

Relazione del 23 dicembre 2016

Valutazione in vitro dell'attività antimicrobica del prodotto:

OZONIA 10 CREMA®

Emulsione dermatologica a base di olio di semi di girasole ozonizzato (Ozonìa 3000).



Committente:

Innovares s.r.l.

Via Risorgimento 5/B 42049 Sant'Ilario d'Enza (Re)

www.innovares.com

Premessa

Fin dal 1973 l'attività analitica e consulenziale del Laboratorio REI S.r.l. si colloca nei settori agro-alimentare, cosmesi e protezione ambientale. Con un laboratorio di 500mq, uno staff tecnico costantemente aggiornato ed attrezzature analitiche d'alto livello, il Laboratorio REI risponde con professionalità alle esigenze della clientela, sia per ciò che riguarda l'efficace esecuzione d'analisi di vario tipo che in merito alla valutazione tecnica ed alla consulenza specifica su aspetti più complessi che spesso accompagnano le normali determinazioni analitiche. Al fine di garantire la massima affidabilità nel prelievo dei campioni, nell'effettuazione delle analisi e nella validazione dei risultati, il Laboratorio REI s.r.l. ha conseguito l'Accreditamento secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova" da ACCREDIA, con il numero 0508, in data ottobre 2003.

ACCREDIA accredita i Laboratori di prova operanti in conformità alle prescrizioni ed ai requisiti previsti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, dai documenti ACCREDIA, EA, ILAC; accertando che questi possiedano e mantengano nel tempo i requisiti organizzativi, procedurali, tecnici e professionali richiesti, in termini tali da ingenerare, in tutte le parti sociali ed economiche interessate – e, in particolare, negli utilizzatori e consumatori finali – un elevato grado di fiducia nell'operato di tali soggetti e nel valore delle attestazioni di conformità da essi rilasciate, tale garanzia è realizzata mediante una convenzione quadriennale di Accreditamento stipulata tra ACCREDIA e il Laboratorio REI s.r.l., consultabile presso la sede del laboratorio REI s.r.l.. L'elenco delle prove accreditate è disponibile presso il sito WWW.ACCREDIA.IT

OZONIA 10 CREMA ®

Emulsione dermatologica a base di olio di semi di girasole ozonizzato (Ozonìa 3000).

PROGETTO DI RICERCA

Valutazione in vitro dell'attività antimicrobica del prodotto

Il Laboratorio REI srl ha ricevuto dalla società Innovares srl l'incarico di eseguire uno studio in vitro sull'attività antimicrobica del prodotto OZONIA 10 CREMA®.

Il prodotto OZONIA 10 CREMA® svolge un'azione protettiva ed eutrofica nelle soluzioni di continuo e nelle condizioni flogistiche della cute e delle mucose, condizioni che necessitano anche di un'azione preventiva della colonizzazione microbica ostacolante i processi di guarigione.

Il presente studio vuole valutare l'azione del preparato nei confronti di microorganismi specifici, di seguito elencati (American Type Culture Collection, ATCC).

Escherichia coli (ATCC 8739) colonizza tratto gastro-intestinale umano/animale, indice di contaminazione fecale, bastoncello, aerobio/anaerobio facoltativo, alcuni ceppi sono l'agente eziologico di malattie intestinali ed extra-intestinali, come infezioni del tratto urinario, meningite, peritonite, setticemia e polmonite.

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027) bastoncino, aerobi obbligati, ossidasi positivi, catalasi positivi ed hanno flagelli polari che permettono loro di muoversi. Si trovano nel terreno, nelle acque e sulle piante. Producono pigmenti come la piocianina che permette di alterare la funzione ciliare, stimolare la risposta infiammatoria e provocare danno ai tessuti feci umane e più raramente anche in zone di epidermide più umide come ascelle ed inguine. Provoca infezioni osteoarticolari, otite esterna, polmonite. È anche responsabile di follicoliti cutanee, infezioni oculari come congiuntivite ed endocardite.

