-g
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	10 ⁵ kob/mL-g
<i>A.niger</i> ATCC 16404	10 ⁵ kob/mL-g

Tablo 18. Mikroorganizmaların 0.gün koloni sayımları

Mikroorganizmalar	Mikroorganizma sayısı		
	10 ⁶ kob/mL	10 ⁵ kob/mL	10 ⁴ kob/mL
<i>P. aeruginosa</i>	>100.000 kob/mL	>100.000 kob/mL	330 koloni
<i>S.aureus</i>	>100.000 kob/mL	>100.000 kob/mL	393 koloni
<i>E.coli</i>	>100.000 kob/mL	>100.000 kob/mL	250 koloni
<i>C.albicans</i>	>100.000 kob/mL	>100.000 kob/mL	176 koloni
<i>A.niger</i>	42 koloni	-	-

6.4.1. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün challenge testi sonuçları

Krem bazına % 0,3 konsantrasyon oranında eklenen biberiye-tarçın mikrokapsülleri, bakteriler ve maya için 28. günde raf ömrünü etkili bir şekilde sağlarken, *A. niger*'e karşı 28. günde raf ömrünü azalttığı görülmüştür (Tablo 19). Biberiye-tarçın mikrokapsüllerin logaritmik azalma değerleri tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 19. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları

Mikroorganizmalar	Mikroorganizma sayısı		
	0.gün	14.gün	28.gün
<i>P.aeruginosa</i>	3,3 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>S.aureus</i>	3,9 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>E.coli</i>	2,5 x 10 ⁶	29 koloni	1 koloni
<i>C.albicans</i>	1,7 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>A.niger</i>	4,2 x 10 ⁷	Üreme yok	3 koloni

Tablo 20. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün logaritmik azalma değerleri

Mikroorganizmalar	Logaritmik azalma	
	14.gün	28.gün
<i>P.aeruginosa</i>	7,52 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>S.aureus</i>	7,59 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>E.coli</i>	3,93 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>C.albicans</i>	Üreme artışı yok	Üreme artışı yok
<i>A.niger</i>	Üreme artışı yok	Üreme artışı var

6.4.2. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün challenge testi sonuçları

Krem bazına % 0,3 konsantrasyon oranında eklenen kateşin-timokinon mikrokapsülleri, *C.albicans* için 28. günde raf ömrünü etkili bir şekilde sağlarken, *A.niger*'e karşı 28.günde raf ömrünü azalttığı görülmüştür (Tablo 21).

Tablo 21. Kateşin-timokinon mikrokapsülünün 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları

Mikroorganizmalar	Mikroorganizma sayısı		
	0.gün	14.gün	28.gün
<i>C.albicans</i>	1,7 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>A.niger</i>	4,2 x 10 ⁷	6 koloni	33 koloni

6.4.3. Fenoksietanol-kaprilil glikol kombinasyonu challenge testi sonuçları

Krem bazına % 0,3 konsantrasyon oranında eklenen fenoksietanol-kaprilil glikol kombinasyonu, bakteriler, maya ve küf için 28. günde raf ömrünü etkili bir şekilde sağladığı görülmüştür (Tablo 22). Fenoksietanol-kaprilil glikol kombinasyonunun logaritmik azalma değerleri tablo 23’de gösterilmiştir.

Tablo 22. Fenoksietanol- kaprilil glikol koruyucu kombinasyonunun 0., 14. ve 28. gün mikroorganizma sayımları

Mikroorganizmalar	Mikroorganizma sayısı		
	0.gün	14.gün	28.gün
<i>P.aeruginosa</i>	3,3 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>S.aureus</i>	3,93 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>E.coli</i>	2,5 x 10 ⁶	2 koloni	Üreme yok
<i>C.albicans</i>	1,76 x 10 ⁶	Üreme yok	Üreme yok
<i>A.niger</i>	4,2 x 10 ⁷	Üreme yok	Üreme yok

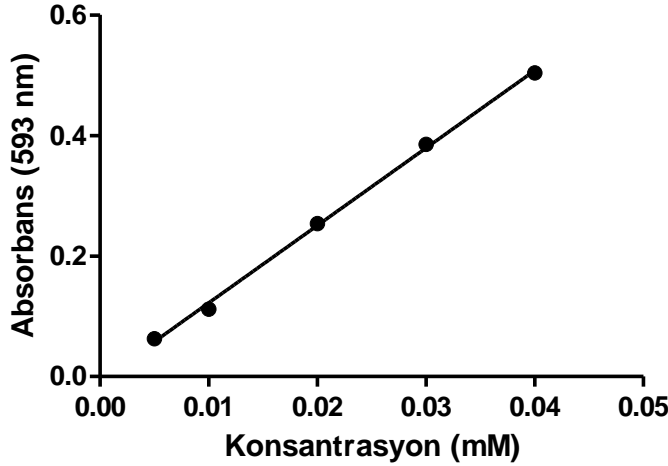
Tablo 23. Fenoksietanol- kaprilil glikol koruyucu kombinasyonunun logaritmik azalma değerleri

Mikroorganizmalar	Logaritmik azalma	
	14.gün	28.gün
<i>P.aeruginosa</i>	7,52 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>S.aureus</i>	7,59 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>E.coli</i>	5,10 log kob/mL	Üreme artışı yok
<i>C.albicans</i>	Üreme artışı yok	Üreme artışı yok
<i>A.niger</i>	Üreme artışı yok	Üreme artışı yok

6.5. Antioksidatif Etkinlik Testi

6.5.1. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

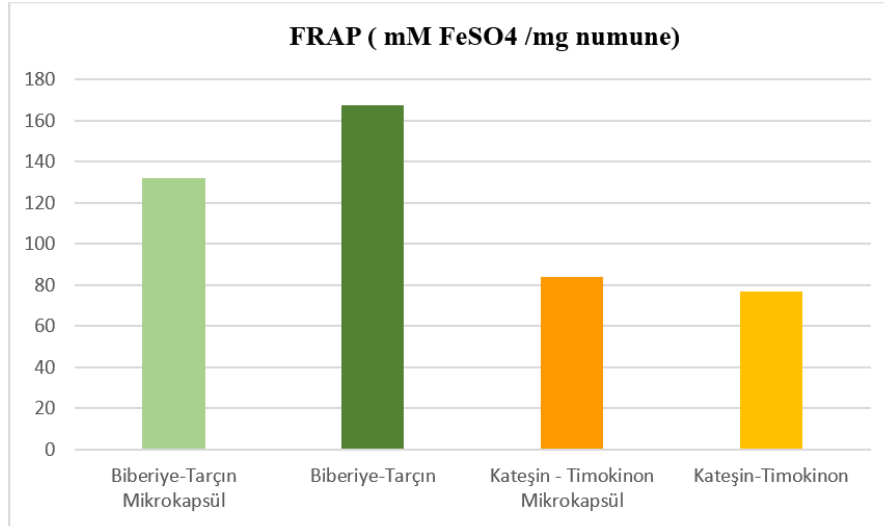
Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayininde; biberiye-tarçın mikrokapsülleri, enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın kombinasyonu ile; kateşin-timokinon mikrokapsülleri ise enkapsüle edilmemiş serbest kateşin-timokinon kombinasyonu ile karşılaştırılmış ve 593 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar FeSO_4 'ın kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildiğinde; biberiye-tarçın mikrokapsülünün, enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın kombinasyonundan daha düşük aktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 21). Kateşin-timokinon mikrokapsülünün ise enkapsüle edilmemiş serbest kateşin-timokinon kombinasyonundan daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bütün numuneleri kıyasladığımızda, enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın uçucu yağ kombinasyonunun en güçlü FRAP değerine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 24, Şekil 22).



Şekil 21. FeSO_4 'ın kalibrasyon eğrisi

Tablo 24. Numunelerin demir (III) indirgeme antioksidan gücü

FRAP (mM FeSO ₄ /mg numune)	
Biberiye-Tarçın Mikrokapsül	131,812 ± 6,618
Biberiye-Tarçın	167,274 ± 11,353
Kateşin-Timokinon Mikrokapsül	84,033 ± 17,946
Kateşin-Timokinon	76,994 ± 2,261

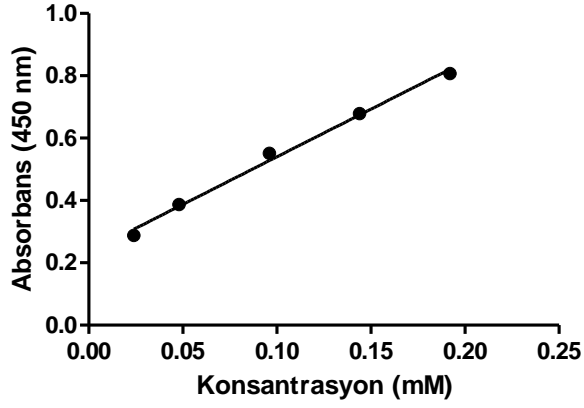


Şekil 22. Numunelerin FRAP değerleri

6.5.2. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini

Mikrokapsüllerin ve enkapsüle edilmemiş bileşiklerin, bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi, CUPRAC yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Troloks kalibrasyon eğrisine göre değerlendirilmiş (Şekil 23) ve biberiye-tarçın mikrokapsülünün, enkapsüle edilmemiş biberiye-tarçın kombinasyonundan daha yüksek, kateşin-timokinon mikrokapsülünün ise enkapsüle edilmemiş kateşin-timokinon kombinasyonundan daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bütün

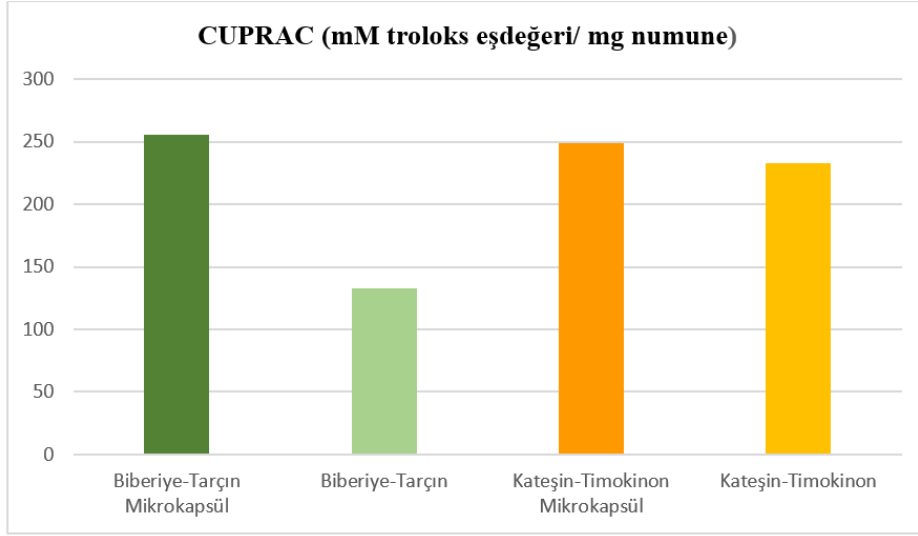
numuneleri kıyasladığımızda, en güçlü CUPRAC değerinin biberiye-tarçın mikrokapsülü olduğu saptanmıştır (Tablo 25, Şekil 24).



