

REPORT CHALLENGE TEST METODO ISO 11930:2012

COD. LAB.: 1907301

Data emissione: 30/08/2019

Rev. 0

Challenge test

Valutazione “*in vitro*” del sistema preservante di un prodotto cosmetico in base al metodo ISO 11930:2012, secondo il Regolamento 1223/2009

According the European Regulation 1223/2009 the “in vitro” evaluation of the preservative system in cosmetic products by the method ISO 11930:2012.

Committente / Customer:

INNOVARES S.R.L.

Via Risorgimento, 5/b
42049 Sant’Ilario d’Enza (RE) – Italy

PRODOTTO / PRODUCT:

**OZONIA3000 OZONATED SUNFLOWER SEED OIL
LOTTO 18606**

Data ricevimento campione / *Reception date:* 31/07/2019

Periodo di analisi: *Period of analysis:*

Data inizio analisi / *Date of testing:* 31/07/2019

Data fine analisi / *End Date test:* 28/08/2019

**CHALLENGE TEST:
METODO ISO 11930:2012
DELL'EFFICACIA PRESERVANTE**

1-SCOPO

Verificare "in vitro" l'efficacia del sistema di conservazione e, quindi, la stabilità microbiologica di formulazioni cosmetiche entro un determinato intervallo di tempo, in base al Regolamento Europeo 1223/2009.

Il Challenge test è eseguito secondo il metodo ISO (International Organization for Standardization) 11930:2012.

La valutazione complessiva della protezione antimicrobica comprende le caratteristiche chimiche del sistema conservante, ma anche la tipologia della formulazione, il packaging e il processo di fabbricazione (norme GMP).

2-CRITERI DI ACCETTABILITÀ: CRITERIO A e B METODO ISO 11930:2012

Il campione in esame deve presentare attività inibente nei confronti dei microrganismi utilizzati secondo i criteri di accettabilità secondo i criteri di accettabilità del metodo ISO come riportato nella tabella B.1:

**CHALLENGE TEST:
ISO 11930 Method : 2012 OF THE
EFFICACY PRESERVATIVE**

1-SCOPE

According to the European Regulation 1223/2009 the "in vitro" evaluation of the effectiveness of the preservative system and, therefore, the microbiological stability of the cosmetics formulation.

The Challenge test is performed by ISO (International Organization for Standardization) method 11930:2012.

This evaluation of the antimicrobial protection comprises chemical preservation, but also the characteristics of the formulation, the packaging and the manufacturing process (GMP).

2-ACCEPTANCE CRITERIA: A and B CRITERION

METHOD ISO 11930: 2012

According to the criteria of acceptability of the ISO method the specimen was tested for the preservative efficacy testing against the microorganisms as described in the following table B.1:

Table B.1 — Evaluation criteria

Log reduction values ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) required ^a								
Micro-organisms	Bacteria			C. albicans			A. brasiliensis	
Sampling time	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Criteria A	≥3	≥3 and NI ^b	≥3 and NI	≥1	≥1 and NI	≥1 and NI	≥0 ^c	≥1
Criteria B	Not performed	≥3	≥3 and NI	Not performed	≥1	≥1 and NI	≥0	≥0 and NI

^a In this test, an acceptable range of deviation of 0,5 log is accepted (see 5.7).
^b NI: no increase in the count from the previous contact time.
^c $R_x = 0$ when $\lg N_0 = \lg N_x$ (no increase from the initial count).

