



# CERTIFICATO DI ANALISI / ANALYSIS CERTIFICATION

## PAO TEST

Ferrara, 01/06/2023

**COMMITTENTE / CUSTOMER :** MEDISILK SPA

**Data di ricevimento del campione / Reception Date:** 06/04/2023

**Identificativo prodotto / Product name:** Crema Detergente e Tónico 2 in 1

**Periodo di analisi / Analysis period:** 10/04/2023 - 02/05/2023

### Descrizione del test:

Il PaO test (Period after Opening) ha lo scopo di verificare il mantenimento dell'efficacia e la stabilità di un preservante all'interno di una preparazione cosmetica quando sottoposto a condizioni di stress fisico. E' quindi possibile determinare una tempistica entro la quale il prodotto, dopo la prima apertura, mantiene un adeguato livello di sicurezza microbiologica.

A tal proposito, sono stati trasferiti 30 grammi di prodotto in contenitori sterili e questi sono stati disposti all'interno di una camera climatica per un periodo di 7 giorni alle seguenti condizioni (ciascuna della durata di 24 ore):

### Test description:

Pao test (Period after Opening) verifies cosmetic's preservative efficacy and stability when physically stressed.

Therefore, it is possible to identify a period by which the product is still microbiologically safe, even after opening.

For this purpose, 30 grams of product have been transferred to sterile containers and they have been placed into a climatic chamber for 7 days under following conditions, each one with a duration of 24 h:



Temperatura (°C) Temperature (°C)	Umidità relativa Relative Humidity
+ 25	70%
+ 40	50 %
+ 40	90 %
+ 10	35 %
+ 50	80 %
+ 30	26 %
+ 4	30 %

In seguito tutti i campioni sono stati inoculati con  
All samples have then been inoculated with

*Escherichia coli* (ATCC 8739)

*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

*Candida albicans* (ATCC 10231)

*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

Sono state inoltre inoculate delle aliquote di 30 grammi di soluzione fisiologica (0,9% NaCl) sterile con la medesima carica batterica o fungina; 1 grammo di fisiologica inoculata e di prodotto inoculato sono stati diluiti in terreno liquido Eugon LT 100 (terreno inattivante) e poi piastrati per inclusione in Tryptic soy agar (TSA) + 0,07% Lecitina di soia + 0,5% Polisorbato 80 (batteri) e Sabouraud Dextrose agar (SDA) + 1% Polisorbato 80 (miceti). agar (SDA) + 1% Polisorbato 80 (miceti).

30 grams of saline solution (0,9% NaCl) have been inoculated as controls with the same microbial load as samples; 1 gram of inoculated saline and samples have been diluted with liquid preserving inactivating broth (Eugon LT100) and then seeded by inclusion in Tryptic Soy Agar (TSA) + 0,07% of soy lecithin + 0,5% polysorbate 80 (bacteria) and Sabouraud Dextrose agar (SDA) + 1 % Polysorbate 80 (molds).



Le piastrature sono state effettuate subito dopo l'inoculo per la soluzione fisiologica e a 2 giorni e 7 giorni per il prodotto in esame; i tempi di incubazione sono 24 ore a 35 °C (TSA) per osservare la crescita batterica e da 3 a 5 giorni a 25 °C (SDA) per osservare la crescita di lieviti e muffe.

E' quindi stata effettuata la conta delle colonie.

Al fine di stabilire il mantenimento dell'efficacia del preservante, sono stati presi in considerazione i primi due tempi dei criteri di accettabilità del challenge test riportati nella tabella 5.1.3.-2 presente in Farmacopea Europea 10 e relativa a preparazioni per uso cutaneo.

Saline Inocula have been plated immediately, while sample's inocula have been plated after 2 and 7 days; Incubation times used are 24 hours at 35 °C (TSA) for bacteria and from 3 to 5 days for molds.

Grown colonies have been counted.