Staphilococcus aureus (ATCC 6538) aerobi-anaerobi facoltativi, normalmente presente a livello della cute, della mucosa della porzione anteriore del naso e della faringe nella maggioranza dei soggetti adulti. Di conseguenza, un'infezione da parte degli stessi è possibile in ogni momento. E' responsabile di infezioni suppurative acute che possono essere dislocate in diversi distretti dell'organismo quali: pelle, apparato scheletrico, apparato respiratorio, apparato urinario, sistema nervoso centrale. Alcuni stipti possono provocare intossicazioni.

Candida albicans (ATCC 10231) è un fungo saprofita appartenente alla famiglia dei Saccaromiceti. Normalmente si trova nel cavo orale, nel tratto gastrointestinale e nella vagina,

Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404) genere di fungo della famiglia Trichocomaceae, può produrre infezioni in uomo e animali (aspergillosi): colpiscono l'apparato respiratorio (naso e polmoni), e possono estendersi ad altri organi (pelle e orecchio).

Proteus mirabilis (ATCC 43071) fa parte delle Enterobacteriacee, anaerobio facoltativo, mobile, causa di infiammazioni, batteriemia e polmoniti.

Trichophyton mentagrophytes (ATCC 9533) fungo zoofilo (animali da allevamento-compagnia), causa di lesioni infiammatorie di derma e scalpo.

Propionibacterium acnes (ATCC 11827) predilige ambienti Anaerobiosi, si trova sulla cute umana, causa acne ma anche infezioni post operatorie, infiammazioni lombari.

Il principio dello studio antimicrobico è quello di aggiungere ad un campione del prodotto sottoposto a prova una sospensione batterica di prova e mantenuta a 22°C per un tempo prestabilito.

Par.1) Condizioni sperimentali

Terreni colturali:

Terreno nutritivo in brodo: Brain Heart Infusion (BHI);

Terreno nutritivo in brodo: Saboraud dextrose Broth (SAB);

Diluyente neutralizzante Lethen Broth Base Modified (MLB)

Terreno solido per batteri: Tryptone Soya Agar (TSA);

Terreno solido per lieviti e muffe Saboraud Dextrose Agar (SDA).

Incubazione in termostato a 22 +/- 1°C.

Par.2) Verifica preliminare del diluyente-neutralizzante e sua convalida

Ad campione di OZONIA 10 CREMA® sottoposto a prova viene aggiunta una sospensione batterica di prova, a cui va aggiunto un diluyente che abbia capacità neutralizzare immediatamente l'attività batterica del conservante presente nel prodotto.

L'inattivazione dell'attività batterica del prodotto deve essere convalidata per ciascuno dei ceppi sottoposti a prova e per ciascuna delle condizioni sperimentali scelte.

Il diluyente, che ha dato esito positivo è MLB alla diluizione 1:10.

Par.3) Verifica preliminare della contaminazione batterica del prodotto cosmetico.

Batteri aerobi mesofili < 10 ufc/g secondo metodo di analisi accreditato ISO 21149;

Lieviti e muffe: <10 ufc/g. secondo metodo di analisi accreditato ISO 16212.

Par.4) Inoculo dei ceppi nel campione di OZONIA 10 CREMA®

I microorganismi da testare sono stati fatti crescere:

Propionibacterium acnes in terreno BHI per 48-72 h in condizioni di anaerobiosi alla temperatura di incubazione di 35°C.

Aspergillus niger, *Candida albicans* in terreno SAB per 24 -48 ore alla temperatura di incubazione di 32°C.

I rimanenti microorganismi in terreno BHI per 24 -48 ore alla temperatura di incubazione di 37°C.

I microorganismi così ottenuti sono una concentrazione di circa 10^7 , dopo di che si esegue l'inoculo separatamente con 0.2 ml in 20 g di campione per ottenere concentrazione finale di lavoro corrispondente a circa 10^3 cell/ml. Parallelamente si esegue anche un controllo positivo per verificare la correttezza della procedura.

Per verificare la correttezza della procedura di preparazione, il campione inoculato viene analizzato dopo 1 ora, prelevandone 1 g a cui vengono aggiunti 9 ml di MLB e successivamente seminati in piastra su terreno specifico con diluzioni opportune.

