

Chitosan-Inula Helenium L. Ekstresi Karışımını Kullanarak Doğal Bir Koruyucu Sistemin Geliştirilmesi

DEVELOPMENT OF A NATURAL PRESERVATIVE SYSTEM USING THE MIXTURE OF CHITOSAN-INULA HELENIIUM L. EXTRACT

S.-B. SEO*, C.-S. RYU**, G.-W. AHN**, H.-B. KIM**, B.-K. JO**, S.-H. KIM***, J.-D. LEE**** and T. KAJIUCHI*

*Department of International Development Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, Japan, **R&D Center, Coreana Cosmetic Co. Ltd, 204-1 Jeongchon-Ri, Seonggeo-Eup, Cheonan-Si, Chungnam, 330-830, Korea, ***Department of R&D, Jakwang Co. Ltd, 138 Shinsohyun-Dong, Ansung-Si, Kyonggi-Do, 456-380, Korea and ****Quality Assessment Center, Korea Health Industry Development Institute, 57-1 Noryangin-Dong, Dongjak-Gu, Seoul, 156, Korea

©Seo S.-B., Ryu C.-S., Ahn G.-W., Kim H.-B., Jo B.-K., Kim S.-H., Lee J.-D. And Kajiuchi T. Development of a Natural Preservative System Using the Mixture of Chitosan-Inula Helenium L. Extract. *International Journal of Cosmetic Science* 2002; 24:195-206.

Özet

Bu çalışmanın amacı, zayıf noktaları telafi etmek üzere, chitosanı koruyucu (prezervatif) olarak kullanarak, yeni doğal bir koruyucu geliştirmektir. Daha önceden yayınlandığı üzere (20. IFSCC Kongresi, Cannes, Fransa, 1988), suda çözünebilen chitosanın bakteriler ve mantarlara karşı MIC konsantrasyonu 0.9-3.0 mg/ml iken, *Aspergillus niger*'e MIC değeri 5.0 mg/ml'den fazla imiş. Öte yandan mevcut çalışmada, Inula helenium L. ekstresinin *A. niger*'e karşı MIC'leri 1.0 mg/ml altında olduğu gösterilmiştir. Böylece, hem chitosan, hem de I. helenium L. ekstresini içeren CI-karışımı olarak adlandırılan yeni bir koruyucu sistem geliştirebiliriz. CI-karışımının bakteri ve mantarlara karşı MIC değerleri 2.0-4.0 mg/ml imiş. Karışımın %10'luk hali (chitosanın I. helenium L. ekstresine oranı = %7.5 : %2.5) kozmetik formül halinde, örneğin deri losyonu, süt losyonu, krem ve pack şeklinde uygulanmasıyla, uygun koruyucu etkinliğe ulaşmaktaymış. Patch (yama) testi sonucumuz da, bu koruyucu sistemin deri iritasyonunu %30-50 azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, iyi bir doğal prezervatif (koruyucu) sistem içinde chitosan ile Inula helenium L. ekstresi, kozmetik formüller içinde birleşebilir.

Anahtar Kelimeler: CI karışımı, Inula helenium L. ekstresi, Minimum inhibitör konsantrasyonu, Doğal koruyucular, Suda çözünür chitosan

T Klin Kozmetoloji 2003, 4:40-50

Summary

The aim of this study was to develop a new natural preservative system making up for the weak points of chitosan as a preservative. As reported in a previous manuscript (20th IFSCC Congress, Cannes, France, 1988), the minimum inhibitory concentrations (MICs) of water-soluble chitosan against bacteria and yeast were 0.9-3.0 mg/mL⁻¹, whereas MICs of chitosan against *Aspergillus niger* were over 5.0 mg mL⁻¹. However, the result of recent study showed that the MICs of Inula helenium L. extract against *A. niger* were below 1.0 mg mL⁻¹. Thus, we could develop a new preservative system containing both chitosan and I. helenium L. extract named CI-mixture. MICs of CI-mixture against bacteria and fungi (yeast and mould) were 2.0-4.0 mg mL⁻¹. When 10.0% of the mixture (the ratio of chitosan to I. helenium L. extract = 7.5% : 2.5%) was applied to cosmetic formulae such as skin lotion, milk lotion, cream and pack, it revealed appropriate preservative efficacy. Our result of the patch test also showed that this preservative system reduced skin irritation by about 30-50%, as compared to the organic preservative system. Therefore, the good natural preservative system including chitosan and Inula helenium L. extract could be incorporated in cosmetic formulations.

Key Words: CI-mixture, Inula helenium L. extract, Minimum inhibitory concentration, Natural preservatives, Water-Soluble chitosan

T Klin J Cosmetol 2003, 4:40-50

Chitin (Kitin), yengeçlerin ve karideslerin kabuğunun ekstresiyişi (1,2). Chitosan, kitinin deasetilasyonu ile yapılmış. Kitin ve chitosan tekrarlayan sekanslara sahiptir (kitin: poli (β-(1→4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz), chitosan: poli (β(1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz)) (3). Hem kitin, hem de chitosan non-toksik materyallerdir (4-7). Antimikrobiyal etki (8),

antioksidatif etki, kolesterolü düşürme (9,10), antikanser (11-14) ve immuno-aktif edici (15) gibi çeşitli fonksiyonları vardır.

