

## REPORT PaO (Period after Opening) TEST

COD. LAB.: 1701301
Data emissione: 03/03/2017
Rev. 0
Determinazione Period after Opening

### Valutazione della stabilità microbiologica di un cosmetico dopo apertura

*Evaluation of the microbiological stability after  
opening of a cosmetic product*

**Committente/ Customer:**

**PIF ITALIA**

**Prodotto / Product: VIBRANT PINK**

Data ricevimento campione / Reception date: 02/02/2017

Periodo di analisi: Period of analysis:

Data inizio analisi / Date of testing: 02/02/2017

Data fine analisi / End Date test: 02/03/2017

## **VALUTAZIONE DEL PERIODO DOPO APERTURA (PaO= Period after Opening)**

### **INTRODUZIONE**

La verifica nel tempo della stabilità microbiologica di un prodotto cosmetico dopo apertura, durante l'utilizzo da parte del consumatore comprende un periodo di invecchiamento accelerato (accelerata) mediante stress chimico – fisico per simulare "in vitro" le condizioni a cui il prodotto potrebbe incontrare durante il suo utilizzo.

Al termine della fase della accelerata il prodotto in esame è sottoposto ad una contaminazione microbica a titolo noto per determinare ad intervalli di tempo prestabiliti la capacità di riduzione del sistema conservante applicando il metodo di regressione lineare secondo D.S. Orth (1).

### **1-SCOPO DELLA PROVA DI REGRESSIONE LINEARE:**

Il metodo della regressione lineare è un metodo rapido e predittivo adeguato per la valutazione dell'efficacia antimicrobica del sistema conservante di prodotti cosmetici.

Il metodo si basa sulla determinazione del valore D (tempo di riduzione microbica), definito come il tempo, espresso in ore, necessario ad abbattere di 1 logaritmo (corrispondente alla riduzione del 90%) la carica microbica inoculata.

## **EVALUATION OF THE PERIOD AFTER OPENING (PAO):**

### **INTRODUCTION:**

*Evaluation of the microbiological stability after opening of a cosmetic product.*

*Evaluation of the time of the microbiological stability of a cosmetic product includes a period of accelerated aging (time accelerated) by to simulate "in vitro" the conditions under which the product may meet during storage and use. After the accelerated phase of the test product is microbiologically contaminated with organisms ATCC (American Type Collection Control) and it is determined at time intervals the capacity reduction of the preservative system by applying the method of linear regression [(ref. method D.S. Orth (1))].*

### **1-SCOPE OF THE TEST OF LINEAR REGRESSION:**

*The linear regression method is a quick and adequate predictor for evaluating the effectiveness of the system antimicrobial preservative in cosmetic products.*

*The method is based on determining the value of D (microbial reduction time), defined as the time, expressed in hours, needed to break down logarithm of 1 (corresponding to 90% reduction) the microbial load inoculated.*

## **2-PROCEDURA DI REGRESSIONE LINEARE**

### **2.1-MATERIALI E METODI.**

Il prodotto in esame nel packaging originale è sottoposto a una prefase di invecchiamento accelerato (accelerata) comprendente un trattamento a cicli di temperatura da 40°C a 4°C, alla luce solare e a un tasso di umidità dal 10 al 90% R.H della durata di una settimana; poi sottoposto "in vitro" a un inoculo di ceppi microbici standard (ATCC) a concentrazione nota e viene eseguita la conta microbica totale (TVC= total count viable) agli intervalli prestabiliti per verificare la sopravvivenza dei microrganismi.

### **Microrganismi ATCC (American Type Culture Collections)**

ATCC organisms For Antibacterial Testing: \*ATCC (American Type Collection Control)

<i>Escherichia coli</i> (Gram- / Bacteria Gram negative)	ATCC*	10536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram- / Bacteria Gram negative)	ATCC*	9027
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+ / Bacteria Gram positive)	ATCC*	25923
<i>Candida albicans</i> (Lievito / Yeast)	ATCC*	10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (Muffa / Mold)	ATCC*	16404

### **Concentrazione inoculo microbico**

Concentrazione microbiologica dell'inoculo:  
Batteri: inoculo pari a 10<sup>5</sup> ufc/gr.  
Miceti (lieviti e muffe): inoculo pari a 10<sup>4</sup> ufc/g

Neutralizzante Eugon LT 100 liquid broth, per inattivare il preservante durante l'analisi.