Şekil 23. Troloks kalibrasyon eğrisi

Tablo 25. Numunelerin bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan gücü

CUPRAC (mM troloks eşdeğeri/ mg numune)	
Biberiye-Tarçın Mikrokapsül	255,575 ± 7,139
Biberiye-Tarçın	132,339 ± 2,503
Kateşin-Timokinon Mikrokapsül	248,925 ± 7,139
Kateşin-Timokinon	232,596 ± 15,523



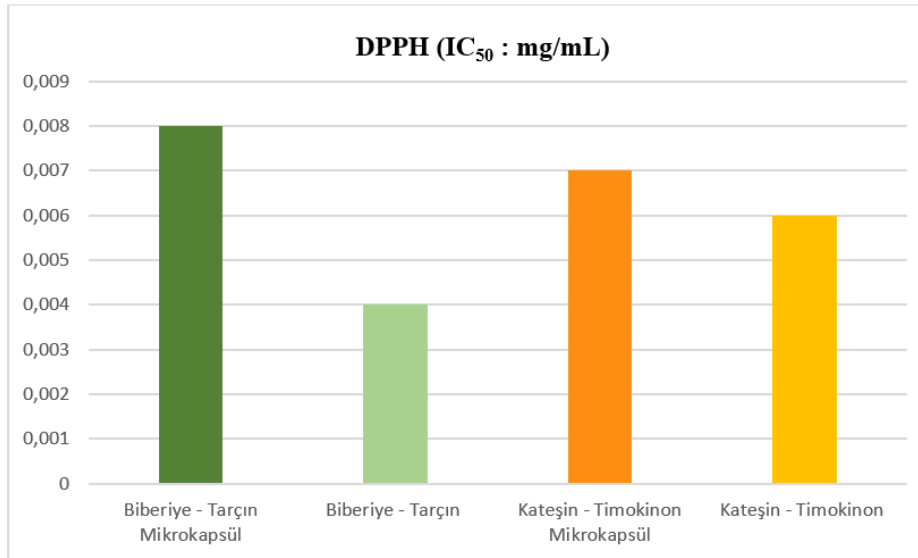
Şekil 24. Numunelerin CUPRAC değerleri

6.5.3. DPPH Radikal süpürücü aktivite tayini

Biberiye-tarçın mikrokapsülleri, biberiye-tarçın uçucu yağ kombinasyonu ile karşılaştırılarak; kateşin-timokinon mikrokapsülleri ise kateşin-timokinon fitokimyasal kombinasyonu ile karşılaştırılarak DPPH radikal süpürücü aktiviteler tayin edilmiştir. Örnekler 96 kuyucuklu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Mikrokapsül ve serbest halleriyle kullanılan uçucu yağlar ve fitokimyasalların antioksidan aktiviteleri IC_{50} değerleri kıyaslanarak değerlendirilmiştir. IC_{50} ile antioksidan aktivite arasında ters ilişki göz önüne alındığında, biberiye-tarçın mikrokapsüllerinin, enkapsüle edilmemiş biberiye-tarçın kombinasyonundan daha düşük aktivite gösterdiği saptanmıştır. Kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin de enkapsüle edilmemiş kateşin-timokinon fitokimyasal kombinasyonundan daha düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bütün numuneleri kıyasladığımızda en güçlü DPPH değerinin enkapsüle edilmemiş biberiye-tarçın uçucu yağ kombinasyonunun olduğu saptanmıştır (Tablo 26, Şekil 25).

Tablo 26. Numunelerin DPPH radikali süpürücü aktivitesi

DPPH (IC₅₀: mg/mL)	
Biberiye-Tarçın Mikrokapsül	0,008 ± 0,003
Biberiye-Tarçın	0,004 ± 0,003
Kateşin-Timokinon Mikrokapsül	0,007 ± 0,002
Kateşin-Timokinon	0,006 ± 0,003



Şekil 25. Numunelerin IC₅₀ değerleri

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kozmetik endüstrisi için mikrobiyolojik kalite çok önemlidir. Ham maddeler ve bitmiş kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik özellikleri ve challenge test sonuçları Avrupa Birliği'ndeki kozmetik mevzuatına göre, kozmetik ürün güvenlilik raporunun zorunlu unsurlarıdır (European Commission, 2016; Glavač ve Lunder, 2018). Bu sebeple kozmetik ürünlere koruyucu madde ilavesi yapılmaktadır. Koruyucular gıda, kozmetik ve farmasötik ürünlerin bozulmasını engeller, ayrıca mikroorganizma kontaminasyonu sonucu tüketicide enfeksiyon oluşma riskini de azaltırlar (Chen ve ark., 2007; Darbre, 2006; Salvagnini ve ark., 2006; Orth ve Kabara, 1998).

Endüstriler genellikle üretilen ürünlerin raf ömrünü artırmak için sentetik koruyucular kullanırlar ancak bu koruyucular her zaman verimli değildir. Bazı koruyucular sınırlı bir pH aralığında geniş bir etki spektrumu sergilerken, bazıları geniş bir pH aralığında antimikrobiyal aktivite gösterirler (Kunicka-Styczyńska ve ark., 2011). Bu sınırlamaların yanı sıra, çoğu sentetik koruyucunun insan sağlığına zararlı olduğu sayısız çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Örneğin; parabenlerin, insan meme dokusu örneklerinde ve kan, idrar, süt gibi insan sıvı örneklerinde % 99 oranında saptanabildiği bildirilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda, kozmetiklerde paraben kullanımının meme kanseri gelişme riskini arttırdığı belirtilmektedir (Darbre ve Harvey, 2014; Barr ve ark., 2012; Sandanger ve ark., 2011; Schlumpf ve ark., 2010; Ye ve ark., 2006). Öte yandan, son on yılda kozmetiklerde bulunan koruyucuların neden olduğu temas alerjilerinde de önemli bir artış olduğu belgelenmiştir (Schwensen ve ark., 2015).

Kozmetik endüstrisi son zamanlarda sentetik koruyucuların olumsuz etkisi ve artan tüketici talebi sebebiyle antimikrobiyal etkiye sahip doğal ürünlere ve özellikle aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlara yönelmiştir (Hernandes ve ark., 2017).

Essid ve arkadaşları, *Candida* suşuna karşı tarçın (*Cinnamomum verum*) uçucu yağının ve içerdiği fitokimyasal bileşiklerin antifungal etkisini araştırmışlardır. Uçucu yağın fitokimyasal bileşimini GC-MS analizi ile fenilpropanoid yapısında sinnamaldehit olarak karakterize etmişler (% 82,09) ve *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı hem uçucu yağın hem de saf sinnamaldehitin 62,5 µg/mL MİK değerinde eşit derecede antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Essid ve ark., 2017).

Diğer bir çalışmada, tarçın uçucu yağında % 65-80 oranındaki sinnamaldehitin ve % 5-10 oranındaki öjenolün kuvvetli antimikrobiyal etki yarattıkları bildirilmiştir (Çoşkun, 2006).

Calsamiglia ve arkadaşlarının çalışmasında, tarçın uçucu yağında % 75 düzeyinde bulunan sinnamaldehitin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Sinnamaldehitin antimikrobiyal etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır fakat antimikrobiyal etkisinin muhtemelen yapısındaki karbonil grubunun reaktivesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Calsamiglia ve ark., 2007).

Firmino ve arkadaşlarının, *Cinnamomum* sp. uçucu yağları ve sinnamaldehitin antimikrobiyal aktivitesini ölçtükleri bir çalışmada, *C. cassia*, *C. zeylanicum* ve sinnamaldehitin *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve 0,25-0,50 mg/mL MİK değerlerinde etkili olduklarını bildirmişlerdir (Firmino ve ark., 2018).

Ooi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tarçın (*C. cassia*) uçucu yağının % 85,06 oranında sinnamaldehit içerdiği, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği, gram-negatif suşlara karşı MİK değerinin 0,3 mg/ mL ve *S. aureus*'a karşı MİK değerinin ise 0,6 mg/mL olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar *Candida* spp. suşlarına karşı 113-450 µg/mL arasında değişen MİK değerleri ve *A. Niger*'e karşı ise 125 µg/mL MİK değeri bulmuşlardır (Ooi ve ar k., 2006).

Çalışmamızda, tarçın uçucu yağının özellikle *C. albicans*'a karşı 0,0000059 %v/v MİK değerinde çok yüksek antifungal etki gösterdiği bulunmuştur. Tarçın uçucu yağı *A. niger*'e karşı da 3,12 %v/v MİK değerinde antifungal etki göstermiştir. Ooi ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak çalışmamızda, *P. aeruginosa* (0,049 %v/v) ve *E. coli*'ye (0,78 %v/v) karşı *S. aureus*'dan (1,56 %v/v) daha yüksek antibakteriyel aktivite saptanmıştır.

Jiang ve arkadaşları biberiye uçucu yağının kimyasal bileşenlerinden olan α -pinen ve 1,8-sineolü, biberiye uçucu yağı ile karşılaştırdıklarında; α -pinen ve 1,8-sineol bileşiklerinin biberiye uçucu yağına göre daha düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişler ve biberiye uçucu yağının *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* (MRSA), *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC 16404

suşlarına karşı MİK değerlerini sırasıyla % 0,3, % 0,1, % 0,03, % 0,1 ve % 1,0 olarak bulmuşlardır (Jiang ve ark.,2011).

Silva ve arkadaşlarının çalışmasında, on adet gram pozitif ve gram negatif bakteri türlerine karşı, biberiye uçucu yağının *E. coli*'ye karşı % 25, *S. aureus*'a karşı % 50 MİK değerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği, *P. aeruginosa*'ya karşı ise etkili olmadığı belirtilmiştir (Silva ve ark., 2012).