Öte yandan, kitin ve chitosanın, suda çözünmeme, protein ile koagüle olma, yüksek pH ve yüksek viskozite gibi özelliklerinden dolayı kullanımları sınırlanmıştır. Chitosanın antimikrobiyal aktivitesi ilk olarak Allan ve

Hadwiger (16) tarafından bildirilmiştir ve Kendra ve Hadwiger (17) tarafından netleştirilmiştir. Uchida (18) da aynı zamanda chitosanın antimikrobiyal mekanizmasının, C-2'de glukozaminin mikropların hücre duvarındaki negatif yük ile iyonik bağ oluşturan serbest aminogruplarının (pozitif yüklü) mikrobiyal büyümeyi inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bakterilere karşı chitosanın antimikrobiyal etkileri üzerine daha detaylı açıklama verilecek olursa: 2 çeşit bakteri göz önünde tutulmalıdır, gram negatif ve gram pozitifler (19,20). Öncelikle gram (+) bakteri hücre duvarı tek tabaka içerir, peptidoglikan olarak adlandırılan bu yapı hücre membranı dışındadır, tekrarlayan 2 şeker derivesinden, N-asetilglukozamin ile N-asetilmuramik asitten oluşmaktadır. Tekrarlayan ribitol ile gliserol birimlerini içeren teikoik asitler peptidoglikana tutunurlar. Teikoik asitler, peptidoglikanın D-alanini ile fosfat ester aracılığıyla bağlanmışlardır ve negatif yüklüdürler ve bunlar kısmen hücre yüzeyinin negatif yüklenmesinden sorumludurlar (20). Gr(-) bakterilerin, hücre membranı dışında ince peptidoglikan ve fosfolipidden oluşan 2 katmanı vardır. Lipid ile polisakkarit, dış fosfolipid çift tabakaya bağlıdır, böylece özgül lipopolisakkarit yapıyı oluştururlar. Dıştaki fosfolipid tabaka suda-çözünen fosfat grubuna sahiptir, negatif yüklüdür. Gr(-) bakterinin de hücre yüzeyinin tümü negatif yüklenmiştir (21). İyonik bağlantı, hücre yüzeyinin negatif yükü ve chitosanın pozitif yükü ile oluşturulabilir. Böylece chitosan bakteri agregasyonunu sağlar ve sonuçta bunun varlığında büyüyemezler.

Inula helenium L., uzun ömürlü bir bitki olup 50-100 cm uzunluğundadır. Kore, Çin ve Avrupa kıtasında yayılmıştır. Aktif içerikleri henüz tam belirtilmemiştir. Fakat, I. helenium L.'nin kök ve gövde ekstralarının preservatif aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Yine bunların, anti-inflamatuar etkinliği, kan basıncını düşürücü etkileri ve insektisidal özellikleri (22-24) olduğu gösterilmiştir. Kısmen de olsa bizim sonuçlarımız, I. helenium L. ekstralarının, mantarlar üzerine mükemmel antimikrobiyal etki gösterdikleri

bulunmuştur, ki chitosanın etkisi yoktur. Buna bağlı olarak, chitosan ile I. helenium L. ekstresinin karışımının yeni bir koruyucu sistem halinde olası kullanımını belirttik. Bu, organik koruma sisteminden farklıdır, burada deri iritasyonu olmaksızın mükemmel bir koruyucu aktivite söz konusudur.

Materyal ve Metodlar

Suda-çözünen chitosan

Suda-çözünen chitosan'ın (Chitosan HFP), moleküler ağırlığı 146.000 Da'dır. Deasetilasyon derecesi %90'lardadır ve Jakwang Co. (Kore) tarafından satışa sunulmuştur.

I. Helenium L. ekstresi

Bu ekstre aşağıdaki metod ile hazırlanmaktadır.

a) I. helenium L.'nin kökleri ince dilimler halinde kesilir.

b) Oda ısısında, %70'lik etanolde 5 gün bekletilip süzülür.

c) Filtrat 4°C'de maturasyonun 4. gününde çözülmez materyalleri çöktürülür.

d) 2. filtrasyon uygulanır.

Solüsyon buharlaştırılıp dondurulur, sonuçta katı halde toplanır ve deneylerde kullanılır.

CI-mixture

Chitosan tozu ile I. helenium L. ekstresi tozu 3/1 oranında karıştırıldıktan sonra, bunlar %10 olacak şekilde (w/v) distile suda çözülür (Final konsantrasyon %10) CI karışımında chitosanın final konsantrasyonu %7.5 (w/v) iken I. helenium L. ekstresinin konsantrasyonu %2.5 (w/v) olur.

Suşlar ve besiyeri

5 suş-Gram-pozitif kök bakteriler (S. aureus ATCC 6538P), Gr (-) basil bakteriler (E. coli ATCC 8739, P. Aeruginosa ATCC 9027), maya (C. Albicans ATCC 10231) ve küf (Aspergillus niger ATCC 9642) KCTC (Kore Kültür Tipi Koleksiyonu)'ndan satın alındı. Bakteri üremesi için besinli etsuyu ve besinli agar (Difco) kullanıldı. Mantarlar için PDA (Difco) kullandık ve yine YM agar (%0.3 maya ekstresi, %0.5

pepton, %0.5 malt ekstresi, %1.0 glukoz ve %2.0 agar) kullandık. Bakteriler için kültür ısısı 35-37°C iken mantarlar için 25°C imiş.

Mikrobiyal süspansiyon

A niger kolonisi, 25°C'de PDA plağından 5 günlük inkübasyon sonrasında, %0.05 T-80 içeren PBS ile harmanlandı. Her plağına 10 ml T-80-PBS uygulandı. Plakta kalan miçeller ilmik ile toplandı. A. niger dışındaki bakteri ve mantar süspansiyonu, 5 ml PBS ile ilmiksiz olarak her bakteri ve mantar için yapıldı, bunlar NA ve PDA inokülasyonundan sonra 25°C'de 3. gün ve 37°C'de 2. gün plaklardan elde edildi.

Kağıt Disk (8 mm) metodu

3 materyalin anti-mikrobiyal etkinliği kağıt disk metodu kullanılarak plakta oluşan temiz zon (üreme olmayan çap) tesbit edilerek belirlendi. 3 solüsyondan 50 µl (aktif içeriklerin sonuç konsantrasyonu %10 (w/v) otoklavlanmış kağıt disklere (8 mm çaplı) yüklendi. Nemli fırında 50°C'de 2 saat boyunca kurutuldu. Her suşun 100 µL'lik süspansiyonu bir petri kabında inoküle edildikten sonra, 10 mL NA ile PDA besiyeri 40-45°C'e soğutulup döküldü ve iyice karıştırıldı. Daha sonra katılaştırıldı. Her suşun süspansiyonunun inoküle edildiği agar plaklarına nemli kağıt diskler yerleştirildi. İyi bir

difüzyondan emin olmak için plaklar 4 saat buzdolabında tutuldu. İnkübasyondan 2 gün sonra 35°C'de (bakteriler) veya 3 gün 25°C'de (mantarlar) sonrasında üreme olmayan zon çapları ölçüldü.