### **Terreno di coltura**

Tryptic Soy Agar per i batteri;  
Malt Extract Agar per i miceti.

### **Tempo di verifica del PaO**

2 ore, 4 ore, 24 ore, dopo 48 ore e dopo 7 giorni dall'inoculo iniziale.

Espressione dei risultati:

I dati sono espressi in unità formanti colonia (UFC) relative ad 1 gr di prodotto analizzato ed in percentuale (%) di riduzione microbica in funzione del tempo (T).

## **2-REGRESSION LINEAR: PROCEDURE**

### **2.1-MATERIALS AND METHODS**

The test product in their original packaging is subjected after accelerated by treatment at temperature cycles from 40 ° C to 4 ° C, in the light and humidity of 10 to 90% RH for a period of one week; after "in vitro" is subjected to a standard inoculum with microbial strains standard (ATCC) in a precise concentration and executes the total microbial count (TVC = total viable count) at the predetermined intervals to check survival of organisms.

Microbial inoculum concentration:

For bacteria :  
the bacterial inoculum of 10<sup>5</sup> cfu/g  
For fungi (Yeasts and molds) :  
the fungal inoculum of 10<sup>4</sup> cfu/g

Neutralizer: Eugon LT 100 liquid broth  
Neutralizing Broth inactive the preservative and allow for unrestrained microbial growth.

### **Medium**

For bacteria: Tryptic Soy Agar;  
For fungi: Malt Extract Agar.

Evaluation of test PaO time  
after 2 hours, 4 hours, 24 hours, after 48 hours and 7 days of inoculation initial.

Results expression

The data express the colony forming units [CFU] relative to a g of test product and the percent reduction of inoculated germs relative to established control intervals.

### 3-INTERPRETAZIONE DEL PaO TEST IN BASE AL RISCHIO MICROBIOLOGICO.

Se al termine della regressione lineare il cosmetico presenta una riduzione totale del titolo iniziale di ogni ceppo microbico utilizzato pari al 99.00% dopo 4 ore (tempo  $t_{4h}$ ) fino alla totale riduzione del 99,99% dopo 24 ore ( $t_{24h}$ ):  
il cosmetico è classificato a basso rischio microbiologico con un PaO corrispondente a un periodo superiore a 12 mesi.

Se al termine della regressione lineare il cosmetico presenta una riduzione totale del titolo iniziale di ogni ceppo microbico utilizzato pari al 90.0% dopo 24 ore (tempo  $t_{24h}$ ) fino alla totale riduzione del 99,00% dopo 48 ore ( $t_{48h}$ ):  
il cosmetico è classificato a medio rischio microbiologico con un PaO corrispondente a un periodo di 12 mesi.

Se al termine della regressione lineare il cosmetico presenta una riduzione totale del titolo iniziale di ogni ceppo microbico utilizzato pari o inferiore al 90.0% dopo 48 ore ( $t_{48h}$ ):  
il cosmetico è classificato ad alto rischio microbiologico con un PaO corrispondente a un periodo non superiore a 6 mesi.