Dopo il prelievo, il campione viene messo ad incubare a 22°C in termostato per i successivi prelievi alle scadenze prefissate.

Par. 5) Risultati:

Nella tabella si riportano i risultati dei livelli di inoculo e dei conteggi effettuati alle scadenze previste. Nel caso in cui il dato era inferiore al limite di rilevabilità la differenza tra logaritmi è stata espressa come "maggiore di" (>).

CEPPO	Unità di misura	Inoculo	2 ore	4 ore	1 giorno	2 giorni	7 giorni
Escherichia coli	ufc/g	1.56 x 10 ⁷	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	7.19	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	6.19	6.19	6.19	6.19	6.19
Pseudomonas aeruginosa	ufc/g	9.6 x 10 ⁶	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	6.98	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	5.98	5.98	5.98	5.98	5.98
Staphilococcus aureus	ufc/g	4.44 x 10 ⁷	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	7.64	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	6.64	6.64	6.64	6.64	6.64
Candida albicans	ufc/g	1.23 x 10 ⁶	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	6.08	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	5.08	5.08	5.08	5.08	5.08
Aspergillus brasiliensis	ufc/g	4.9 x 10 ⁵	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	5.69	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69
Proteus mirabilis	ufc/g	2.31 x 10 ⁷	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	7.36	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	6.36	6.36	6.36	6.36	6.36
Trichophyton mentagrophytes	ufc/g	1.16 x 10 ⁸	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	8.06	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	7.06	7.06	7.06	7.06	7.06
Propionibacterium acnes	ufc/g	2.8 x 10 ⁶	<10	<10	<10	<10	<10
	log ₁₀ ufc/g	6.45	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	5.45	5.45	5.45	5.45	5.45

La farmacopea definisce per le preparazioni topiche i criteri di accettabilità dell'attività antimicrobica in termini di riduzione logaritmica di microrganismi vivi contro il valore dell'inoculo iniziale secondo la Tabella 5.1.3-2. e sono riportati in Tabella.

		Riduzione logaritmica			
	Criteri	2 giorni	7 giorni	14 giorni	28 giorni
Batteri	A	2	3	-	Nessun Incremento
	B			3	Nessun Incremento
Lieviti e muffe	A	-	-	2	Nessun Incremento
	B			1	Nessun Incremento

Nella tabella successiva riportiamo i valori di riduzione in % rispetto all'inoculo.

CEPPO	Unità di misura	Inoculo	2 ore	4 ore	1 giorno	2 giorni	7 giorni
Escherichia coli	ufc/g	1.56×10^7	100	100	100	100	100
Pseudomonas aeruginosa	ufc/g	9.6×10^6	100	100	100	100	100
Staphilococcus aureus	ufc/g	4.44×10^7	100	100	100	100	100
Candida albicans	ufc/g	1.23×10^6	100	100	100	100	100
Aspergillus brasiliensis	ufc/g	4.9×10^5	100	100	100	100	100
Proteus mirabilis	ufc/g	2.31×10^7	100	100	100	100	100
Trichophyton mentagrophytes	ufc/g	1.16×10^8	100	100	100	100	100
Propionibacteri um acnes	ufc/g	2.8×10^6	100	100	100	100	100

Par.6) Conclusioni

Le prove in vitro sperimentali per la valutazione antimicrobica di OZONIA 10 CREMA® hanno evidenziato un esito molto positivo per i microorganismi testati e rispetta sicuramente i criteri raccomandati di efficacia antimicrobica nei confronti di tutti i microorganismi testati, come previsto nella Tabella 5.1.3-2 della Farmacopea per preparazioni ad uso topico.

Par. 7) Bibliografia

UNI EN ISO 11930 Valutazione della protezione antimicrobica di un prodotto cosmetico.
EUROPEAN PHARMACOPOEIA Contaminazione microbica dei prodotti non obbligatoriamente sterili 2.6.12 e Efficacy of antimicrobial preservation 5.1.3.

Direttore tecnico

Dott chim Attilio Sagner