Uçar ve arkadaşları CLSI'nın standart disk difüzyon metodu ile yaptıkları çalışmalarında, biberiye uçucu yağının *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkisinin 23 mm zon çapında bulunduğunu, *P. aeruginosa*'ya karşı ise etkili olmadığını göstermişlerdir (Uçar ve ark., 2015).

Çalışmamızda, biberiye uçucu yağı *S. aureus*'a 19,28 mm, *P. aeruginosa*'ya 15,46 mm *E. coli*'ye 15,69 mm ve *C. albicans*'a 22,29 mm zon çapında antimikrobiyal etkili bulunmuştur.

Lemos ve arkadaşları biberiye uçucu yağının *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, uçucu yağın kontrol olarak kullanılan sülfanilamid antibiyotikinden daha güçlü aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Lemos ve ark., 2015).

Çalışmamızda, biberiye uçucu yağı *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E.coli*' ye (12,50 %v/v, 0,39 %v/v, 3,12 %v/v) karşı kontrol olarak kullanılan meropenem (0,5 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,003 µg/mL) antibiyotikinden biraz düşük antibakteriyel etki göstermesine karşın, *C. albicans*'a (0,049 %v/v) karşı kontrol olarak kullanılan flukonazolden (0,25 µg/mL) daha yüksek antifungal etki göstermiştir. *A. niger*'e (1,56 %v/v) karşı ise amfoterisin B'ye (1 µg/mL) çok yakın MİK değeri bulunmuştur.

Erkmen ve arkadaşları, defne uçucu yağının *E. coli* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı etkisiz olduğunu, *S. aureus* ve *A. niger*'e karşı ise 0,02 %v/v MİK değerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Erkmen ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda da defne uçucu yağı *S. aureus*'a karşı 0,19 %v/v MİK değerinde antibakteriyel etki göstermiştir.

Çoşkun çalışmasında, defne uçucu yağında % 2-12 oranında bulunan öjenol + metil öjenolün antimikrobiyal etki yarattığını bildirmiştir (Çoşkun, 2006).

Cherrat ve arkadaşları, defne uçucu yağının, 5 adet gram-pozitif ve 4 adet gram-negatif bakteri suşlarına karşı 0,5-14,0 µl/mL MİK değer aralığında antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve defne uçucu yağının gram-pozitif bakterilere karşı gram-negatif bakterilerden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Cherrat ve ark., 2013).

Moghtader ve arkadaşları, defne uçucu yağının patojen bakterilere (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *S. marcescens* ve *E. coli*) karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlar ve defne uçucu yağının kontrol olarak kullandıkları tetrasiklin antibiyotikinden daha güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Moghtader ve ark., 2013).

Çalışmamızda, defne uçucu yağı kontrol olarak kullandığımız meropenem (*S. aureus* 0,06 µl/mL, *E. coli* 0,03 µl/mL) antibiyotikine yakın değerlerde (*S. aureus* 0,19 %v/v, *E. coli*'ye 0,78 %v/v) antibakteriyel etkili bulunurken; kontrol olarak kullandığımız flukonazolden (*C. albicans* 0,25 µl/mL) daha yüksek antifungal etki (*C. albicans* 0,049 %v/v) göstermiştir.

Peixoto ve arkadaşlarının çalışmasında defne uçucu yağının *Candida* spp.'ye karşı antifungal aktivitesinin 250-500 mg/mL MİK değer aralığında bulunduğu bildirilmiştir (Peixoto ve ark., 2017).

El-Sawi ve arkadaşlarının çalışmasında, defne yaprağı uçucu yağının *A. niger*'e karşı antifungal aktivitesinin bulunmadığı bildirilmiştir (El-Sawi ve ark., 2009).

Bizim çalışmamızda da defne uçucu yağının *A. niger*'e karşı antifungal etkisi bulunamamıştır. Ancak incelemeye alınan diğer bakteri ve maya türlerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Bulgularımız gerek ülkemizde yapılan ve gerekse diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Çörek otu yağının antibiyotik dirençli çeşitli klinik bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etkisi değerlendirildiğinde, gram pozitif bakterilere karşı, gram negatif bakterilere göre daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Gholamnezhad ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada, çörek otu yağının *C. albicans*'a karşı da yüksek oranda antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. (Kooti ve ark., 2016).

Çalışmamızda, çörek otu yağının sadece *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Çörek otu yağının MİK değerleri *S. aureus* için 0,1 % v/v, *C. albicans* için 0,19 % v/v olarak bulunmuş ve literatürlerdeki benzer araştırmalarda belirtildiği gibi yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır.

Çörek otu yağı ve bileşenlerinin *S. aureus* ve *E. coli*'e karşı antibakteriyel etkileri araştırıldığında, çörek otu yağının antibakteriyel özelliğinin timokinondan kaynaklandığı belirtilmiştir (Güllü ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada, timokinonun insan patojenik suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesinde gram pozitif bakterilerde 8 ila 32 µg/mL arasında değişen MİK değerleri bulunurken gram negatif bakterilerde MİK > 512 µg/mL değeri tespit edilmiş ve gram negatif bakterilere karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Chaieb ve ark., 2011).

Benzer bir çalışmada ise timokinonun gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı 8-512 µg/mL aralığında MİK değerlerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği ve bazı antibiyotiklerle sinerjik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Mahboubi, 2018).

Timokinonun, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, *S. aureus*'un timokinona yüksek derecede duyarlılık gösterdiği, timokinonun 3 µg/mL dozunun bakteriyostatik, 6 µg/mL dozunun ise bakterisit etki için yeterli olduğu bildirilmiştir. Diğer gram-negatif bakterilerin timokinona karşı daha az duyarlı bulunduğu ve minimum inhibitör konsantrasyonları ile minimum bakterisit konsantrasyonlarının 200 ile 1600 µg/mL arasında olduğu bildirilmiştir (Güllü ve ark., 2013).

Bir başka çalışmada, timokinonun *C. albicans* ATCC 14053 ve *C. albicans* ATCC 1172 suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyon değerleri 50 µg/mL olarak bulunmuştur (Almshawit ve Macreadie, 2016).

Başka bir çalışmada, timokinonun, *A. niger*' in üremesini 2 mg/mL MİK değerinde inhibe ettiği bildirilmiştir (Al-Jabre ve ark., 2003). Benzer bir çalışmada ise timokinonun in vitro olarak *A. niger* ve *Fusarium solani*'yi inhibe ettiği ve antifungal aktivitesinin amfoterisin B ile karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (Al-Jabre ve ark., 2015).

Çalışmamızda, timokinonun *S. aureus* 'a karşı (0,028 µg/mL) antibakteriyel etkisinin *P. aeruginosa* (7 350 µg/mL) ve *E. coli* 'ye (3 675 µg/mL) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bulgularımız timokinonun *S. aureus* 'a karşı kontrol olarak kullanılan meropenemden (0,25 µg/mL) daha fazla antibakteriyel etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, timokinonun antifungal etkisinin ise *C. albicans* 'a karşı (28,71 µg/mL), *A.niger* ' e (3 675 µg/mL) göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Ancak *C. albicans* 'a ve *A. niger* 'e karşı antifungal etkisinin, kontrol olarak kullanılan flukonazol (0,25 µg/mL) ve amfoterisin B'den (1 µg/mL) çok düşük olduğu görülmüştür.

Litertürlerde kateşinlerin *S. aureus* ' a karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Aydın ve ark., 2016).

C. sinensis çay çiçeğinin kimyasal yapısını ve antimikrobiyal özelliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile kateşinin çay çiçeğindeki en yüksek orana sahip fenolik bileşik olduğu bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemiyle bakteri, maya ve küflere karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu gözlemlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı 12,5 mm, *P. aeruginosa* ATTC 10145 suşuna karşı 15,3 mm, *S. aureus* ATTC 25923 suşuna karşı 11,8 mm, *A. niger* ATTC 9642 suşuna karşı 13,0 mm, *Saccaromyces cerevisiae* ATTC 9763 suşuna karşı 14,3 mm inhibisyon zonunda antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Karahalıl ve ark., 2019).

Bir çalışmada, ayrıca kateşinin antibiyotiklerle kombinasyonunun *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisinin kateşinin tek başına olan etkisinden çok daha etkili olduğu belirtilmiştir (Gomes ve ark., 2017).

Kateşinlerin *C. albicans* ' a karşı antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, CLSI standartlarının uygulandığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış ve MİK değerinin 6,25 mg / mL olarak bulunduğu bildirilmiştir (Sitheeque ve ark., 2009).

Çalışmamızda kateşinin *S. aureus* 'a karşı (187,5 µg/mL) *P. aeruginosa* 'ya (24 000 µg/mL) göre daha etkili bir antibakteriyel etkisinin olduğu, ancak *E. coli* 'ye karşı bir antibakteriyel etki göstermediği, *C. albicans* ve *A. niger* 'e karşı ise aynı oranda (12 000 µg/mL) çok düşük düzeyde antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Literatürde uçucu yağların ve fitokimyasalların tek başlarına antimikrobiyal aktivitesini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu bileşiklerin, sentetik koruyucular ve antibiyotikler ile kombinasyonlarının sinerjik etkinliğiyle ilgili çalışmalar olmasına rağmen, bizim çalışmamızda kullandığımız uçucu yağların ve fitokimyasalların kendi aralarında ve uçucu yağlar ile fitokimyasalların birlikte kombine edildiği yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Sharma ve arkadaşları çalışmalarında, tarçın uçucu yağının antimikrobiyal etkisinde önemli yer tutan sinnaldehitin timokinon ile kombinasyonunun *S. epidermidis*'e karşı aditif etkili olduğunu göstermişlerdir (Sharma ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda, tarçın uçucu yağı ve timokinon kombinasyonunun *S. aureus*'a karşı 0,21 FİK indeksi ile sinerjik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı da sinerjik etkili bulunmuştur.

Nikkhah ve arkadaşları, bir dizi uçucu yağların *Penicillium expansum*'a karşı antifungal aktivelerini checkerboard yöntemi ile incelediklerinde, biberiye-mercanköşk ve biberiye-kekik kombinasyonlarının 2,0 FİKİ değeri ile etkisiz, tarçın-biberiye kombinasyonunun 0,75 FİKİ değeri ile aditif, tarçın-mercanköşk kombinasyonunun 0,5 FİKİ değeri ile sinerjik, tarçın-kekik kombinasyonunun ise 0,25 FİKİ değeri ile sinerjik etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Nikkhah ve ark., 2017).