### 4-VALUTAZIONE DEL PaO TEST IN BASE AL PACKAGING.

Nella **Tabella 1**: Criteri per la valutazione del rischio di contaminazione microbiologica derivato dal tipo di packaging e di chiusura del contenitore e anche al tipo di uso o eventuale abuso che il consumatore può fare del prodotto:

### 3-EVALUATION OF TEST PaO (PERIOD after OPENING) BY MICROBIAL RISK.

*If at the end linear regression the product cosmetic is a microbial reduction within 4 hours (99,99% reduction) and within 24 hours (99,999% reduction):  
the cosmetic is classified low microbiological risk with a PaO corresponding to a period more than 12 months.*

*If at the end linear regression the product cosmetic is a microbial within 24 hours (99,0% reduction) and within 48 hours (99,999% reduction):  
the cosmetic is classified middle microbiological risk with a PaO corresponding to a period of 12 months.*

*If at the end linear regression the product cosmetic is a microbial reduction within 48 hours (90,0% reduction):  
the cosmetic is classified high microbiological risk with a PaO corresponding to a period of up 6 months.*

### 4-EVALUATION OF TEST PaO (PERIOD after OPENING) BY PACKAGING.

*In the Table 1: Criteria for the assessment of the risk of microbiological contamination derived from the type of packaging and closing of the container and also to the type of use or possible abuse that the consumer can make the product:*

<b>FATTORE DI RISCHIO</b> <b>RISK FACTOR</b>	<b>TIPOLOGIA DI PACKAGING E CHIUSURA</b> <b>TYPE OF PACKAGING AND CLOSING</b>	<b>TIPO O EVENTUALE ABUSO DEL CONSUMATORE</b> <b>TYPE OR ANY ABUSE OF A CONSUMER</b>
<b>BASSO (= 1)</b> <i>low microbiological risk</i>	Prodotti monouso o applicatori monouso: <i>Disposable or disposable applicators:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Contenitori monodose ; flaconi AIRLESS</li> <li>✓ Contenitori sigillati ermeticamente, il cui prelievo si deve effettuare con siringa monouso.</li> <li>✓ <i>single-dose containers; AIRLESS or withdrawal, the content using a disposable syringe.</i></li> </ul>	Il contatto del prodotto con le dita umide o sporche può avvenire soltanto una volta.  <i>The contact of the product with the fingers wet or dirty can only take place once.</i>
<b>MEDIO (= 5)</b> <i>Medium microbiological risk</i>	Contenitori multi-uso , se il contatto del prodotto con l'acqua o con le dita umide o sporche è poco probabile: <i>Multi-use containers, if the contact of the product with water or with wet fingers or dirty is unlikely.</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Lozioni in dispenser;</li> <li>✓ Creme in tubo con tappo a vite o flip-top.</li> <li>✓ <i>Lotion Dispenser; Creams tube with screw cap or flip-top.</i></li> </ul>	Utilizzo di prodotti multi-uso , in situazioni dove il contatto del prodotto con le dita umide o sporche è poco probabile o può avvenire solo occasionalmente.  <i>Using multi-use products, in situations where the contact of the product with wet fingers or dirty it is unlikely or may occur only occasionally.</i>
<b>ALTO (= 10)</b> <i>High microbiological risk</i>	Contenitori multi-uso dove può verificarsi il contatto ripetuto con le dita umide/sporche o l'acqua: <i>Multi-use containers where repeated contact may occur with wet fingers / or dirty water:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Shampoo/balsamo in dispenser o tubi con il tappo a vite o flip-top;</li> <li>✓ Dentifricio nel tubo con tappo a vite o flip-top;</li> <li>✓ Creme in vasetto con la pattina rimovibile;</li> <li>✓ Ombretto/mascara con applicatore riutilizzabile (spazzolino, pennellino, tamponcino).</li> <li>✓ <i>Shampoo / conditioner in dispensers or tubes with screw cap or flip-top;</i></li> <li>✓ <i>Toothpaste in the tube with screw cap or flip-top;</i></li> <li>✓ <i>Cream in a jar with removable lid eyeshadow or mascara applicator reusable (toothbrush, brush, swab).</i></li> </ul>	Utilizzo di prodotti multi uso, in situazioni dove può verificarsi ripetutamente il contatto con le dita umide/sporche o il contatto con l'acqua.  <i>Using multi-use products, in situations where it can occur repeatedly contact with the fingers wet / dirty or contact with water.</i>

## CALCOLO DEL VALORE RDV

(Required D-Value):