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC)

Agar plaklarda, mikrobun üremediği minimum konsantrasyonu tesbit ettik. Bunun için chitosan, I. helenium L. ekstresi ve CI-karışımının çeşitli konsantrasyonları kullanıldı. Bu 3 materyal değişen dozlarda ve 10 ml NA veya PDA besiyeri iyice karıştırılmış ve petri kaplarına dökülmüş. Her besiyerinin katılaştırılmasından sonra 5 suş inoküle edilmiş. Mikrobiyal üreme bakterilerde 48 saatte, mantarlarda 72 saat sonra izlenmiş. Kültür ısısı bakterilerde 37°C iken mantarlarda 25°C imiş.

CI-karışı ile elde edilen formülün koruyucu etkinlik testi (PET)

Formüle edilmiş deri losyonları, süt losyonları, kremler ve paketlerin koruyucu etkinliğini değerlendirmek amacıyla CI-karışımı (%10) %5 (w/v) ve %10 (w/v)'luk olarak sırasıyla ilave edildi (Tablo 1-4). Kültüre edilen mikroplar ile steril PBS (fosfat tamponlu tuz) içinde süspansiyon oluşturuldu. Mikrobiyal süspansiyonun yaklaşık 0.1 mL'si 50 g formül içinde inoküle edilmiş ve 1-28. günler arasında 25°C'de inkübe edilmiş.

Tablo 1. Deri losyonlarının kompozisyonu

Saf materyaller	Dozaj (%w/w)			
	#1	#2	#3	#4
Pantenol	0.20			
Betain	4.00			
Etoksiglikol	0.50			
Metil glukat-20	0.80			
PEG/PPG-17/6 kompolimer	1.00			
Gliserin	1.50			
Etanol	7.00			
Metil paraben (P-M)	0.10	-	-	-
PPG-26 Butet-26 & PEG-40 hidrojenize kastor yağı	0.20			
Koku	0.06			
Laktik asid (%10.0)	0.17		-	-
Saf su	84.47	84.57	79.74	74.74
CI-karışımı (%10.0)	-	-	5.00	10.00
Toplam	100.00	100.00	100.00	100.00

İnokülasyonun 1, 2, 4, 8. ve 24. saatlerinde bakteriyel sayılar (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) tesbit edildi. Mantar ve *E. coli*'nin canlı sayıları 1, 3, 5, 7, 14 ve 28. günlerde sayıldı.

Daha önce tesbit edilen ve kullanılan geçerli dilüsyon bu incelemede de uygulandı. Tamponda koruyucular için deaktivatörler T-80, lesitin ve sodyum tiyosülfat olup şu konsantrasyonlarda kullanıldı, T-80 %6.0, lesitin %0.3, pepton %0.1, NaCl %0.85, Na₂HPO₄ %0.9, %0.14 KH₂PO₄, L-histidin %0.1, sodyum tiyosülfat %0.5 (pH: 7.4).

İnsan patch (yama) testi

Herhangi bir cilt hastalığı veya allerjisi bulunmayan 20 gönüllü (8 bayan, 12 erkek) teste tabi tutulmuş. Yaş aralığı 24-37 (ortalama 29) imiş. Oklusiv yamalar, ön kol %70'lik etanol ile silinip temizlendikten sonra Finn chamber (Epitest Ltd Oy. Finlandiya) kullanılarak cilde yerleştirildi. Bunlar 24 saat sonrasında çıkartıldı ve test bölgeleri, 30. dakika, 24. ve 48. saatlerde, Uluslar arası Kontakt Dermatiti Araştırma Grubu (ICDRG)

tarafından belirlenen standartlar doğrultusunda, iritasyon varlığı yönünden değerlendirildi (24). Deri iritasyon potansi aşağıdaki skor ile değerlendirildi.

$$\text{Ortalama Skor} = \frac{\text{Grade} \times \text{Cevap sayısı} \times 100 \times (1/3)}{3 (\text{maksimum grade}) \times 20 (\text{toplam olgu})}$$

Grade	Skor	
-	0	Reaksiyon yok
±	0.5	Zayıf pozitif reaksiyon (eritem)
+	1	Orta pozitif reaksiyon (eritem)
++	2	Güçlü pozitif reaksiyon (eritem, ödem)
+++	3	Ağır pozitif reaksiyon (eritem, ödem, vezikül)

Sonuçlar ve Tartışma

Kağıt disk (8 mm) metodu

Chitosan, *I. helenium L.* ekstresi ve CI-karışımının antimikrobiyal etkinlikleri, kağıt disk metodu aracılığıyla disk etrafında temiz bir zonun

Tablo 2. Süt losyonları kompozisyonu

Saf materyaller	Dozaj (%w/w)			
	#1	#2	#3	#4
Gliserin	4.00			
Disodyum EDTA	0.02			
Metil paraben (P-M)	0.20	-	-	-
Poligliserin-3 metilglukoz distearat	1.55			
Gliseril stearat & PEG-100 stearat	0.50			
Gliseril stearat	0.50			
Setearil alkol	0.40			
Kolesterol & behenil & oktildodesil loroil glutamat	0.40			
Hidrojenize desil olivat	0.60			
Kaprilik/kaprik trigliserit	4.00			
Skualan	3.00			
Etoksidiğlikol oleat	2.00			
Meadowfoam seed oil	2.70			
Dimetikon	0.50			
Siklometikon	1.50			
İmidazolinil üre	0.30	-	-	-
Poliakrilamid & C13-14 İzoparafın & Loret-7	0.60			
Sitrik asit (%10.0)	0.20			
Potasyum hidroksid (%10.0)	-	-	0.50	
Koku	0.20			
Saf su	76.83	77.33	72.03	67.03
CI-karışımı (%10.0)	-	-	5.00	10.00
Toplam	100.00	100.00	100.00	100.00