Çalışmamızda biberiye-tarçın uçucu yağ kombinasyonunun *C. albicans*, *A. niger*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı sırasıyla 0,25, 0,5, 0,26, 0,5, 0,25 FİKİ değerleri ile sinerjik etkili olduğu saptanmıştır. Kateşin-timokinon fitokimyasal kombinasyonu ise *C. albicans* ve *A. niger*'e karşı 0,25 FİKİ değerleri ile sinerjik etkili bulunmuştur. Bulgularımız sentetik koruyucu/uçucu yağ kombinasyonları yerine uçucu yağların birbirleriyle kombinasyonlarının kullanılabileceğini göstermektedir.

Gıdalarda, takviyelerde ve farmasötiklerde biyoaktif fitokimyasalların kullanılması, zayıf çözünürlükleri ve düşük stabiliteleri nedeniyle sınırlı kullanıma sahiptir. Fitokimyasal yüklü nanopartiküller veya mikropartiküllerden oluşan fitokimyasal kapsüllerin bu sınırlamayı ortadan kaldıracak şekilde bildirilmiştir (McClements, 2020). Fitokimyasal maddenin bir kaplama materyali ile enkapsüle edilmesi ile bileşenlerin stabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalar mevcuttur (Labuschagne, 2018).

Kitosan asidik koşullarda amino grubunun protonlanması ile katyonik bir özelliğe sahip, toksik olmayan, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen ve antimikrobiyal özellikler göstermesi nedeniyle kozmetik alanında sıklıkla kullanılmaktadır (Cota-Arriola ve ark., 2013; Yang ve ark., 2011).

Zheng ve Zhu'nun çalışmasında, kitosanın konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkisinin arttığı % 1,0 konsantrasyonunda *E. coli* ve *S. aureus* için % 100 inhibisyon oluşturduğu bildirilmiştir (Zheng ve Zhu, 2013).

Benzer sonuçlara sahip başka bir çalışmada ise düşük moleküler ağırlığa sahip kitosanın *E. coli* ve *S. aureus* üremelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Gerasimenko ve ark., 2004).

Jeon ve arkadaşlarının çalışmasında, kitosanın, gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında, gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu, gram pozitif bakterilere karşı MİK değerleri % 0,1'in altında iken, *P. aeruginosa* için % 0,25 olduğu bildirilmiştir (Jeon ve ark., 2001).

Jung ve arkadaşlarının çalışmasında, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın *C. albicans* üzerine antifungal aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Jung ve ark., 1999).

Roller'in çalışmasında, çoğu küf türlerinin % 1,0'den az konsantrasyonlardaki kitosana karşı duyarlı oldukları fakat % 1'in üstündeki konsantrasyonlarda *A. flavus* gibi türleri inhibe edemedikleri gösterilmiştir (Roller, 2003).

Çalışmamızda kaplama materyali olarak kullandığımız kitosan orta moleküler ağırlıklıdır. Literatüre paralel olarak gram negatif ve gram pozitif bakteri türlerine karşı % 1,0 konsantrasyonda antibakteriyel etki göstermiş ve *P. aeruginosa* için 0,5 % v/v, *S. aureus* ve *E. coli* için 0,25 % v/v MİK değerleri bulunmuştur. Yine literatür ile paralel olarak *A. niger*'e karşı %1,0'luk konsantrasyonu etkisiz bulunmuştur fakat Jung ve arkadaşlarının bulgusunun aksine *C. albicans*'a karşı antifungal etki göstermemiştir.

Günümüzde, uçucu yağların sağlık, kozmetik ve gıda gibi farklı alanlarda sayısız uygulamaları vardır ancak doğrudan yüksek ısıya, neme, ışığa veya oksijene maruz kalma nedeniyle yüksek uçuculukları ve düşük stabilite potansiyel kullanımlarını

sınırlamaktadır (Risaliti ve ark., 2019). Uçucu yağların etkili doğal antimikrobialler olduğu ancak oksidasyona duyarlı oldukları ancak mikroenkapsülasyon ile uçucu yağların stabilitesinin artacağı, toksisiteyi azaltacağı ve salınımı kontrol edeceği bildirilmiştir (Makimori ve ark., 2020).

Tarçın (*C. zeylanicum*) uçucu yağının etkili bir antimikrobiyal ajan olduğu bununla birlikte, yüksek uçucu doğası ve düşük stabilitesi nedeniyle verimli bir kapsülleme sistemi gerektirdiği bildirilmiştir (Matshetshe ve ark., 2018).

Hsieh ve arkadaşları limon otu uçucu yağının uçmaması ve kontrollü salınımının sağlanabilmesi için ısıyla salınım gerçekleştirebilen kitosan mikrokapsüller üzerinde araştırma yapmışlar ve kitosan mikrokapsüllerin uçucu yağların stabilizasyonu için kullanılabilceğini bildirmişlerdir (Hsieh ve ark., 2006).

Kitosan nanopartikülü iyonik jelleşme tekniği ile sentezlenmektedir. Toksik etki göstermeyen bir polianyon olan sodyum tripolifosfat (STPP) ile kitosan moleküller arası bağlarla çapraz bağlanarak iyonotropik etkileşim ile kitosan nanopartiküller hazırlanabilmektedir (Antoniou ve ark., 2015). Çalışmamızda kitosan mikro/nano kapsüllerini oluşturmak için günümüzde en çok tercih edilen bu yöntem kullanılmıştır.

Hu ve arkadaşları, yeşil çaydan elde edilen fenolik kateşinin kitosan nanopartiküllerine yüklenmesinin kateşin salınımını uzatabileceğini göstermişler ve kitosan nanopartiküllerinde kateşinin kapsülleme verimliliğinin % 24 ila % 53 arasında olduğunu bildirmişlerdir (Hu ve ark., 2008).

Matshetshe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iyonik jelleşme yöntemi ile tarçın uçucu yağı yüklü kitosan nanopartiküllerin ve tarçın uçucu yağı/ β -siklodekstrin yüklü kitosan nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro salım çalışması değerlendirilmiş ve kitosan nanopartiküllerinin maksimum kapsülleme verimliliği % 58,03 olarak rapor edilmiştir. İn vitro yüzde salım oranları sadece tarçın uçucu yağı yüklü kitosan nanopartiküller için % 71 iken, ikili sistemde % 49 salım oranı olduğu bildirilmiştir (Matshetshe ve ark., 2018).

Çalışmamızda, biberiye-tarçın mikrokapsüllerin enkapsülasyon verimliliği; % 86,7 iken kateşin-timokinon mikrokapsüllerin enkapsülasyon verimliliği; % 67,2 olarak hesaplanmıştır.

Hadidi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kitosan ile kapsüllenmiş karanfil uçucu yağının *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesini tespit etmişlerdir. Karanfil uçucu yağının, kitosan nanopartikülünün ve karanfil uçucu yağı yüklenmiş kitosan nanopartikülünün ayrı ayrı antibakteriyel aktivitesini incelediklerinde, karanfil uçucu yağının kitosanla nanoenkapsülasyonunun saf karanfil uçucu yağına göre daha etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, kitosan nanopartiküllerinin aktivitesinin ise düşük olduğunu belirtmişlerdir (Hadidi ve ark., 2020).

Benzer başka bir çalışmada, kitosan nanopartiküller tarafından kapsüllenmiş karanfil uçucu yağının *A. niger*'e karşı antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Serbest karanfil uçucu yağı 3,0 mg/mL kadar yüksek konsantrasyonlarda *A. niger*' in hif gelişimini tamamen inhibe edemediği fakat kapsüllenmiş karanfil uçucu yağının, 1,5 mg/mL'de küf gelişimini tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Hasheminejad ve ark., 2019).

Kural olarak Polidispersite İndeks (PdI), süspansiyonlardaki partikül boyutu dağılımını incelemek için kullanılır. Daha düşük bir PdI, daha homojen bir partikül boyutu dağılımını gösterir ve sonuç olarak çap homojenliğini yansıtır (Hasani ve ark., 2015).

Hadidi ve arkadaşları yaptığı çalışmada, kitosan ile kapsüllenmiş karanfil uçucu yağının, PdI değerlerini 0,117-0,337 aralığında bulduklarını ve bu verilerin kararlı parçacık popülasyonunun göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (Hadidi ve ark., 2020).

Zeta potansiyeli, dispersiyon, flokülasyon veya agregasyon gibi fenomenlerde önemli bir faktör olan parçacıklar arasındaki elektrostatik veya yük itme/çekme büyüklüğünün bir ölçüsüdür ve dolayısıyla dispersiyonların, emülsiyonların ve süspansiyonların stabilitesini değerlendirmek için önemli bir parametredir (Dickinson, 2009).

Çalışmamızda, biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin PdI değerleri sırasıyla; 0,156 ve 0,291 olarak ölçülmüştür. Literatüre paralel olarak, partiküllerin boyut dağılımının homojen olduğu tespit edilmiştir. Biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin zeta potansiyel değerleri sırasıyla +32,0 ve +35,6 mV olarak ölçülmüştür. Bu veriler parçacıkların homojen olarak dağıldığını göstermektedir. Mikrokapsüllerin kontrollü salınımı gerçekleşmiştir. Biberiye-tarçın

mikrokapsülleri 28. gün sonunda kümülatif salım oranı % 100 iken, kateşin-timokinon mikrokapsülleri 28. gün sonunda kümülatif salım oranı % 78 olarak saptanmıştır.

Krem formülasyonunda koruyucu konsantrasyonunun artışı, antimikrobiyal etkiyi arttırabilir fakat bunun yanında formülasyonun organoleptik, duyuşal ve fizikokimyasal özelliklerini de değiştirebileceği ve alerjik reaksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (Lundov et al., 2009). Birçok sentetik koruyucunun insan sağlığına zararlı olduğu sayısız çalışma ile kanıtlanmıştır (Sandanger ve ark., 2011; Ye ve ark., 2006; Schlumpf ve ark., 2010; Barr ve ark., 2012; Darbre ve Harvey, 2014).

Uçucu yağların antimikrobiyal etkisi üzerine yapılan çalışmalar, sentetik koruyucularla karşılaştırıldığında, gelişmiş güvenilirlik ve daha düşük toksisiteye işaret etmektedir (Hernandes ve ark., 2017).