Il metodo della regressione è utilizzato per la valutazione dell'efficacia del sistema conservante del cosmetico che include anche il fattore di rischio (1,5,10) costituito dal packaging ( $F_p$ ) e dalle condizioni di utilizzo ( $F_{cua}$ : consumer use and abuse)

In base alla formula proposta da Orth (2) si calcola RDV (Required D-Value):

$$RDV = \frac{\text{Valore } D_t}{F_p \cdot F_{cua}}$$

Valore  $D_t$ : valore D massimo accettabile per il microorganismo target

$F_p$ : fattore packaging

$F_{cua}$ : fattore uso/abuso da parte del consumatore

Il valore RDV indica il fattore di rischio di contaminazione di una formulazione, cioè la capacità del sistema conservante presente di prevenire una eventuale proliferazione microbica, che è influenzato, oltre che dalla tipologia di packaging, dal quantitativo (volumi limitati minimizzano la contaminazione), dall'apporto del consumatore, infatti sono importanti le condizioni di utilizzo per evitare cross contaminazioni della formulazione dopo apertura.

## BIBLIOGRAFIA

1. Orth D.S., Barlow R.F., Gregory L.A.:  
*The required D-VALUE: Evaluating product preservation in relation to packaging and consumer use /abuse*, Cosmet Toil 107(12), 39-43 (1992).

## VALUE CALCULATION RDV:

(Required D-Value):

The regression method is used to evaluate the effectiveness of the preservative system of the cosmetic product which also includes the risk factor (1,5,10) consisting of the packaging ( $F_p$ ) and of the conditions of use ( $F_{cua}$ : consumer use and abuse)

According to the formula proposed by Orth (2) is calculated RDV (Required D-Value):

$$RDV = \frac{\text{Value } D_t}{F_p \cdot F_{cua}}$$

$D_{value_t}$ : D maximum acceptable value for the target organism

$F_p$ : packaging factor

$F_{cua}$ : factor use by the consumer

The RDV value indicates the factor of risk of contamination of a formulation, that is the ability of the present preservative system to prevent a possible microbial proliferation, which is influenced not only by the type of packaging, from the quantity (limited volumes minimize contamination), from contribution of the consumer, in fact, are important conditions of use to prevent cross contamination of the formulation after opening.

## REFERENCES

1.Orth D.S., Barlow R.F., Gregory L.A.:  
*The required D-VALUE: Evaluating product preservation in relation to packaging and consumer use /abuse*, Cosmet Toil 107(12), 39-43 (1992).



## RISULTATI

**Prodotto / Product:**

### VIBRANT PINK

Data ricevimento campione / Reception date: 02/02/2017

**Periodo di analisi del prodotto / Period of testing:**

02/02/2017 al 19/02/2017 periodo invecchiamento accelerato / time accelerated aging;  
20/02/2017 al 03/03/2017 prova di Regressione lineare. / Linear regression test.

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

Tempo	E.coli Cfu/g	P.aeruginosa Cfu/g	S.aureus Cfu/g	C.albicans Cfu/g	Asp. brasiliensis Cfu/g
0	1,8,E+05	1,2,E+05	2,7,E+05	1,5,E+04	1,0,E+05
2 h	2,0,E+04	5,5,E+04	4,0,E+04	8,0,E+03	7,0,E+03
4 h	9,0,E+03	1,0,E+04	7,9,E+03	4,0,E+03	3,3,E+03
24 h	1,0,E+03	1,0,E+03	4,0,E+03	1,0,E+03	1,0,E+03
48 h	1,0,E+03	1,0,E+03	1,0,E+03	9,0,E+00	9,0,E+00
7 gg	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00

Cfu / g: Unità formanti colonia relative ad 1 g di prodotto; h= intervallo di tempo di analisi in ore.  
E= valore esponenziale.

Cfu/ g : colony forming units relative to a gram (g) of product; h: hours time of analysis.  
E= exponential value.