In order to assess preservative's efficacy conservation, first two control points of acceptability criteria of challenge test have been considered (Farmacopea Europea 10 - Table 5.1.3-2 - Preparations for cutaneous application).

Table 5.1.3.-2. - *Ear preparations, nasal preparations, preparations for cutaneous application and preparations for inhalation*

		Log <sub>10</sub> reduction			
		2 d	7 d	14 d	28 d
Bacteria	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Fungi	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

NI: no increase in number of viable micro-organisms compared to the previous reading.

## RISULTATI/RESULTS:

**Tabella 1 / Table 1:** Risultati espressi in cfu/g / Results expressed as cfu/g

	T <sub>0</sub>	2 giorni/days	7 giorni/days
<b>S. aureus</b>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>	4,2 x 10 <sup>4</sup>
<b>P. aeruginosa</b>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>
<b>E. coli</b>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	6,0 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>C. albicans</b>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	3,0 x 10 <sup>2</sup>	< 10
<b>A. brasiliensis</b>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	6,7 x 10 <sup>4</sup>

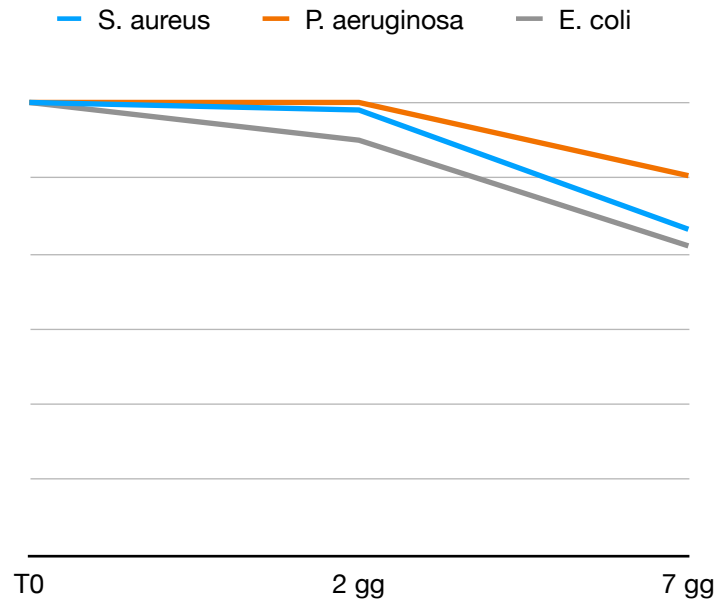
**Tabella 2 / Table 2:** Risultati espressi in riduzione logaritmica (log<sub>10</sub>) / Results expressed as logarithmic reduction (log<sub>10</sub>)

	2 giorni/ days	7 giorni/days	Risultato/Result
<b>S. aureus</b>	< 1 log <sub>10</sub>	> 1 log <sub>10</sub>	<b>Sufficiente / Sufficient</b>
<b>P. aeruginosa</b>	< 1 log <sub>10</sub>	< 1 log <sub>10</sub>	<b>Sufficiente / Sufficient</b>
<b>E. coli</b>	< 1 log <sub>10</sub>	> 1 log <sub>10</sub>	<b>Sufficiente / Sufficient</b>
<b>C. albicans</b>	> 2 log <sub>10</sub>	> 5 log <sub>10</sub>	<b>Adeguato / Adequate</b>
<b>A. brasiliensis</b>	< 1 log <sub>10</sub>	< 1 log <sub>10</sub>	<b>Sufficiente / Sufficient</b>