Kozmetik formülasyonlarda uçucu yağların tek başına ve sentetik maddelerle birlikte koruyucu olarak kullanımına ait çalışmalar bulunmaktadır (Nostro ve ark., 2002; Herman, 2014). Ancak, uçucu yağların/fitokimyasalların birlikte enkapsüle formda gıda, kozmetik, ilaç gibi farklı sektörlerde sentetik koruyucular yerine kullanılabilmesine dair çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Gonçalves ve arkadaşları, kapsüllenmiş kekik yağının keklere uygulanabilen doğal bir gıda koruyucu olarak kullanım potansiyelini değerlendirmek için raf ömrü testleri yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda, 0,60 g kekik yağı yüklenmiş mikropartiküller içeren kekler için minimum 30 günlük raf ömrü elde edildiği bildirilmiştir (Gonçalves ve ark., 2017).

Berber çalışmasında, gıdalarda raf ömrünü etkileyen en önemli etkenlerden birisi olan küflenmeye karşı allisin ve karvakrol mikrokapsüllerin oldukça etkili olduğunu ve günümüzde sıkça kullanılan potasyum sorbata alternatif olarak kullanılabilmesini, aynı zamanda kuersetin, oleuropein ve timol mikro/nanokapsüllerinin gıda, kozmetik, ilaç, tekstil gibi farklı sektörlerde antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilmesini göstermiştir (Berber, 2016).

Chen ve arkadaşlarının çalışmasında, zein/kazein nanopartiküllerine birlikte yüklenmiş öjenol ve timol fitokimyasallarının süt ve süt ürünlerinde oluşan *E. coli* O157:H7 ve *L. Monocytogenes* patojenlerine karşı antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Birlikte kapsüllenmiş öjenol ve timolün, kapsüllenmemiş tek başına

öjenol, tek başına timol ve timol-öjenol kombinasyonuna karşı patojenlerin büyümesini inhibe etmekte çok daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, birlikte kapsüllenmiş öjenol ve timol mikrokapsüllerinin gıda ürünlerinde antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015).

Pinilla ve Brandellin, nisin ve sarımsak ekstraktının birlikte nanolipozom ile kapsüllenmiş formunun sütte gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonuna etkilerini incelemişler ve *S. aureus* için 5 log kob/mL, *L. monocytogenes* için 6 log kob/mL, *E. coli* ve *S. enteritidis* için 3-4 log kob/mL bakteri sayılarında azalma olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada doğal antimikrobiyallerin birlikte kapsüllenmesinin kontrollü salınım açısından gıda kalitesinin ve raf ömrünün iyileştirilmesi için bir alternatif olduğu öngörülmüştür (Pinilla ve Brandelli, 2016).

Kozmetik ürünlerin çoğunda raf ömrünün arttırılması amacıyla koruyucular kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ve epidemiyolojik veriler, kozmetikte kullanılan sentetik koruyucu maddelerin çeşitli istenmeyen yan etkilere yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle kozmetik ürünlerde sentetik koruyucular kadar etkili ancak insan sağlığına zararsız ve doğal koruyucuların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda, sentetik koruyuculara alternatif olarak kullanılmak üzere; çörek otu, tarçın, biberiye, defne uçucu yağlarının, kateşin, timokinon fitokimyasallarının antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde literatürlerdeki bulgularla paralel olarak etkili olduklarını gözlemledik.

Çalışmamızda bu bileşiklerin ikili kombinasyonlarının sinerjik etkileri checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız tüm mikroorganizmalara karşı en fazla sinerjik etki gösteren kombinasyonların biberiye-tarçın uçucu yağı olduğu tespit edilmiştir. Kateşin-timokinon kombinasyonlarının ise mantarlara karşı sinerjik etkili oldukları görüldüğü için her iki kombinasyonun kitosanla mikroenkapsülasyonu yapılmıştır.

Uçucu yağlar ve fitokimyasalların zayıf çözünürlükleri, düşük stabiliteleri, doğrudan yüksek ısıya, neme, ışığa veya oksijene maruz kalma nedeniyle yüksek uçuculukları bunların yaygın kullanımını kısıtlamıştır. Kitosan ile mikroenkapsülasyon yaptığımız biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin antimikrobiyal etki çalışmalarını incelediğimizde; enkapsüle edilmiş formları, enkapsüle edilmemiş

formlarına göre daha etkili olduğu görülmüştür. Biberiye-tarçın mikrokapsülünün MİK değerleri *P.aeruginosa* için 0,463mg/mL, *S.aureus* için 0,116 mg/mL, *E.coli* için 0,231 mg/mL, *C.albicans* için 0,014 mg/mL, *A. niger* için 0,01 mg/mL; kateşin-timokinon mikrokapsülünün MİK değerlerinin ise *C.albicans* için 0,12 mg/mL, *A. niger* için 0,25 mg/mL olduğu saptanmıştır.

Biberiye-tarçın mikrokapsülünün enkapsülasyon verimliliği % 86,7, kateşin-timokinon mikrokapsülünün enkapsülasyon verimliliği % 67,2 olarak; karakterizasyon verileri biberiye-tarçın mikrokapsülü için zeta poteansiyel değeri +32,0 mV, mikrokapsül boyutu 216,6 nm, PDI değerleri 0,156 olarak; kateşin-timokinon mikrokapsülünün zeta poteansiyel değerleri +35,6 mV, mikrokapsül boyutu 507 nm, PDI değerleri ise 0,291 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda her iki mikrokapsülün krem bazında challenge test ile raf ömrü tayini yapılmıştır. Biberiye-tarçın mikrokapsülü krem içerisinde *P.aeruginosa* için 7,52 log kob/mL, *S.aureus* için 7,59 log kob/mL, *E.coli* için 3,93 log kob/mL azalma göstererek, maya için ise üreme artışı yapmayarak raf ömrünü etkili bir şekilde sağlarken, *A. niger* için 28. günde etkisinin azaldığı görülmüştür. Kateşin-timokinon mikrokapsülü ise krem içerisinde *C. albicans* için üreme artışı yapmayarak raf ömrünü etkili bir şekilde sağlarken, *A. niger* için 28. günde etkisinin azaldığı görülmüştür.

Çalışmamızda fenoksietanol-kaprilil glikol koruyucu kombinasyonunu her iki mikrokapsül ile karşılaştırdığımızda, *E.coli*'de 5,10 log kob/mL azalma gerçekleştiği, *A. niger*'de ise 28.günde üreme artışının olmadığı görülmüş ve fenoksietanol-kaprilil glikol kombinasyonunun raf ömrünü diğerlerine göre daha etkili bir şekilde sağladığı saptanmıştır.

Enkapsülasyon yönteminde, oksijen ve sıcaklık gibi olumsuz etkilere karşı koruma sonucunda, uçucu yağlardaki bileşenlerin buharlaşma oranının azaldığı, enkapsüle uçucu yağların, serbest formlarına kıyasla antioksidan aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir (Pan ve ark., 2014; Woranuch ve Yoksan, 2013).

Hadidi ve arkadaşlarının çalışmasında enkapsüle edilmiş karanfil uçucu yağının, serbest karanfil uçucu yağından daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Hadidi ve ark., 2020).

Ghahfarokhi ve arkadaşları, kitosan nanopartikül ile kapsüllenmiş kekik uçucu yağının serbest formuna kıyasla yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Ghahfarokhi ve ark., 2016).

Shetta ve arkadaşları, nane uçucu yağı ve yeşil çay uçucu yağının kitosan ile nanoenkapsülasyonunun antioksidan aktivitesini DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ile araştırmışlardır. IC₅₀ değerlerini serbest nane uçucu yağı için 3,25 mg/mL, kapsüllenmiş nane uçucu yağı için 1,61 mg/mL, serbest yeşil çay uçucu yağı için 0,81 mg/mL, kapsüllenmiş yeşil çay uçucu yağı içinse 0,34 mg/mL bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda, kapsüllenmiş uçucu yağların, serbest formlarına göre iki kat kadar antioksidan aktiviteyi arttırdığını ve tek başına kitosan nanopartiküllerin IC₅₀ değerini ise 116,07 mg/mL olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Shetta ve ark., 2018).

Risaliti ve arkadaşları, biberiye uçucu yağı ve adaçayı uçucu yağı yüklenen lipozom mikrokapsüllerinin antioksidan aktivitesini DPPH yöntemi ile incelediklerinde, serbest uçucu yağlar 5 µl/mL konsantrasyonunda antioksidan aktivite gösterirken, lipozomlara yüklenen uçucu yağların aynı antioksidan aktiviteyi beş kat daha düşük bir konsantrasyonda (1 µl/mL) gösterdiğini belirtmişlerdir (Risaliti ve ark., 2019).

Kailaku ve arkadaşlarının çalışmasında, kitosan ile nanoenkapsülasyonu yapılmış kateşin fitokimyasalının DPPH yöntemine göre yapılan antioksidan aktivitesinin saf kateşine göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Kailaku ve ark., 2014).

Tepe ve Özasan, tarçın (*C. zeylanicum*) uçucu yağının antioksidan aktivitesini araştırdıklarında, önce GC-MS analizi sonucunda, yağın % 99,79'unu temsil eden 22 bileşenden en yüksek içeriğe sahip olan bileşenin e-sinamaldehit (% 81,39) ile e-sinamil asetat (% 4,20) olduğunu bulmuşlardır. Tarçın uçucu yağının ve ana bileşenlerinin FRAP değerlerini tarçın uçucu yağı için $3,98 \pm 0,16$ mM FeSO₄/mg numune; e-sinamaldehit için $1,65 \pm 0,01$ mM FeSO₄/mg numune; e-sinamil asetat için $5,36 \pm 0,01$ mM FeSO₄/mg numune olarak; CUPRAC değerlerini tarçın uçucu yağı için $9,82 \pm 0,06$ mM troloks eşdeğeri/mg numune; e-sinamaldehit için $6,55 \pm 0,03$ mM troloks eşdeğeri/mg numune; e-sinamil asetat için $1,47 \pm 0,03$ mM troloks eşdeğeri/mg numune olarak tespit etmişlerdir. Tarçın uçucu yağının bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesinin her iki ana bileşenden daha yüksek aktivite

gösterdiğini, demir (III) indirgeme antioksidan gücünün ise sadece e-sinamaldehyitten daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Tepe ve Özasan, 2020).