**Tabella 2:** Valore Riduzione microbica (%):  
Table 2: Microbial Reduction Value (%):

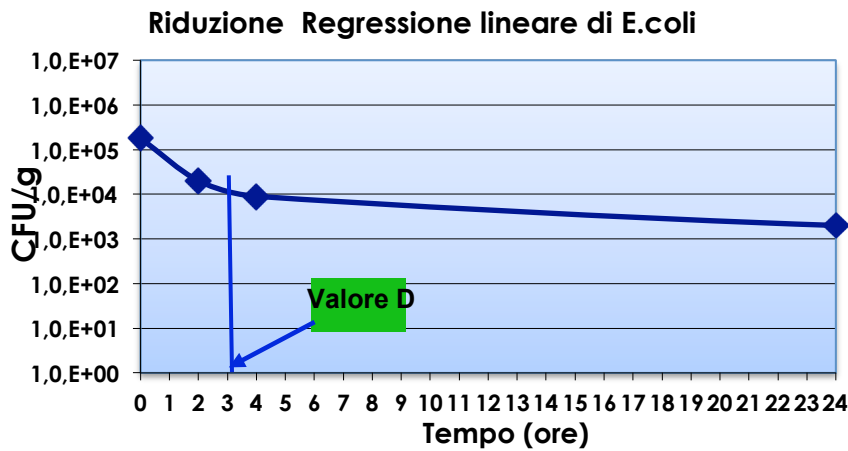
Tempo	E.coli	P.aeruginosa	S.aureus	C.albicans	Asp. brasiliensis
2 h	88,89%	54,17%	85,19%	46,67%	93,00%
4 h	95,00%	91,67%	97,07%	73,33%	96,70%
24 h	99,44%	99,16%	98,52%	93,33%	99,00%
48 h	99,44%	99,16%	99,63%	99,90%	99,99%
7 gg	99,99%	99,99%	99,99%	99,99%	99,99%

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.

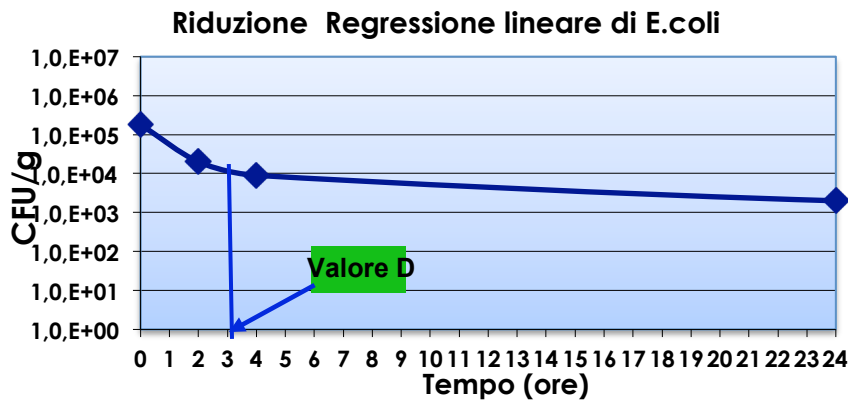
## GRAFICI Regressione lineare / GRAPHS Linear Regression

**Grafici 5.1: Curva di sopravvivenza di Escherichia coli.**  
Graphs 5.1: Survival curve of Escherichia coli.



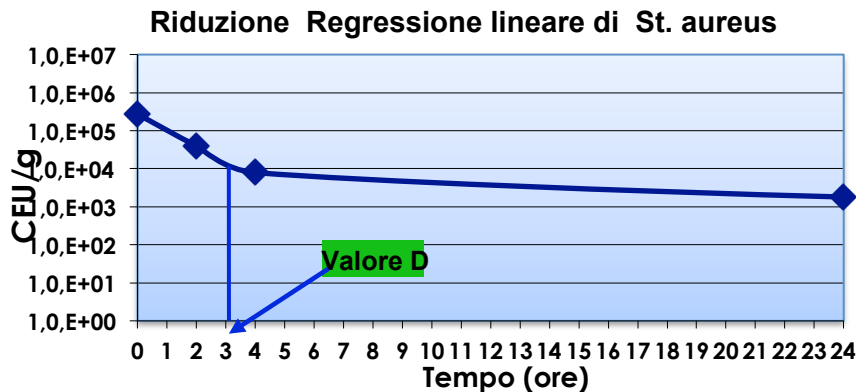
**D = 3.00**

**Grafici 5.2: Curva di sopravvivenza di Pseudomonas aeruginosa.**  
Graphs 5.2: Survival curve of Pseudomonas aeruginosa.



**D = 3.00**

**Grafici 5.3: Curva di sopravvivenza di Staphylococcus aureus.**  
Graphs 5.2: Survival curve of Staphylococcus aureus.

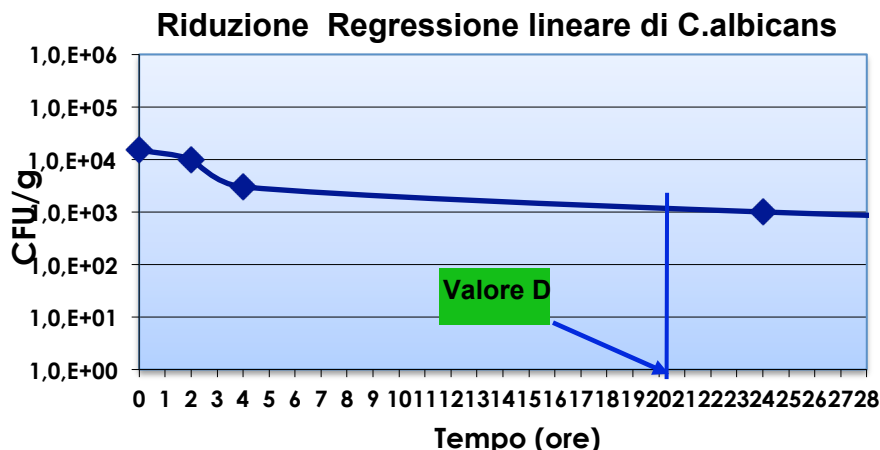


**D = 3.00**



**Grafici 5.4: Curva di sopravvivenza di *Candida albicans*.**

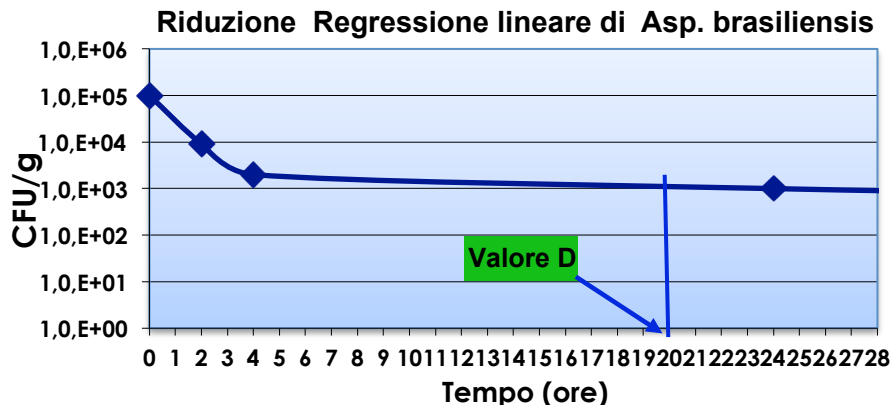
Graphs 5.4: Survival curve of *Candida albicans*.



**D = 20.0**

**Grafici 5.5: Curva di sopravvivenza di *Aspergillus brasiliensis*.**

Graphs 5.5: Survival curve of *Aspergillus brasiliensis*.



**D = 20.0**

Tabella 3.1: Valore D: Batteri

Table 3.1: Value D: Bacteria

	Valore D t 24 h Value D t 24 h	Limite di accettabilità dopo 24 h di contatto Limit of acceptability after 24 h of contact: $D \leq 4$
<i>Escherichia coli</i>	3.00	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.00	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.00	ACCETTABILE / ACCEPTABLE

Tabella 3.2: Valore D: Miceti

Table 3.2: Value D: Fungi

	Valore D t 24 h Value D t 24 h	Limite di accettabilità dopo 24 h di contatto Limit of acceptability after 24 h of contact: $D \leq 28$
<i>Candida albicans</i>	20.0	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	20.0	ACCETTABILE / ACCEPTABLE

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.

ESITO:

È possibile osservare che:

- il fattore di packaging corrisponde ad un valore 5 (medio rischio) in quanto la formulazione è un colore in polvere contenuto in un flacone con tappo a vite e pattina removibile e per più applicazioni;
- il fattore uso/abuso da parte del consumatore corrisponde ad un valore 5 (medio rischio), in quanto il contatto con l'acqua e/o con le dita eventualmente umide o sporche è poco probabile e bassa è la possibilità di contaminazione microbica.
- I risultati microbiologici dimostrano che la formulazione in esame è a medio rischio microbiologico.

RESULT:

It is possible to observe that:

- the packaging factor corresponds to a value of 5 (medium risk) as the formulation is a powder colour in the jar with removable lip and screw cap for most applications;
- the factor use / misuse by the consumer corresponds to a value 5 (medium risk), as the contact with water and / or with the fingers possibly wet or dirty is unlikely and, the microbial contamination is unlikely.
- The microbial results evaluated that the test formulation is medium microbiological risk.

**Tabella 4:** Calcolo RDV per ogni microrganismo  
*Table 4: Value RDV for each organisms*

<i>Microrganismo / Organism</i>	<b>RDV</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>0,12</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>0,12</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>0,12</b>
<i>Candida albicans</i>	<b>0,80</b>
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<b>0,80</b>

Valutando il valore del RDV si osserva che la formulazione dimostra una efficacia preservante nei confronti dei microrganismi, che eventualmente possono venire a contatto con il prodotto durante l'applicazione. I risultati ottenuti dopo invecchiamento accelerato dimostrano che il sistema conservante della formulazione è efficace nei confronti dei ceppi microbici di prova ed è un parametro che è in grado di evitare le eventuali contaminazioni durante l'utilizzo del prodotto.

*Evaluating the value of RDV is observed that the formulation show a effecacy preservative against microorganisms, which may possibly come into contact with the cosmetic product during application. The results obtained after accelerated aging show that the preservative system of the formulation is effective against the microbial strains of the test and is a parameter that is able to avoid any contamination during the use of the product.*

## CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

---

In base ai risultati ottenuti dalla valutazione del rischio microbiologico, dalla tipologia di packaging e dalle condizioni di utilizzo, il prodotto in esame, sottoposto ad invecchiamento accelerato, denominato: /

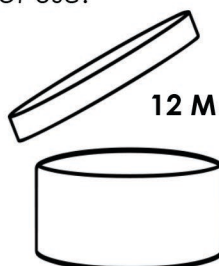
*According the results obtained from the microbiological risk assessment, the type of packaging and the conditions of use, the product concerned, subjected to accelerated aging, called:*

### VIBRANT PINK

Si conclude che: / We conclude that:

il **PaO (Period After Opening)** considerando il risultato "in vitro" microbiologico e l'efficacia microbica dimostrata dalla formulazione si conclude che il **PaO** maggiormente ADEGUATO è di **12 mesi**: periodo di tempo in cui il cosmetico, dopo apertura, può essere utilizzato nei limiti della sicurezza microbiologica nelle normali e prevedibili condizioni d'uso:

*According to the effectiveness demonstrated by the microbicide formulation the PaO (Period After Opening) is 12 months: the adequate period of time in which the cosmetic product, after first opening, can be used within the limits of microbiological safety under normal and be expected conditions of use:*



---

Redazione certificato di analisi /Date certificate of Analysis:  
03/03/2017



(Responsabile laboratorio  
Firma / Signature Dr.ssa Alberta Vandini)  
n. AA\_039993 Albo Biologi

Pag. 11 di 11 / Page 11 out of 11

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.*