Tablo 3. Kremlerin bileşimi

Saf materyaller	Dozaj (%w/w)			
	#1	#2	#3	#4
Gliserin	4.00			
Disodyum EDTA	0.02			
Metil paraben (P-M)	0.20	-	-	-
Poligliseril-3 metilglukoz distearat	1.55			
Gliseril stearat & PEG-100 stearat	0.50			
Gliseril stearat	0.50			
Setearil alkol	1.00			
Kolesteril & behenil & oktildodesil loroil glutamat	0.50			
Hidrojenize desil olivat	1.50			
Kaprilik/kaprik trigliserit	4.00			
Skualan	3.00			
Etoksidiglikol oleat	2.00			
Meadowfoam seed oil	2.70			
Dimetikon	0.50			
Siklometikon	1.50			
İmidazolinil üre	0.30	-	-	-
Poliakrilamid & C13-14 Izoparafın & Loret-7	0.80			
Sitrik asit (%10.0)	0.20			-
Potasyum hidroksid (%10.0)	-	-	0.50	
Koku	0.20			
Saf su	75.03	75.53	70.23	65.23
CI-karışımı (%10.0)	-	-	5.00	10.00
Toplam	100.00	100.00	100.00	100.00

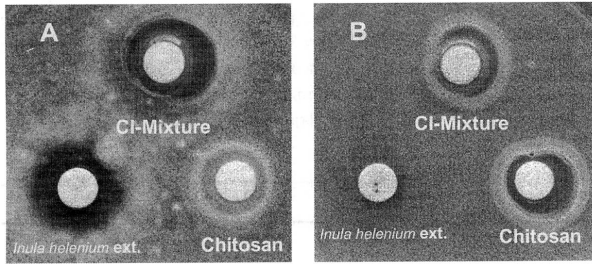
Tablo 4. Pack bileşimi

Saf materyaller	Dozaj (%w/w)			
	#1	#2	#3	#4
Patenol	0.20			
Gliserin	6.00			
Poligliseril metakrilat/propilen glikol	8.00			
Sakkarid izomerat	2.50			
Carrageenan	1.80			
Akrilatlar/C16-30 akrilat krospolmer (%2.0)	20.00			
Etanol	2.00			
Metil paraben (P-M)	0.20	-	-	-
PPG-26 Butet-26 & PEG-40 hidrojenize kastor yağı	0.08			
İmidazolinil üre	0.20	-	-	-
Potasyum hidroksid (%10.0)	1.55			1.63
Koku	0.06			
Saf su	57.41	57.81	52.81	47.73
CI-karışımı (%10.0)	-	-	5.00	10.00
Toplam	100.00	100.00	100.00	100.00

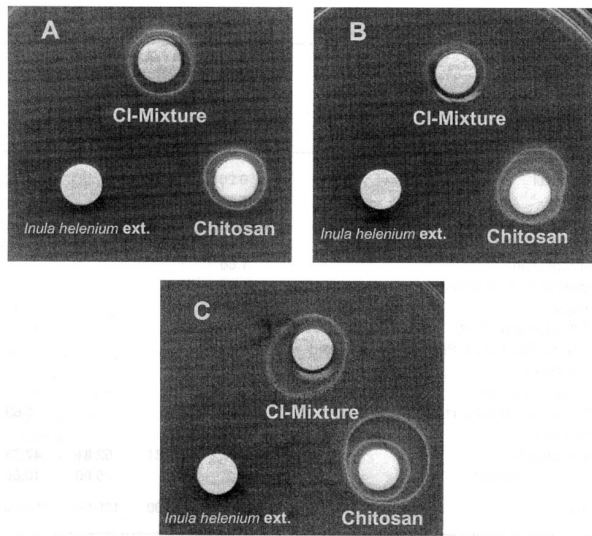
(üreme olmayan bölgenin) değerlendirilmesiyle tesbit edilmiş. Sonuçlar Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Şekil 1'de izlendiği gibi A. niger üremesi chitosan ile inhibe olmazken I. helenium L. ekstresi ile net bir zon oluşumu mevcuttur.

İlaveten, A. niger kısmen I. helenium L. ekstresi zonunda üreme gösterirken, CI karışımında tam olarak inhibe olmuştur. Bu da her ikisini de içeren CI-karışımının sinerjistik bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ifade etmektedir.



Şekil 1. İki çeşit mantarın, CI-karışımı, Inula helenium ekstresi ve chitosan ile oluşan inhibisyon zonu. A; Aspergillus niger ATCC 9642. B; Candida albicans ATCC 10231.



Şekil 2. CI-karışımı, Inula helenium L. ekstresi ve chitosan ile 3 tip bakteride oluşan inhibisyon zonu. A; E. Coli ATCC 8739. B; P. Aeruginosa ATCC 9027. C; S. aureus ATCC 6538P.

Şekil 1 ve 2’de izlendiği gibi, chitosan ve CI-karışımı *C. albicans* ve *S. aureus* organizmalarınca net bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bizim düşüncemize göre bu olay chitosanın antimikrobiyal aktivitesine bağlı olmaktadır. Biz, *E. coli* ve *P. aeruginosa* da net bir zon oluşumu izleyemedik.

Minimum inhibitör konsantrasyonu

Test edilen 5 suş içinde chitosanın *A. niger* dışındaki 4 suş hariç, MIC’leri 2.0-3.0 mg/ml imiş (Tablo 5). Tablo 5’de, I. helenium L. ekstresinin *S.*

aureus, *P. aeruginosa* ve *A. niger*’e MIC’leri 5.0-40.0 ve 1.0 mg/ml (sırasıyla) olduğu gösterilmiş. CI-karışımının 5 suşa karşı MIC’leri 2.0-4.0 mg/ml’dir. Dolayısıyla, kozmetik ürünlerin korunmasında chitosan ile I. helenium L. ekstresi karışımının kullanılması, mükemmel bir koruyucu (prezervatif) etkinliğe sahiptir.

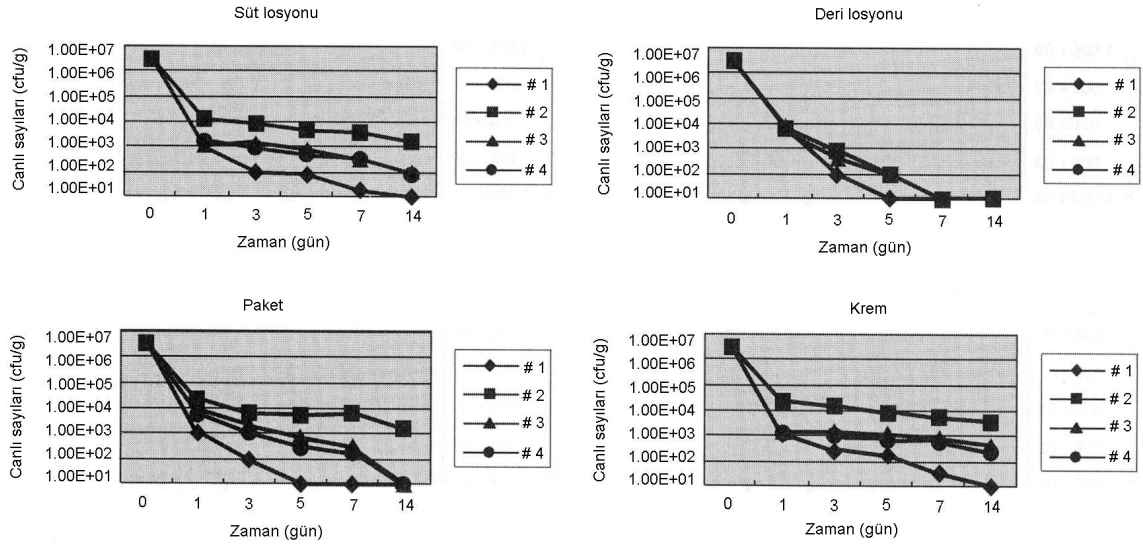
CI-karışımını içeren formülün koruyucu etkinliği

CI-karışımı, süt losyonu ve krem şeklinde emülsiyon formülü olarak mükemmel bir koruyucu etkinliğe sahiptir. Özellikle, chitosanın tek başına etkisiz olduğu *A. niger*’e karşı I. helenium L. ekstresiyle karışımı çok iyi koruyucu etkinlik göstermektedir (Şekil 3). Chitosanın koruyucu etkisi tesbit edildikten sonra, sonucu daha önceden yayınlanan poster ile doğruladık (20. IFSCC Kongresi, Cannes, Fransa, 1998). Chitosanın zayıf noktasını telafi etmek amacıyla (küfe karşı etki, bakterilere olandan daha zayıftır). I. helenium L. ekstresini seçtik ve MIC testi yardımıyla bunu test ettik.

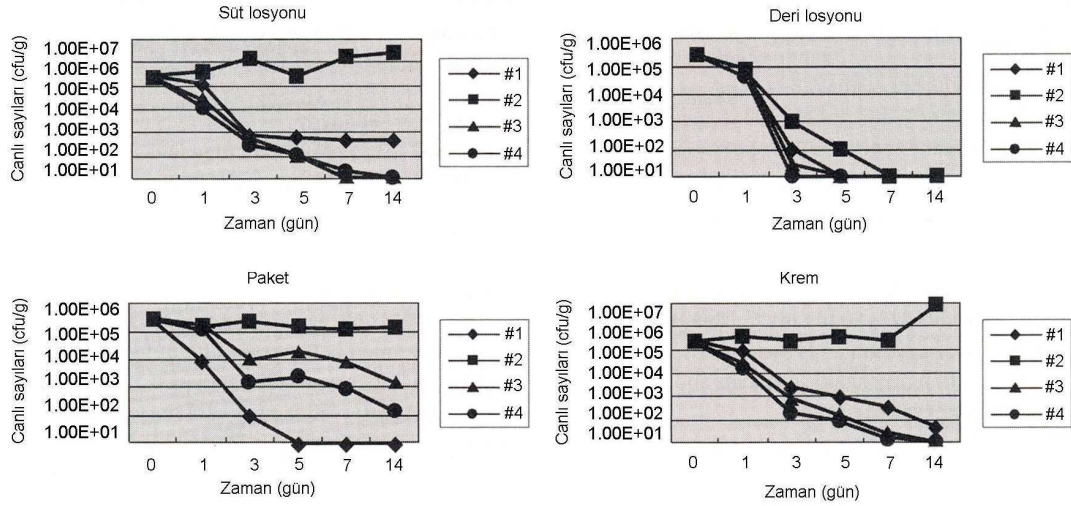
%10’luk CI-karışımı olan formülün *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’ya karşı koruyucu etkinliği, organik koruyucuları içeren formüllerden çok daha iyidir (Şekil 6,7). Buna ilaveten, %5 CI-karışımını (%10’luk) içeren formülün, *C. albicans*’a karşı koruyucu etkinliği, organik koruyucular içeren formüllere göre daha etkilidir (Şekil 4). *C. albicans* ve *S. aureus* patojenik mikroorganizmalardır. *C. albicans*, kadınlarda vajinit yapan organizma olarak ve *S. aureus* da atopik dermatitle ilişkili organizma olarak bilinmektedir. Chitosanın, bu 2 suşa karşı mükemmel bir koruyucu etkinliği tesbit

Tablo 5. Chitosan, I. helenium L. ekstresi ve CI-karışımının (mg/ml) MIC değerleri

Suşlar	Chitosan	I. helenium L. ekstresi	CI-karışımı
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	1.0-2.0	4.0-5.0	1.0-2.0
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2.0-3.0	>60.0	1.0-2.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2.0-3.0	30.0-40.0	1.0-2.0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1.0-2.0	>70.0	2.0-3.0
<i>A. niger</i> ATCC 9642	>5.0	0.0-1.0	3.0-4.0



Şekil 3. Çeşitli kozmetik formüllerinde *A. niger* ATCC 9642'nin sövri küri. Koruyucu formüller #1: organik prezervatifler (süt, losyon, krem, p-M %0.2 imidazolidinyl üre %0.03, deri losyonu P-M %0.1, pack: P-M %0.2, imidazolidinyl üre %0.2) #2: prezervatif olmayan #3: CI karışımı 5.0 #CI karışımı %10.



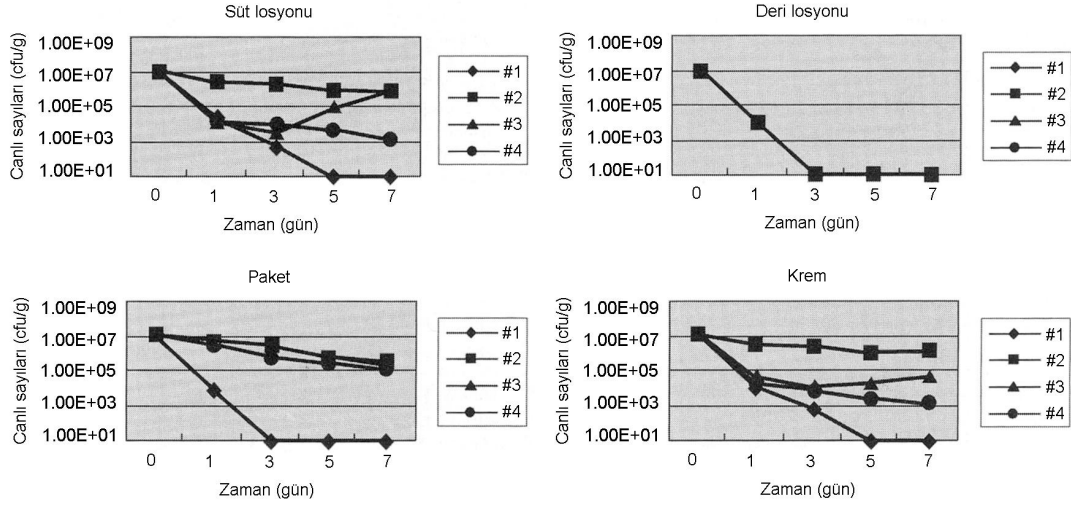
Şekil 4. Çeşitli kozmetik formüllerinde *Candida albicans* ATCC 10231'in sövri küri. Koruyucu formüller #1: organik prezervatifler (süt, losyon, krem, p-M %0.2 imidazolidinyl üre %0.03, deri losyonu P-M %0.1, pack: P-M %0.2, imidazolidinyl üre %0.2) #2: prezervatif olmayan #3: CI karışımı 5.0 #CI karışımı %10.

edilmesiyle, CI-karışımının kadın hijyen ürünleri, akne için kozmetikler, atopi ve benzeri durumlarda antimikrobiyal etkilerinden dolayı değerli olabileceği belirtilmiştir.

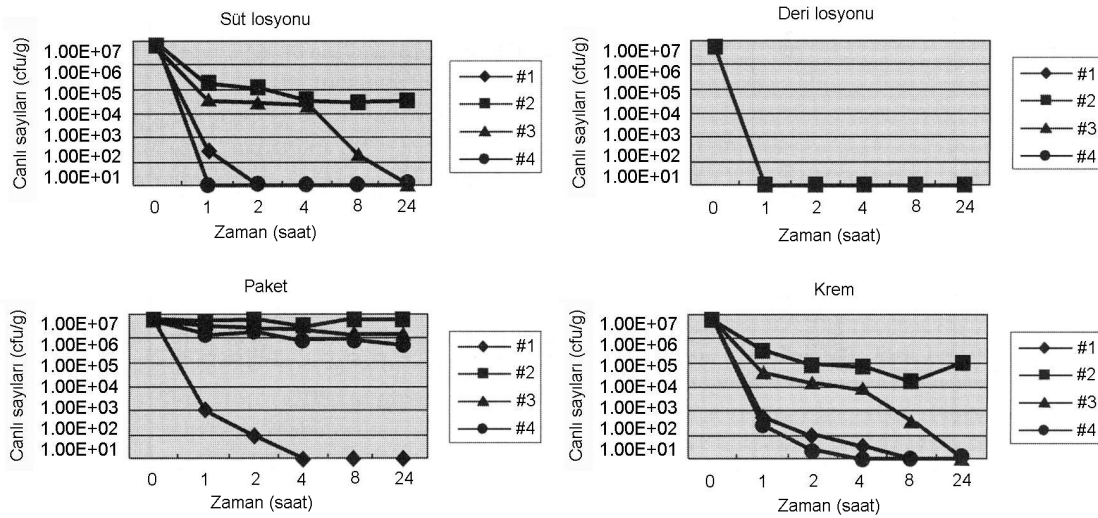
CI-karışımından (%10) %5 içeren formül *E. coli*'ye karşı korumada başarısız olmuştur fakat %10 içeren CI-karışımı (%10) başarılı bulunmuştur (Şekil 5). CI-karışımının paket

formülü tatmin edici değildir, ki bu da chitosanın bazı polimerlere bağlanması ve pack formülünü inaktive etmesine bağlanmıştır.

Deri losyonu %7.0'lik etanol içerir ve Şekil 3-7'de gözlemlendiği gibi uygun antimikrobiyal aktivite gösterebilir. Öte yandan bu, deri losyonlarının koruyucu sistemlere ihtiyaç duymadıkları anlamına gelmez. Bu çalışmada her suşu ayrı ayrı inoküle



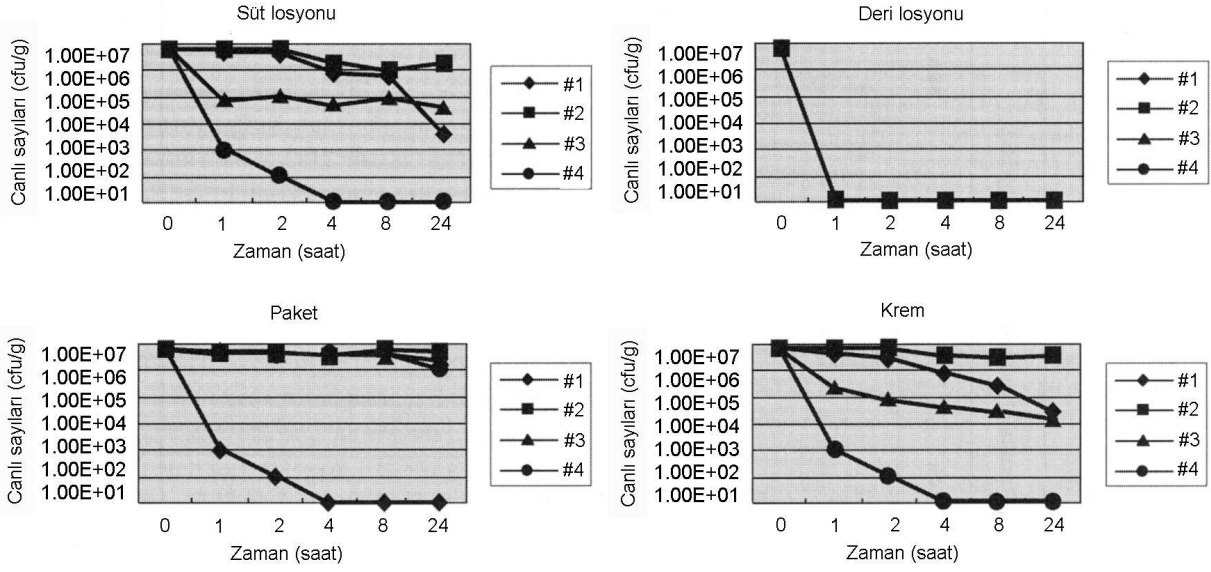
Şekil 5. Çeşitli kozmetik formüllerinde *Escherichia coli* ATCC 8739'un sövri küri. Koruyucu formüller #1: organik prezervatifler (süt, losyon, krem, p-M %0.2 imidazolidinyl üre %0.03, deri losyonu P-M %0.1, pack: P-M %0.2, imidazolidinyl üre %0.2) #2: prezervatif olmayan #3: CI karışımı 5.0 #CI karışım %10.



Şekil 6. Çeşitli kozmetik formüllerinde *Psedumonas aeruginosa* ATCC 9027'nin sövri küri. Koruyucu formüller #1: organik prezervatifler (süt, losyon, krem, p-M %0.2 imidazolidinyl üre %0.03, deri losyonu P-M %0.1, pack: P-M %0.2, imidazolidinyl üre %0.2) #2: prezervatif olmayan #3: CI karışımı 5.0 #CI karışım %10.

ettik. Her ne kadar tüm suşların karışık inokulanları çeşitli koruyucu sistemler ve kontrolleri arasında farklar açısından kıyaslama yapılmadıysa da, multifonksiyonel materyal olarak CI-karışımı, chitosanın güçsüz (küfe karşı zayıf koruyucu etki) etkisini telafi etmek ve diğer fonksiyonu için (burada bahsedilmedi) kullanıldı.

Sonuçlarımızı CTFA veya USP standartları ile kıyasladığımızda bu standartlarla genelde örtüştü. Her ne kadar *E. coli* için 7. mantarlar için 14. günde sonuçlar alındıysa da, sonuçlar 28. günde tamamlandı. *S. aureus* ile *P. aeruginosa* sadece 24. saatte değerlendirildiğinden kıyaslama gücü. Bunun yanında tüm formüller (pack hariç) kriterleri tam içerdi. *E. coli* olgusunda tüm formüller, prezervatif



Şekil 7. Çeşitli kozmetik formüllerinde *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P'nin sörvü küri. Koruyucu formüller #1: organik prezervatifler (süt, losyon, krem, p-M %0.2 imidazolidinyl üre %0.03, deri losyonu P-M %0.1, pack: P-M %0.2, imidazolidinyl üre %0.2) #2: prezervatif olmayan #3: CI karışımı 5.0 #4: CI karışımı %10.

Tablo 6. Çeşitli formülasyonlarla insan patch testi sonuçları

Değerlendirme sonuçları (olgu numaraları)	24. saat				48. saat				72. saat				Ortalama skor (n=20)	Değerlendirme	Grade	
	±	+	++	+++	±	+	++	+++	±	+	++	+++				
Süt losyonu																
#1	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	Hafif iritasyon	II
#2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.28	İritasyon yok	I
#3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.56	İritasyon yok	I
#4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.56	İritasyon yok	I
Deri losyonu																
#1	3	1	-	-	2	1	-	-	2	-	-	-	-	3.06	Güçlü iritasyon	IV
#2	2	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1.94	Hafif iritasyon	II
#3	2	1	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	2.22	Orta iritasyon	III
#4	2	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1.94	Hafif iritasyon	II
Krem																
#1	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	Hafif iritasyon	II
#2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.56	İritasyon yok	I
#3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.56	İritasyon yok	I
#4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	İritasyon yok	I
Pack																
#1	3	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1.94	Hafif iritasyon	II
#2	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	İritasyon yok	I
#3	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	İritasyon yok	I
#4	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	Hafif iritasyon	II

içermeyen ve CI-karışımının %5'liği hariç, standartlarla kıyaslanabilir durumdaydı.

Global olarak, %10 CI-karışımı içeren (aktif kısım=%1.0) formül CTFA veya USP standartlarını yerine getirdi. Bu da, final kozmetik

ürünlerinde %10 CI-karışımı birleşimine izin vermektedir.

İnsan patch testi

Bu test, organik koruyucuları içeren formüller ile CI-karışımını koruyucu sistem olarak kullanan

formüllerin deri irritasyon etkilerini kıyaslamak amacıyla uygulandı. Sonuçlar 24. 48 ve 72. saatlerde ortalama görsel vizüel skorlar halinde değerlendirilmiş. Deri irritasyon potenslerini değerlendirmek amacıyla iritanlık skorları 5 gruba ayrılmış, 0-0.99 (grade I, irritasyon yok), 1.0-1.99 (grade II, hafif irritasyon), 2.0-2.99 (grade III orta düzeyde irritasyon), 3.00-4.99 (grade IV güçlü irritasyon) ve 5.00 (grade V ağır irritasyon). Deri testinde süt losyonu, deri losyonu, krem ve pack örnekleri kullanılmış.

Her formülasyon, 4 çeşit formülden oluşmaktaydı. Formül #1-4 içinde organik prezervatif, prezervatif içermeyen, %5 CI karışımı içeren ve %10 CI-karışımı koruyucu ajan olarak bulunmaktaydı. Tablo 6'da patch testi sonuçları çeşitli formülasyonlar için belirtilmekte. Tablo 6'da ortalama skor azalması her formülasyon için belirtilmekte. Toplamda CI-karışımını içeren formülasyonun ortalama skorlarında organik koruyucu içerenlere göre %30-50 azalma oldu. Buna göre, CI-karışımının daha az iritan potense sahip yeni hafif kozmetiklerin gelişmesinde değerli olabileceği, organik koruyuculara göre daha yardımcı olabileceği beklenebilir.

Sonuçlar

MIC'ler üzerine yaptığımız çalışma, chitosanın bakteri ve mantarlara karşı oluşan MIC'lerin düşük olduğunu vurgulamıştır, A. niger'e karşı MIC yüksektir. Öte yandan, I. helenium L. ekstresinin A. niger'e karşı MIC'lerinin düşük olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Bu nedenle, hem chitosan hem de I. helenium L. ekstresini içeren, CI-karışımı olarak adlandırılan yeni bir koruyucu sistem geliştirilebilir. Bakteri ve mantarlara (maya ve küf) karşı CI-karışımının MIC'leri iyileştirici görünmektedir. CI-karışımı, süt losyonu, deri losyonu, krem ve pack halinde kozmetik formül halinde tanımlandığında, koruyucu etkinlik göstermiştir. İnsan patch testi sonuçlarımızda görüldüğü gibi CI-karışımı ile deri irritasyon etkisi diğer organik prezervatif içerenlerle kıyaslandığında %30-50 azalma göstermektedir. Bu etkiler 4 çeşit formülde de bulunmaktaydı. Dolayısıyla CI-karışımı hafif

kozmetikler içinde bulunduğu organik prezervatiflere göre daha yardımcı olabileceği umulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Muzzarelli RAA. In Chitin. Pergamon Press, New York, 1977: 1.
2. Muzzarelli RAA. Natural Chelating Polymers. Pergamon Press, Oxford, 1973.
3. Rouget C. Comp Rend 1859; 48:792.
4. Jeong HJ, Koo HN, Oh EY, Chae HJ, Kim HR, Suh SB, Kim CH, Cho KH, Park BR, Park ST, Lee YM and Kim HM. Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor- κ B activation. Int J Immunopharmacol 2000; 22:923-33.
5. Tokura S, Itoyama K, Nishi N, Nishimura S, Saiki I and Azuma I. Selective sulfation of chitin derivatives for biomedical functions. J Macromol Sci Chem. Part A: Pure Applied and Chemistry 1994; 31:1701-81.
6. Araki K, Kinumaki T and Fujita T. Toxicity of chitosan. Bull Tokai Reg Fish Res Lab 1969; 337:89-94.
7. Meda M, Murakami H, Ohta H and Tajima M. Biosci Biotech Biochem 1992; 56:427.
8. Amako K, Shimodori S, Imoto T, Miyake S and Umeda A. Appl Environ Microbiol 1987; 53:608.
9. Sugano M, Yoshida K, Hashimoto M, Enomoto K and Hirano S. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans in rats: In: Advances in Chitin and Chitosan. Proceedings from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan (CJ Brine, PA Sanford and JP Zikakis, eds). Elsevier, London, 1992: 472-8.
10. Maezaki Y, et al. Biosoci. Biotechn Biochem 1993; 57:1439.
11. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki L, Tokura S and Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. Vaccine 1984; 2:93-9.
12. Nishimura K, Ishihara C, Ukei S, Tokura S and Azuma I. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. Vaccine 1986; 4:151-6.
13. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S and Suzuki M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexasoe and chitohexasoe against Meth-A solid tumor. Chem Pharm Bull 1988; 36:784-90.
14. Tokoro A, Kobayashi M, Tatewaki N, Suzuki K, Okawa Y, Mikami T, Suzuki S and Suzuki M, Protective effect of N-acetyl chitohexose on Listeria monocytogenes infection in mice. Microbiol Immunol 1989; 33:357-65.
15. Suzuki K, et al. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexasoe and chitohexasoe. Carbohydr Res 1986; 151:403.
16. Allan CR and Hadwiger LA. Exp Mycol 1979; 3:285.
17. Kendra DF and Hadwiger LA. Exp Mycol 1984; 8:276.
18. Uchida Y. Anti-microbial activity of chitin and chitosan. Food Chem 1988; 2:22-8.
19. Stanier RY, Adelberg EA and Ingraham J, eds. The Microbial World, 4th ed. Prentice Hall Inc. 1987.

20. Brock TD, Smith DW and Madigan MT, eds. Biology of Microorganisms, 4th ed. Prentice-Hall Inc. 1984.
21. Stryer L, ed. Biochemistry, 3rd ed. WH Freeman and Company, New York, 1988.
22. Kim TJ. Korean resources plants, Seoul Natl University Press, Seoul, (In Korean), 1996: 4:207.
23. Yan X, et al. Traditional chinese medicines. Ashgate 1999; 700.
24. Lachapella JM, ed. Textbook of Contact Dermatitis. Springer-Verlag, London, 1992.
25. Wenninger JA, Canterbury RC and McEwen GN, eds. International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 8th ed. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Washington, DC, 2002.

**Orijinal İngilizce şeklinden Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir. Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.*