Yaptığımız literatür taramalarında FRAP ve CUPRAC yöntemleriyle ilgili bazı çalışmalar olmakla birlikte, kullandığımız fitokimyasal ve uçucu yağların mikrokapsül formlarıyla ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bizim elde ettiğimiz verilere göre; kateşin-timokinon mikrokapsülünün demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) $84,03 \pm 17,95$ mM FeSO₄/mg numune olarak, enkapsüle edilmemiş serbest kateşin-timokinon ($76,99 \pm 2,26$ mM FeSO₄/mg numune) değerinden daha yüksek bulunurken; biberiye-tarçın mikrokapsülünün demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) $131,81 \pm 6,62$ mM FeSO₄/mg numune değerinde, enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın ($167,27 \pm 11,35$ mM FeSO₄/mg numune) değerinden daha düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda her iki mikrokapsül formu, enkapsüle edilmemiş serbest formlarına göre bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yönünden daha yüksek aktivite göstermiştir. Biberiye-tarçın mikrokapsülü $255,58 \pm 7,14$ mM troloks eşdeğeri/mg numune (enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın $132,34 \pm 2,50$ mM troloks eşdeğeri/mg numune) değerinde; kateşin-timokinon mikrokapsülü ise $248,93 \pm 7,14$ mM troloks eşdeğeri/mg numune (enkapsüle edilmemiş serbest kateşin-timokinon $232,59 \pm 15,52$ mM troloks eşdeğeri/mg numune) değerinde bulunmuştur.

Çalışmamızda DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları Kailaku ve arkadaşlarının (Kailaku ve ark.,2014) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Mikrokapsül formlarının, DPPH radikal süpürücü aktivitesinin enkapsüle edilmemiş hallerinden biraz düşük olduğu görülmüştür. Biberiye-tarçın mikrokapsülü IC₅₀ $0,008 \pm 0,0$ mg/mL (enkapsüle edilmemiş serbest biberiye-tarçın IC₅₀ $0,004 \pm 0,0$ mg/mL) değerinde; kateşin-timokinon mikrokapsülü ise IC₅₀ $0,007 \pm 0,0$ mg/mL (enkapsüle edilmemiş serbest kateşin-timokinon IC₅₀ $0,006 \pm 0,0$ mg/mL) değerinde bulunmuştur.

Sonuç olarak;

Kozmetik ürünlerin mikroorganizma kaynaklı kontaminasyonu tüketici sağlığı açısından önemli risk oluşturmaktadır. Fitokimyasalların ve uçucu yağların antimikrobiyal etkileri ise yüzyıllardır bilinmektedir ve son yıllarda kozmetik alanında

yoğun araştırmalara konu olmaya başlamıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguların ışığı altında kozmetik ürünlerde doğal koruyucu maddelerden kitosan ile kaplı biberiye-tarçın ve kateşin-timokinon mikrokapsüllerinin sentetik koruyuculara alternatif olarak doğal antimikrobiyal koruyucu ve antioksidan olarak kullanılabileceği görüşünde yiz ve kozmetik alanına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

Abdul M, Yassen R. Study of the antibacterial activity of *Nigella sativa* ethanol extract on the growth of *Staphylococcus aureus* in culture media. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*. 2017;8(2):124-130.

Aktaş G. Antibiyotik kombinasyonları ve sinerjistik etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2014;44(2):47-55.

Al Yahya M. Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia [J]. *Fitoterapia*. 1986;57:179-182.

Al-Jabre S, Al-Akloby OM, Al-Qurashi AR, Akhtar N, Al-Dossary A, Randhawa MA. Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. *Pakistan J. Med. Res*. 2003;42(3):185-191.

Aljabre SHM, Alakloby OM, Randhawa MA. Dermatological effects of *Nigella sativa*. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, (2015). 19(2), 92–98.

Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;101(1-3):116–119.

Al-Mariri A, Safi M. In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iran J. Med. Sci*. 2014;39:36–43.

Almshawit H, Macreadie I. Fungicidal effect of thymoquinone involves generation of oxidative stress in *Candida glabrata*. *Microbiological Research*. 2017;195:81–88.

Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci*. 2005;77:266–278.

Andhare M, Rajender M, Dhuldhwaj R. Thymoquinone (*Nigella sativa*): Nature's miracle herb a review. *International Journal of Scientific Research*. 2016;5(7):119-122.

Anelich LE, Korsten L. Survey of micro-organisms associated with spoilage of cosmetic creams manufactured in South Africa. *International Journal of Cosmetic Science*. 1996;18(1):25–40.

Antimicrobial Effectiveness Testing. In: *United States Pharmacopeia*, 32-NF 27, 2009.

Antoniou J, Liu F, Majeed H, Qi J, Yokoyama W, Zhong F. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015;465:137–146.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(26):7970–7981.

Aydın Ç. Denizli İlinde Yayılış Gösteren Bazı Endemik Allium L. Taksonlarının Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antibakteriyal Etkilerinin Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Denizli (Danışman: Prof. Dr. Ramazan Mammadov).

Aydın SA, Üstün F. Tanenler 1 kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 2007;33(1):21-31.

Bal Ç. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması. Flora. 1999;4(4):219-229.

Bardají DK, Reis EB, Medeiros TC, Lucarini R, Crotti AE, Martins CH. Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. Nat. Prod. Res. 2016;30(10):1178-81.

Barr L, Metaxas G, Harbach CAJ, Savoy LA, Darbre PD. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. Journal of Applied Toxicology. 2012;32(3):219–232.

Bayaz M. Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri. Akademik Gıda. 2014;12(3):45-53.

Behravan J, Bazzaz F, Malaekheh P. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. Int J Dermatol. 2005;44(6):482-5.

Benita S. Microencapsulation Methods and Industrial Applications. 2th ed. UK: Taylor & Francis Group; 2005.

Bennett L, Abeywardena M, Burnard S, Forsyth S, Head R, King K. Molecular size fractions of bay leaf (*Laurus nobilis*) exhibit differentiated regulation of colorectal cancer cell growth in vitro. *Nutrition and Cancer*. 2013;65:746–764.

Benzie IFF, Strain JJ. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 1999;15–27.

Berber B. Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğe Sahip Bazı Fitokimyasalların Kitosan İle Mikro/Nanoenkapsülasyonu. M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. N. Cenk SESAL).

Biebl KA, Warshaw EM. Allergic contact dermatitis to cosmetics. *Dermatol Clin*. 2006;24(2):215 – 232.

Birteksöz TSA, Tüysüz M. Kozmetik ürünlerde koruyucu madde kullanımı ve koruyucu etkinlik testleri. *ANKEM Derg*. 2013;27(2):83-91.

Bloomfield SF, Baird R, Leak RE, Leech R. Microbial quality assurance in pharmaceuticals cosmetics and toiletries. *Ellis Horwood Series in Pharmaceutical Technology*. 1998;18(3):92-93.

Bodmeier R, Oh KH, Prammar Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1989;15(9):1475-1494.

Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000;38:43–50.

Booth C. Antimicrobial effectiveness testing validation strategies. *J. GXP Compliance.* 2014;18:1–12.

Bryce DM, Croshaw B, Hall JE, Holland VR, Lessel B. The activity and safety of the antimicrobial agent bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol). *J Soc Cosmet Cherm.* 1978;29:3-24.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science.* 2007;90(6):2580–2595.

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

Castanedo-Tardan MP, Zug KA. Patterns of cosmetic contact allergy. *Dermatologic Clinics.* 2009;27(3):265–280.

Çevikbaş A, Gürer Soyogul Ü, Uğurlu T. Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyal Kontaminasyonu. İçinde: Abbasoğlu U, Çevikbaş A, eds. *Farmasötik Mikrobiyoloji.* 2.Basım. Ankara; Efil Yayınevi; 2015, p:411-418.

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11(1).

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

Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY, Chang ST. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Agric. Food Chem*. 2005;53(18):7274–7278.

Charnock C, Finsrud T. Combining esters of parahydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *J Clin Pharm Ther*. 2007;32(6):567-572.

Chen H, Zhang Y, Zhong Q. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*. 2015;144:93–102.

Cherrat L, Espina L, Bakkali M, García-Gonzalo D, Pagán R, Laglaoui A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. And *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;94(6):1197–1204.

Chung YS, Chung JY, Yang GY, Li C, Meng X, Lee MJ. Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *BioFactors*. 2000;13:73-79.

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

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

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute 950 Wayne, PA (2012).

Costa R, Santos L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*. 2017;322:402–416.

Coşkun F. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2006;(2) 27-33.

Cota-Arriola O, Onofre CRM, Burgos-Hernández A, Marina EBJ, Plascencia JM. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(7), 1525–1536.

Cundell AM, Chatellier S, Schumann P, Lilischkis R. Equivalence of quality control strains of microorganisms used in the compendial microbiological tests: Are national culture collection strains identical?. *PDA J. Pharm. Sci. Technol*. 2010;64:137–155.

Darbre PD, Harvey PW. 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28: 561–578.

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

Darbre PD. Underarm cosmetics and breast cancer. *J Appl Toxicol.* 2003;23(2):89-95.

Davidson PM, Sofos NJ, Branen AL. *Antimicrobials in Foods.* (3.Basım) Boca Raton, FL :CRC Press Taylor&Francis Group. 2005.

Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi.* 2009;3:92-103.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI.* 2004;52: 794-804.

Díaz-Gómez R, Toledo-Araya H, López-Solís R, Obrique-Slier E. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *LWT-Food Science and Technology.* 2014;59(2):896–900.

Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* 2009;23:1473–1482.

Durmuşkahya C, Öztürk M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes in Manisa, Turkey. *Sains Malaysiana*. 2013;42:1431-1438.

El-Sawi SA, Ibrahim ME, Ali AM. In vitro cytotoxic , antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of leaves of *Laurus nobilis* L. Grown in Egypt and its Chemical Composition. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2009; 16-23.

El-Tahir KE, Bakeet DM. The black seed *Nigella sativa* linnaeus - a mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2006;1:1-19.

Erkmen O, Özcan MM. Antimicrobial effects of turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of Medicinal Food*. 2008;11(3):587–592.

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

Essid R, Hammami M, Gharbi D, Karkouch I, Hamouda TB, Elkahoui S, Ferid L, Tabbene O. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains . *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(18):6993–7006.

Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, ElBaroty GSA. Antioxidant activity of some spices essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1989;66(6):792-799.

Firmino DF, Cavalcante TTA, Gomes GA, Firmino NCS, Rosa LD, de Carvalho MG, Catunda Jr FEA. Antibacterial and antibiofilm activities of *Cinnamomum* sp. essential oil and cinnamaldehyde: antimicrobial activities. *The Scientific World Journal*. 2018;1–9.

Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51:116-134.

Fransway AF. The problem of preservation in the 1990s: I. Statement of the problem, solution(s) of the industry, and the current use of formaldehyde and formaldehyde-releasing biocides. *Am J Contact Dermat*. 1991;2:6–23.

Gadkari PV, Balaraman M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*. 2015;93:122–138.

Gao M, Feng L, Jiang T, Zhu J, Fu L, Yuan D, Li J. The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. *Food Control*. 2014;37:1–8.

Genena AK, Hense H, Smânia Junior A, Souza SM. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(2):463-469.

Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, Zueva OYu, Varlamov VP. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microb*. 2004; 40: 253-257.

Ghahfarokhi MG, Barzegar M, Sahar MA, Azizi MH. Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of Thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. *J. Agr. Sci. Tech.* 2016;18:1781–1792.

Gholamnezhad Z, Havakhah S, Boskabady MH. Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: A review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2016;190:372–386.

Ghosh SK. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In: Ghosh SK, eds. *Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation.* 1th ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2006, p:140-142.

Gomes FMS, da Cunha XJ, dos Santos JFS, de Matos YMLS, Tintino SR, de Freitas TS, Coutinho HDM. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. 2018;115:175-178.

Gonçalves ND, Pena FL, Sartoratto A, Derlamelina C, Duarte MCT, Antunes AEC, Prata AS. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Research International.* 2017;96:154–160.

Gökçe Y. Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Zeki Aktaş).

Gölükçü M, Tokgöz H, Turgut YD. Defne (*Laurus nobilis*) uçucu yağ bileşimi üzerine distilasyon süresinin etkisi. *Food and Health.* 2017;4(1):37-42.

Görünmezoğlu Ö. Kayısı ve İncir Meyvelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Aydın (Danışman: Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER).

Groot AC, White IR, Flyvholm M, Lensen G, Menn'e T, Coenraads P. Formaldehyde-releasers in cosmetics: Relationship to formaldehyde contact allergy. Contact Dermatitis. 2010;62(1):2-17.

Güllü EB, Avcı G. Timokinon: *Nigella sativa*'nın biyoaktif komponenti. Kocatepe Veteriner Dergisi. 2013;6(1):51-61.

Gürsoy, AZ. Kontrollü salım sistemleri. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını. 2002. 22-23.

Hadidi M, Pouramin S, Adinepour F, Haghani S, Mahdi JS. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. Carbohydrate Polymers. 2020;116075.

Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Otmani ZB, Boucherit K, Rodrigues AE, Ferreira ICFR, Barreiro MF. Cosmetics preservation: a review on present strategies. Molecules. 2018;23(7):1571.

Hamilton-Miller JM. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(11):2375–2377.

Harvey PW. Discussion of concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 2004;24:307–310.

Hasani M, Elhami, RAH, Hosseini MM, Shahidi NM. Physicochemical characteristic of microencapsulated fish oil by freeze-drying using different combinations of wall materials. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015;12:45–51.

Hasheminejad N, Khodaiyan F, Safari M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry.* 2019;275:113-122.

Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytother. Res.* 2004;18(3): 195-199.

Herman A. Comparison of antimicrobial activity of essential oils, plant extracts and methylparaben in cosmetic emulsions: 2 months study. *Indian Journal of Microbiology.* 2014;54(3):361-364.

Hernandes C, Pina ES, Taleb-Contini SH, Bertoni BW, Cestari IM, Espanha LG, Pereira AMS. Lippia origanoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology.* 2017;122(4):900–910.

Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers.* 2013;95(1):50–56.

Hsieh W-C, Chang C-P, Gao Y-L. Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006;53(2):209-214.

Hu B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Hu B, Zeng X. Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan–Triphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(16):7451–7458.

Hu F, Tu, XF, Thakur K, Hu F, Li XL, Zhang YS, Wei ZJ. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;134,110821.

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

İmamoğlu Ö. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2011;68(4): 215-22.

Jayanudin J, Rochmadi R, Fahrurrozi M, Wiravan SK. Microencapsulation technology of ginger oleoresin with chitosan as wall material: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(12):209-223.

Jeon Y-J, Park P-J, Kim S-K. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym*. 2001; 44:11, 71-76.

Jiang Y, Wu N, Fu Y-J, Wang, Luo M, Zhao C-J, Zu Y-G, Liu X-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011;32(1):63–68.

Jung BO, Kim CH, Choi KS, Lee YM, Kim J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J Applied Polymer Sci* 1999; 72: 1713-1719.

Kailaku SI, Mulyawanti I, Alamsyah AN. Formulation of nanoencapsulated catechin with chitosan as encapsulation material. *Procedia Chemistry*. 2014;9:235–241.

Kamil ZH. Spectacular black seeds (*Nigella sativa*): Medical importance review [J]. *Med J Babylon*, 2013;10(4): 1-9.

Karahalıl FY, Can Z. Investigation of biochemical usefulness of tea (*Camellia sinensis*) flower. *Apiterapi ve Doğa dergisi*. 2019;2(1):21-29.

Keawchaon L, Yoksan R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;84(1):163–171.

Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhavah S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, Tabatabaei M. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60(1):502–508.

Kočevar GN, Lunder M. Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. *International Journal of Cosmetic Science*. 2018;40(3): 276–284.

Koç M, Sakin M, Kaymak EF. Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 2009;16(1):77-86.

Kondo T, Ohta T, Igura K, Hara Y, Kaji K. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. *Cancer Letters*. 2002;180(2):139–144.

Kooti W, Hasanzadeh-Noohi Z, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani M, Ashtary-Larky D. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2016;14(10):732–745.

Kumar A, Singh P, Gupta V, Prakash B. Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils. *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*. 2020; 241-267.

Kunicka-Styczyńska A, Rajkowska K. Physiological and genetic stability of hybrids of industrial wine yeasts *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;110(6):1538–1549.

Labuschagne P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. *Food Research International*. 2018;107:227–247.

Lee SC, Chen CH, Yu CW, Chen HL, Huang WT, Chang YS, Lee TL. Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016;122(3): 263–269.

Lemos MF, Lemos MF, Pacheco HP, Endringer DC, Scherer R. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 2015;70, 41–47.

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.

Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;64:353–367.

Mahboubi M. Natural therapeutic approach of *Nigella sativa* (Black seed) fixed oil in management of Sinusitis. *Integrative Medicine Research*. 2018;7(1):27–32.

Makimori RY, Endo EH, Makimori JW, Zanqueta EB, Ueda-Nakamura T, Leimann FV, Gonçalves OS, Filho BPD. Preparation, characterization and antidermatophytic activity of free- and microencapsulated cinnamon essential oil. *Journal de Mycologie Médicale*. 2020;100933.

Marks JGJ, Belsito DV, DeLeo VA. North American contact dermatitis group patch-test results, 1996–1998. *Arch Dermatol*. 2000;136: 272–273.

Marques A, Teixeira B, Nunes ML. Bay Laurel (*Laurus nobilis*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 2016;239–246.

Matshetshe IK, Parani S, Manki MS, Oluwafemi SO. Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/ chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil, *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;118:676–682.

Miladi H, Slama RB, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against food borne pathogens. *Natural Science*. 2013;05(06):729–739.

Moghtader M. Evaluation of the antibacterial effects of essential oil from the leaves of *Laurus nobilis* L. in Kerman Province. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2013;5(2):13–17.

Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria [J]. *Acta Microbiol Pol*. 2000;49(1):63-74.

Muñiz-Márquez DB, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20:1149–1154.

Murcia MA, Egea I, Romojar F, Parras P, Jiménez AM, Martínez-Tomé M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(7):1872–1881.

Nabavi S, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi S. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*. 2015;7(9):7729–7748.

Nair B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *Int J Toxicol*. 2001;3:23-50.

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

Nasir A, Siddiqui , Mohsin, M. Therapeutic uses of shoneez (*Nigella sativa* linn.) mentioned in unani system of medicine-a review. *Int. J. Pharm. Phytopharmaco. Res*. 2014;4:47-49.

NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

NCCLS. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS document M44-A (ISBN 1-56238-532-1). NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

Nikkhah M, Hashemi M, Habibi, NMB, Farhoosh R. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;257:285–294.

Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Cioni PL, Bader A, Marino A, Alonzo V. Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA. *Letters in Applied Microbiology*. 2002;35(5): 385–389.

Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(12):1807–1813.

Ojeda-Sana AM, Baren CMV, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. Newinsights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 2013;31:189–195.

Olcay H. Kitin ve kitosanın tekstil ve biyomühendislikte uygulamaları. *Fen Bilimleri Dergisi*. 2015;28:63-84.

Olmedo RH, Nepote V, Grosso NR. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT– Food Sci. Tech*. 2013;53:409–417.

Omran SM, Dastjerdi RM, Zuashkiani M, Moqarabzadeh V, Taghizadeh-Armaki M. In vitro antifungal susceptibility of candida species isolated from Iranian patients with denture stomatitis. *BioMed Research International*. 2018;1–6.

Ooi LSM, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC. Antimicrobial activities of Cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *American Journal of Chinese Medicine*. 2006; 34(3):511–522.

Orth DS, Kabara JJ. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. *Cosm. Toil*. 1998;113:51-58.

Önenç SS, Açıkgöz, Z. Tarçın uçucu yağının rumen fermantasyonu üzerine etkileri. *Hayvansal Üretim*. 2011;52(2):63-68.

Özalp M. Kozmetik ürünlerde görülen mikrobiyolojik kontaminasyonlar. *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*. 1998;1(3);167-176.

Özcan MM, Chalchat JC. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2008;59(7-8): 691-698.

Özdemir N. Fesleğen (*Ocimum Basilicum* L.) Uçucu Yağının Püskürterek Kurutma Tekniği İle Mikroenkapsülasyonu Ve Model Üründe Uygulanması. A.Ü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2019, Ankara.(Danışman: Prof. Dr. Ali BAYRAK).

Özseven AG, Çetin ES, Özseven L. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyol. Bul*. 2012;46(3): 410-420.

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

Panza E, Tersigni M, Iorizzi M, Zollo F, De Marino S, Festa C. Lauroside B, a megastigmane glycoside from *Laurus nobilis* (bay laurel) leaves, induces apoptosis in human melanoma cell lines by inhibiting NF- κ B activation. *Journal of Natural Products*. 2011;74:228–233.

Park HJ, Kim MJ, Shin M, Lee JD, Kim JY, Gwak HM, Lee BM. Human health risk assessment of phenoxyethanol in cosmetics. *Toxicology Letters*. 2014;229-133.