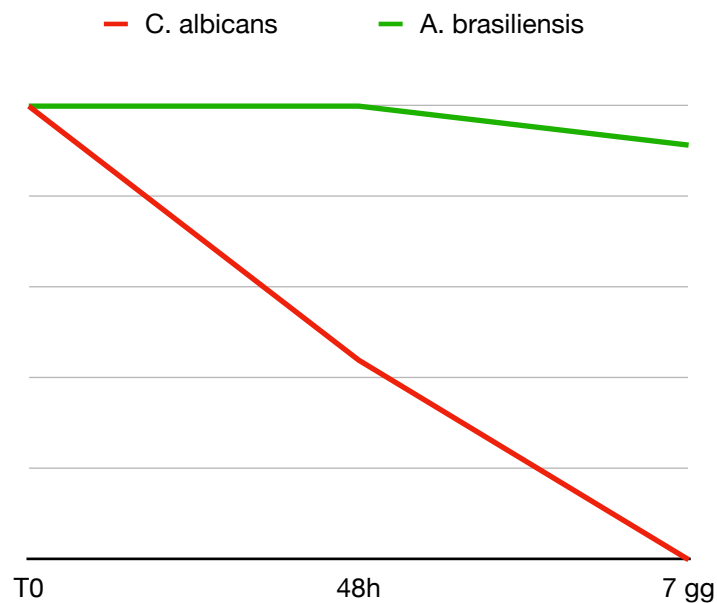
NI (no increase): nessun aumento rispetto all'osservazione precedente

NI (no increase): No increase in relation to previous observation

**Grafico 1 / Diagram 1:** Grafico rappresentante la riduzione logaritmica ( $\log_{10}$ ) della carica batterica iniziale in funzione del tempo / Diagram of the logarithmic reduction ( $\log_{10}$ ) of initial bacterial load vs time



**Grafico 2 / Diagram 2:** Grafico rappresentante la riduzione logaritmica ( $\log_{10}$ ) della carica fungina iniziale in funzione del tempo / Diagram of the logarithmic reduction ( $\log_{10}$ ) of initial mold load vs time





## CONCLUSIONI:

Relativamente ai batteri, dopo il periodo di stress a cui è stato sottoposto, il sistema preservante del prodotto **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** risulta **SUFFICIENTE**.

Relativamente ai miceti, dopo il periodo di stress a cui è stato sottoposto, il sistema preservante del prodotto **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** risulta **SUFFICIENTE**.

La valutazione visiva del prodotto dopo il periodo di stress non ha evidenziato variazioni sostanziali nell'aspetto e nella consistenza.

Il packaging consiste in un tubo di tipo "AIRLESS". Il contatto con le dita umide/sporche o con l'acqua non è probabile. La tipologia di packaging adottata configura una situazione di **basso** rischio di contaminazione microbiologica.

Il prodotto è destinato ad essere usato più volte, in situazioni dove il contatto con le dita umide e/o sporche o il contatto con l'acqua può verificarsi in maniera occasionale. Il rischio di contaminazione microbiologica da parte dell'utente è pertanto da considerarsi **basso**.

## CONCLUSIONS:

As regards to bacteria, after the stress period, the preservative of the product **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** resulted to be **SUFFICIENT**.

As regards to molds, after the stress period, the preservative of the product **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** resulted to be **SUFFICIENT**.

Visual evaluation of the product, after the stress period, hasn't revealed significant variations, considering appearance and texture.

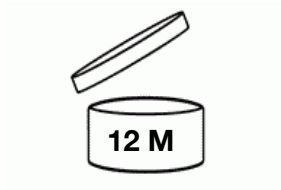
Packaging consists of an "AIRLESS" tube. Contact with wet/dirty fingers or water is not probable. This kind of package has to be considered as **low** risk in terms of microbiological contamination.

The product is intended to be used many times, where contact with wet/dirty fingers or water can occur occasionally. The risk of microbiological contamination by user is **low**.



In considerazione delle evidenze sopra riportate, al prodotto **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** è possibile attribuire un PaO di 12 mesi.

Considering results, the product **Crema Detergente e Tónico 2 in 1** has a PaO of 12 months.



Il responsabile del Laboratorio di Microbiologia

  
Prof.ssa Peggy Marconi