Microrganismi utilizzati ATCC*

ATCC* microorganisms for antibacterial testing:

*ATCC (American Type Collection Control)

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC* 6538	G + bacteria	Microbiologics Lotto 485-868-1 Exp. 09/2019	5.2x10 ⁸ cfu/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC* 9027	G - bacteria	Microbiologics Lotto 484-832-1 Exp. 09/2019	5.8x10 ⁸ cfu/g
<i>Escherichia coli</i>	ATCC* 8739	G - bacteria	Microbiologics Lotto 483-696-1 Exp. 09/2019	6.0x10 ⁸ cfu/g
<i>Candida albicans</i>	ATCC*10231	Lievito / Yeast	Microbiologics Lotto 443-790-1 Exp. 10/2019	3.9x10 ⁷ cfu/g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC*16404	Muffa/ Molds	Microbiologics Lotto 392-995-1 Exp. 10/2019	2.3x10 ⁷ cfu/g

Customer: Microbiologics (BIOLIFE):

Fornitura di ceppi titolati per l'inoculum al tempo 0 / Delivery of titrated strains for inoculation at time 0.

RISULTATI / RESULTS

Prodotto / Product:

OZONIA3000 OZONATED SUNFLOWER SEED OIL LOTTO 18606

Tabella 1: Conta microbica totale per ogni microrganismo di prova Farmacopea Europea

Table 1: Total viable count for each test microorganisms European Pharmacopoeia

Microrganismi/ Microorganisms test	ATCC	T ₀ inoculum	T ₂ gg.	T ₇ gg.	T ₁₄ gg.	T ₂₈ gg.
<i>Stafilococcus aureus</i>	6538	5.2x10 ⁶ cfu/g	<10	<10	<10	<10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	5.8x10 ⁶ cfu/g	<10	<10	<10	<10
<i>Escherichia coli</i>	8739	6.0x10 ⁶ cfu/g	<10	<10	<10	<10
<i>Candida albicans</i>	10231	3.9x10 ⁵ cfu/g	<10	<10	<10	<10
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	2.3x10 ⁵ cfu/g	<10	<10	<10	<10

I dati esprimono le unità formanti colonia (CFU) relative ad 1 grammo di prodotto.

T= intervallo di tempo di analisi.

Conta microbica totale prima dell'esecuzione del Challenge test: <10 cfu/g.

The data express the colony forming units (CFU) relative to 1 gram of product.

T= time of analysis.

Total Vital Count before the execution of the test: <10 cfu/g.

Tabella 2: Riduzione microbica in logaritmo (Log₁₀) in funzione del tempo (T)/

Table 2: Microbial reduction expressed in logarithm (Log₁₀) in function of time (T):

Microrganismi/ Microorganisms test	ATCC	RIDUZIONE LOG ₁₀ / LOG ₁₀ REDUCTION				CRITERIO DI ACCETTABILITÀ: Acceptance criterion A ISO
		T ₂ gg.	T ₇ gg.	T ₁₄ gg.	T ₂₈ gg.	
<i>Stafilococcus aureus</i>	6538	≥6 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	≥6 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Escherichia coli</i>	8739	≥6 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Candida albicans</i>	10231	≥5 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	≥5 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE

I dati esprimono la riduzione microbica in LOG₁₀ in funzione del tempo. NI: nessun incremento

The data express the LOG₁₀ reduction of inoculated germs relative to established control intervals. NI: No Increase.

Convalida del Metodo di analisi per il Challenge test / Validation of the Method of the challenge test:

Diluizione – neutralizzazione e tecnica in superficie su Tryptic Soy Agar-Tween-Lecitine / Dilution-neutralization method and spread plate technique on Tryptic Soy Agar-Tween-Lecitin.

Tryptic Soy Agar-Tween-Lecitine_TSA LTHT per i batteri:

Merck Lotto/ Lot. 9018955 Exp. Date: 2019-10-27.

SDA LTHT: Sauboraud Agar per i miceti:

Merck Lotto/ Lot. 002295 Exp. Date: 2019-11-17.

Quality control (Microbiological quality criteria according to European Pharmacopoeia):

Sterility: Result: no growth: Satisfactory: compliant. **Fertility Test:** Result: growth: Satisfactory: compliant.

GRAFICI

In ogni grafico è riportato la riduzione della carica microbica in funzione del tempo per ogni ceppo microbico di prova.

GRAPHS

In eac graph is shown microbial reduction a function of time for each test microbial strain.

PRODOTTO / *PRODUCT*:

**OZONIA3000 OZONATED SUNFLOWER SEED OIL
LOTTO 18606**

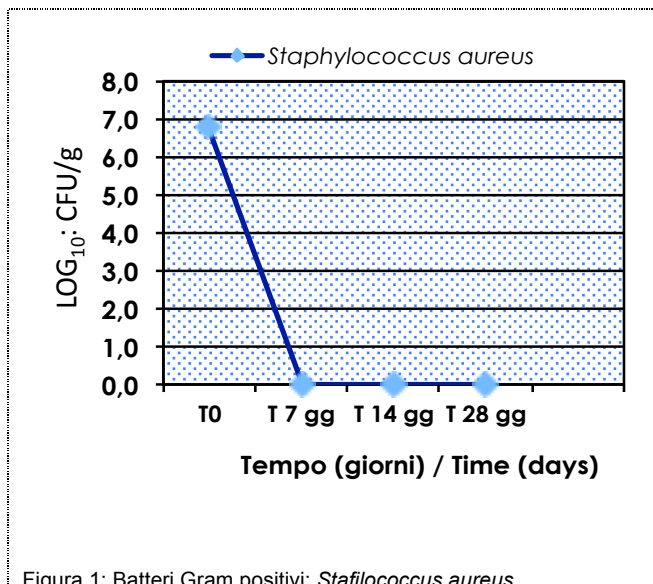


Figura 1: Batteri Gram positivi: *Staphylococcus aureus*

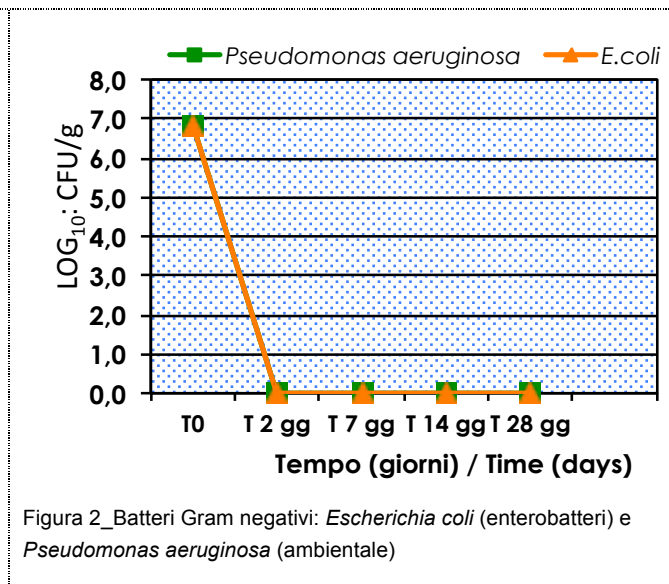


Figura 2_Batteri Gram negativi: *Escherichia coli* (enterobatteri) e *Pseudomonas aeruginosa* (ambientale)

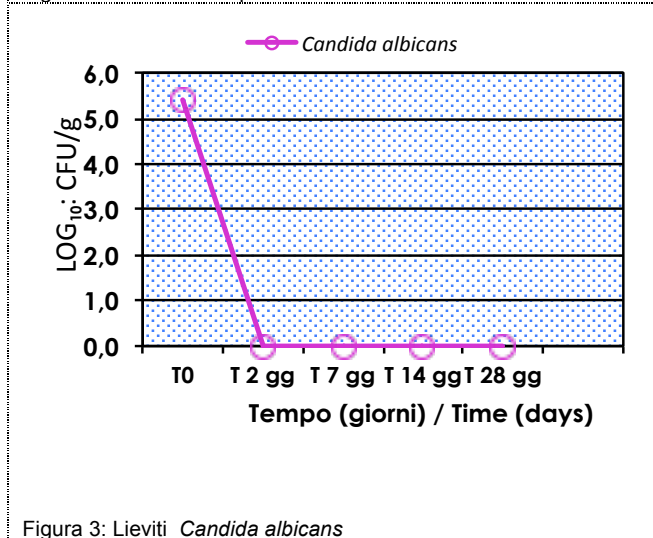


Figura 3: Lieviti *Candida albicans*

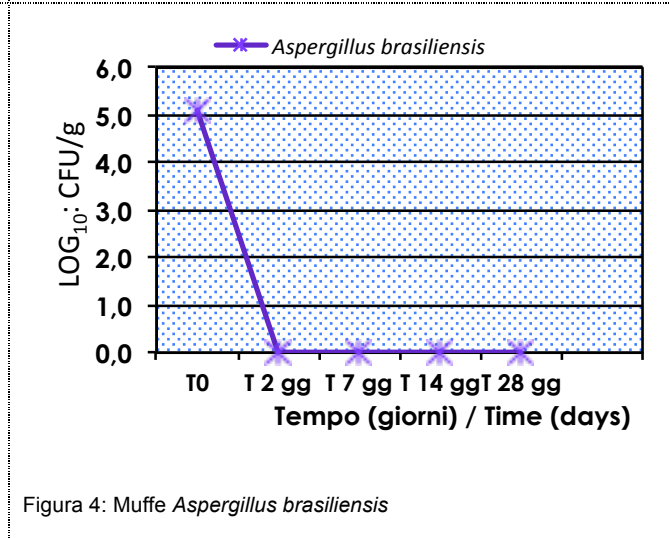


Figura 4: Muffe *Aspergillus brasiliensis*

Legenda: LOG₁₀: valore logaritmo dei risultati
CFU/g: unità formanti colonia relative ad 1 grammo (g) di campione analizzato.

Explanation: LOG₁₀: logarithm value of the results.
CFU/g: colony forming units relative to 1 gram (g) of test product.

I risultati analitici si intendono riferiti esclusivamente al campione analizzato. Il presente Documento non può essere riprodotto neppure in forma parziale salvo approvazione scritta da parte del Responsabile. Questo report è valido elettronicamente, perché costituisce copia esatta controllata e firmata del certificato di analisi originale, conservato in accordo alle procedure di Norme di Buona Prassi di Laboratorio. / The results is referred only to the sample analyzed. The present certificate of analysis cannot be reproduced even in part without permission of Responsible of certificate. This report is electronically valid, because it is controlled and exact copy of the signed original of the certificate of analysis, stored procedures according to requirements of Good Laboratory Practice.

CONCLUSIONE

In base ai criteri di valutazione raccomandati dal ISO 11930:2012 il sistema preservante è accettabile.

Il prodotto denominato:

CONCLUSION

According to the assessment criteria recommended by the ISO Method 11930:2012 the preservative system is acceptable.

The results obtained by testing the product called:

INNOVARES S.R.L.

OZONIA3000 OZONATED SUNFLOWER SEED OIL LOTTO 18606

presenta risultati accettabili secondo il criterio A:

il rischio microbiologico è **ACCETTABILE**:

il prodotto è considerato protetto contro la proliferazione microbica durante il suo utilizzo.

È necessario considerare i fattori di controllo che non sono collegati con la formulazione, quali le modalità di produzione e di confezionamento in conformità alle Norme di Buona Fabbricazione (GMP) per la sicurezza microbiologica del cosmetico.

*show results are acceptable in conforming to the criterion A: the microbiological risk is **ACCEPTABLE**:*

the product is considered protected against the microbial proliferation when using it, but you should consider the control factors not related to the formulation, such as the system of production and packaging in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP) for the microbiological safety of the cosmetic product.

Data report : 30/08/2019



Prof. Pier Giorgio Balboni
(Firma / Signature) docente incaricato di insegnamento (MED/07)
come cultore della materia "Microbiologia" in collaborazione con la
Sezione di Microbiologia dell'Università degli Studi di Ferrara