Patrakar R, Mansuriya M, Patil P. Phytochemical and pharmacological review on *Laurus nobilis*. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*. 2012;1:595–602.

Patrone V, Campana R, Vittoria E, Baffone W. In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2009;60(4): 237–241.

Paulo F, Santos L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering C*. 2017;77:1327–1340.

Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho F G, Castellano LR, de Castro RD. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*. 2017;73:179–185.

Pereira PS, Maia AJ, Tintino SR, Oliveira-Tintino CDM, Raulino ISS, Vega MC, Silva TG. Trypanocide, antileishmania and cytotoxic activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L in vitro. *Industrial Crops and Products*. 2017;109:724–729.

Peres I, Rocha S, Gomes J, Morais S, Pereira MC, Coelho M. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(1):147-153.

Pérez-Córdoba LJ, Norton IT, Batchelor HK, Gkatzionis K, Spyropoulos F, Sobral PJA. Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocolloids*. 2018;79:544–559.

Pinilla CMB, Brandelli A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2016;36: 287–293.

Pratt MD, Belsito DV, DeLeo VA. North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 2001–2002 study period. *Dermatitis*. 2004;15:176–183.

Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res ClinPract*. 2003;62(3):139-148.

Randhawa MA, Alghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res*. 2002;41(2):77-83.

Rajabi H, Mahdi JS, Rajabzadeh G, Sarfarazi M, Sedaghati S. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019;123644.

Ramos C, Teixeira B, Batista I, Matos O, Serrano C, Neng NR. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*. 2012;26(6):518–529.

Ranasinghe P, Jayawardana R, Galappaththy P, Constantine GVG, N Katulanda. P. Efficacy and safety of ‘true’cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetic Med*. 2012;29:1480–1492.

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

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

Rietschel RL, Fowler JFJ. Allergy to preservatives and vehicles in cosmetics and toiletries. In: Rietschel RL, Fowler JFJ, eds. *Fischer’s contact dermatitis*, 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001, p:211–260.

Risalitia L, Kehagiab A, Daoultzib E, Lazarib D, Bergonzia MC. Vergkizi-Nikolakakis S, Hadjipavlou-Litina D, Bilia AR. Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils: In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:493–498.

Roller S. Chitosan: New food preservative or laboratory curiosity. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press., 2003.

Rúa J, del Valle P, de Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2019;16(9):622-629.

Saab AM, Tundis R, Loizzo MR, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Natural Product Research*. 2012;26:1741–1745.

Saleem M, Bhatti HN, Jilani MI, Hanif MA. Bioanalytical evaluation of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Natural Product Research*. 2015; 29(19):1857–1859.

Salvador A, Chisvert A. *Analysis of Cosmetic Products*. 1st ed. Valencia, Spain: Elsevier Science. 2007.

Salvagnini LE, Migliato KF, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN, Pietro RCLR. Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37:75-77.

Sandanger TM, Huber S, Moe MK, Braathen T, Leknes H, Lund E. Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011;21:595–600.

Sandle T. Antibiotics and preservatives. In: Sandle T, eds. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, 1th ed. Oxford, UK: Woodhead Publishing; 2016, p:171–183.

Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther.* 2004;7(3):251-63.

Scalia S, Mezzena M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009;49:90–94.

Schlumpf M, Kypke K, Wittassek M, Angerer J, Mascher H, Mascher D, Vokt C, Birchler M, Lichtensteiger W. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlorpesticides, PBDEs and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere.* 2010;81:1171–1183.

Schwensen JF, Friis UF, Menne T, Johansen JD. One thousand cases of severe occupational contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2013;68:259-68.

Scientific Committee on Consumer Safety. *The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation.* 9th ed.; SCCS, Ed.; European Union: Brussels, Belgium, 2016; Volume SCCS/1564/15.

Shetta A, Kegere J, Mamdouh W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;126:731–742.

Sharma G, Raturi K, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Herbal Medicine.* 2017;9:68–73.

Silva N, Alves S, Gonçalves A, Amaral JS, Poeta P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International.* 2013;19(6):503–510.

Simon JE, Chadwick AF, Craker LE. *Herbs: An Indexed Bibliography.1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone.* Archon Books, 1984.770 pp., Hamden, CT.

Singh T, Katiyar SK. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE(2) receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2011;6(10):e25224.

Sitheequ MAM, Panagoda GJ, Yau J, Amarakoon AMT, Udagama URN, Samaranyake LP. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against candida species. *Chemotherapy.* 2009;55(3), 189–196.

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

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.

Soylu EM, Kurt S, Soylu S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol*. 2010;143 (3):183–189.

Steinberg DC. Global regulation of preservatives and cosmetic preservatives. *Cosmetic Microbiology*. In: Geis PA, eds. Taylor&Francis Group. New York; 2006.

Stewart SE, Parker MD, Amezcua A, Pitt TL. Microbiological risk assessment for personal care products. *Int. J. Cosmet. Sci*. 2016;38:634–645.

Struszczyk H, Orlikowski BL, Skrzypczak C. Chitosan in the control of soil-borne pathogens. *Chitin Enzymology*. 2001;197-205.

Sudardshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 1992;6(3): 257-272.

Taşkın T. Çakırlı (Bursa - Orhangazi) Yöresinde Yenebilen Bazı Yabani Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Leyla BİTİŞ).

T Cheng, CG Gebelein, Yang VC. Cosmetics and Toiletries. In: T Cheng, CG Gebelein, Yang VC, eds. Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers, 1th ed. New York: Springer US; 1991, p:59-62.

T.C. Sağlık Bakanlığı. Kozmetik Kanunu, Resmi Gazete, Sayı. 5324, (2005).

T.C. Sağlık Bakanlığı. Kozmetik Yönetmeliği, Resmi Gazete, Sayı. 25823, (2005).

Tepe SA, Ozaslan M. Anti-Alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *Industrial Crops and Products*. 2020;145:112069.

Thanekar DR, Dhodi BJ, Juvekar RA. Evaluation of in vitro cytotoxic activity of petroleum ether, methanol and aqueous extracts of Indian bay leaf *Cinnamomum tamala* (BUCH-HAM) T. Nees and Eberm on cancer cells.” *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;3(1):519-533.

Tırnaksız F, Kaymak Y. Kozmetik ürünlere bağlı istenmeyen etkiler. *Dermatose*. 2007;6(1):39-48.

Tokarzewski S, Ziółkowska G, Nowakiewicz A. Susceptibility testing of *Aspergillus niger* strains isolated from poultry to antifungal drugs - a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M 38-A) and Etest® methods. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2012;15(1): 125-133.

Torlak E, Nizamlioğlu M. Doğal antimikrobiyal maddeler ile hazırlanan yenilebilir filmlerin *Listeria monocytogenes* üzerine etkileri. *Vet. Bil. Derg.* 2009;25(1-2):15-21.

Uçar E, Kös EO, Özyiğit Y, Turgut K. Bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2015;10(2):118-124.

US FDA, "GRAS (Generally Recognized As Safe) Food Ingredients: Benzoic Acid and Sodium Benzoate. Washington, DC.US Food and Drug Administration, 1972b.

Veluri R, Weir TL, Bais HP, Stermitz FR, Vivanco JM. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. Journal Of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52:1077–1082.

Wang HC, Hsieh MI, Choi PC, Wu CJ. Comparison of the Sensititre YeastOne and CLSI M38-A2 microdilution methods in determining the activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against *Aspergillus* species. Journal of Clinical Microbiology. 2018;00780–18.

Wang GH. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. J Food Protect. 1992;55(11): 916-919.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of bronopol and its degradation products by HPLC. J Pharm Biomed Anal. 2002;29(1-2):387-392.

Wei F, Jinglou C, Yaling C, Yongfang L, Liming C, Lei P. Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch.etSav.) Ching. J Ethnopharmacol. 2010;130(3):521-28.

Wisuitiprot W, Somsiri A, Ingkaninan K, Waranuch N. In vitro human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract-loaded chitosan microparticles. *International Journal of Cosmetic Science*. 2011;33(6): 572–579.

Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*. 2013;96(2):578–585.

Xu S, Yan F, Ni Z, Chen Q, Zhang H, Zheng X. In vitro and in vivo control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94: 1403–1408.

Yapar EA, Tanrıverdi ST. Yaşlanma karşıtı kozmetik yaklaşımlar ve ürün bileşenleri. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*. 2016;5(2):99-109.

Yap PS, Lim SH, Hu CP, Yiap BC. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*. 2013;20:710–713.

Ye Q, Georges N, Selomulya C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;78:167–179.

Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM.. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ. Health Perspect*. 2006;114: 1843–1846.

Yim E, Baquerizo NKL, Tosti A. Contact dermatitis caused by preservatives. *dermatitis*. 2014;25(5) :215-231.

Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(11):3144–3152.

Zhaveh S, Mohsenifar A, Beiki M, Khalili ST, Abdollahi A, Rahmani-Cherati T, Tabatabaei M. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*. 2015;69:251–256.

Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbonhy Polym* 2003;54:527-530.

Ziosi P, Manfredini S, Vandini A, Vertuani S, Fraternali M. Caprylyl glycol/phenethyl alcohol blend for alternative preservation of cosmetics. *Cosmetics & Toiletries magazine*. 2013;128(8):538-549.

Zoubiri S, Baaliouamer A. Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chem*. 2011;29(1): 179–182.

9. EKLER

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

Uluslararası Bildiriler

Sena Aral, Damla Damar Çelik, Ümran Soyogul Güner. Kozmetik Ürünlerde Kullanılmak Üzere Bazı Fitokimyasallar Ve Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. (Poster Sunumu, PP-193-194). Gevher Nesibe 4. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 23-24 Kasım 2019, Ankara.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Sena	Soyadı	Aral
Doğum Yeri	Kadıköy	Doğum Tarihi	03.09.1994
Uyruğu	T.C.	Tel	0536 747 07 45
E-mail	sena.aral@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2020
Lisans	Marmara Üniversitesi	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1 Biyolog	G.D.A. Gıda Laboratuvar Hizmetleri	06.2020 - Devam ediyor
2 Biyolog	Usturlab Eğitim Danışmanlık	04.2018 - 10.2018
3 Stajyer	Nanomik Biyoteknoloji A.Ş	11.2016 - 01.2018
4 Stajyer	Yeditepe Üniversite Hastanesi	06.2014 - 07.2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
52,50	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,64	75,55	76,94

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi