

ESTUDIO RELATIVO A LA EFICACIA DEL SISTEMA CONSERVANTE

CHALLENGE TEST

Análisis **MICROBIOLÓGICO**, siguiendo las especificaciones detalladas en la **ISO 11930:2019** Ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético "Challenge Test".

PRODUCTO

**CREMA LIPOLITICA INTENSIVA
I5001 V2 / ISAAK KUZMAR**

PROMOTOR DEL ESTUDIO

NATURAL SOLTER, S.L.

Metalurgia, 5 (P.I. Les Galgues)

03750 PEDREGUER

ALICANTE

PRODUCTO TESTADO: **CREMA LIPOLITICA INTENSIVA
I5001 V2 / ISAAK KUZMAR**

CODIGO DE EUROLAB: **M-25-019707**
INFORME Nº: **M-25-019707_CH V0**
FECHA DE RECEPCIÓN: **14/04/2025**
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO: **14/04/2025**
FECHA DE FINALIZACION DEL ENSAYO: **17/05/2025**

ÍNDICE

1. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO	pág 3
2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	pág 3
3. OBJETIVO DEL ESTUDIO	pág 4
4. MATERIAL , EQUIPOS Y REACTIVOS	pág 4
5. CEPAS DEL ESTUDIO	pág 5
6. METODOLOGÍA	pág 6
7. CRITERIO DE RESULTADOS	pág 7
8. RESULTADOS DE LA EFICACIA DEL NEUTRALIZANTE	pág 8
9. CONCLUSIÓN DE LA EFICACIA DEL NEUTRALIZANTE	pág 8
10. RESULTADOS DE LA EFICACIA DEL CONSERVANTE	pág 9
11. GRÁFICOS	pág 10
12. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	pág 11
13. GARANTÍA DE CALIDAD	pág 11
14. OBSERVACIONES	pág 12
15. CONCLUSIÓN	pág 12
16. FIRMAS	pág 12

1. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO

El Centro de Investigación responsable es:

EUROLAB TESTING & RESEARCH-LIMSA

Carretera del Mig 172
08907 Hospitalet de Llobregat
Barcelona (España)

El Equipo Técnico está formado por :

Director del estudio: Montse Díaz (Responsable del Dpto Microbiología)

Técnicos del estudio: Silvia Verdú (Analista de Microbiología)
Marina Clusa (Analista de Microbiología)
Patricia Fernández (Analista de Microbiología)

2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

- **NOMBRE DEL PRODUCTO :** CREMA LIPOLITICA INTENSIVA
- **REFERENCIA / LOTE:** I5001 V2 / ISAAK KUZMAR
- **REFERENCIA INTERNA EUROLAB-LIMSA :** M-25-019707
- **ASPECTO DEL PRODUCTO :** Crema
- **TIPO Y VOLUMEN DE ENVASE :** Envase de plástico no comercial 200g

3.OBJETIVO DEL ESTUDIO

La prueba de desafío " Challenge test", también conocida como prueba de eficacia microbiana, prueba de provocación microbiológica o prueba de eficacia del sistema conservante, es una prueba que tiene como objetivo garantizar la eficacia de los conservantes añadidos a los productos cosméticos y farmacéuticos.

Para determinar la resistencia del producto a la contaminación microbiana, se realiza una contaminación intencionada de la muestra con los diferentes microorganismos específicos y se hace la evaluación de la muestra a diferentes intervalos de tiempo definidos, evaluando así la eficacia del sistema conservante.

4. MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIAL / EQUIPOS

- Balanza con una resolución mínima de 0.1g
- Material estéril para toma de muestra (micropipetas, pipetas Pasteur, espátulas...)
- Asa de siembra estéril
- Contenedor estéril
- Placas de Petri de 90mm Ø estériles
- Autoclave que permita la esterilización por vapor a 121°C durante 15 min
- Diluidor gravimétrico con una resolución mínima de 0.1g
- Agitador de palas tipo stomacher
- Campana de flujo laminar o de bioseguridad
- Agitador de tubos o vortex
- Baño termostático.
- Espectrofotometro, con lectura a 620 nm.
- Perlas de vidrio y filtro tritado.
- Estufa de cultivo a 32,5°C ± 2,5°C
- Estufa de cultivo a 25°C ± 2,5°C
- Nevera 4°C ± 3°C
- Congelador -20°C ± 3°C

REACTIVOS/ MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Eugon LT modificado
(Composición: Triptona 15,0 g/L, peptona de soja 5,0 g/L, polisorbato-80 15mL, Dextrosa 5,5 g/, cloruro sódico 4,0 g/L, lecitina 1,0 g/L, Sodio Laurylsulfate 1.56 g/L, L-cisteina Hcl 0,70 g/L, sulfito sódico 0,20 g/L.)
- Agar de triptona y soja (TSA)
- Agar Saboraud Dextrosa Cloranfenicol (SDC)
- Agar Saboraud Dextrosa (SDA)
- Agar patata y dextrosa (PDA)
- Caldo Agua de peptona tamponada (APT)
- Solución fisiologica (S.S)

5. CEPAS DEL ESTUDIO

El ensayo se lleva a cabo utilizando cepas de los siguientes microorganismos de ensayo:

CEPAS DE REFERENCIA	N° CEPA	TIPO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Bacteria Gram negativa
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Bacteria Gram positiva
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Bacteria Gram negativa
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levadura
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Moho

Origen cepas referencia :

Liófilo comercial. Cultivo derivado de ATCC: American Type Culture Collection- Rockville, USA.

Almacenamiento :

CRIOTECA . Congelación ordinaria se mantienen temperaturas de -5 a -20°C

Condiciones de uso :

Resiembras a partir de criobolas usando cultivos con menos de 5 pases.

6. METODOLOGÍA

6.1 Control de esterilidad y preparación inicial de la muestra

Se realiza un control de esterilidad a la muestra antes de realizar el ensayo de challenge test, que consiste en un recuento de aerobios mesófilos y un recuento de mohos y levaduras, con el fin de ver si el cosmético no tiene ningún tipo de microorganismo que interfiera en el análisis.

- Bacterias en TSA a $32,5^{\circ} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 72 h
- Mohos y Levaduras en SDC a $25 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 5 días

6.2 Preparación y control del inóculo

6.2.1 Preparar una suspensión con cada uno de los microorganismos anteriormente citados, para obtener una concentración final aproximadamente de:

- 10^5 - 10^6 ufc/ml para bacterias
- 10^4 - 10^5 ufc/ml para *C. albicans* y *A. brasiliensis*

6.2.2 Sembrar en:

- TSA (bacterias), SD (*C.albicans*) : $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 72 h
- PDA (*A.brasiliensis*) : $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 5 días

6.2.3 Recuento y cálculo de las colonias. De este recuento se obtiene el número **N** (número de microorganismos presentes en la suspensión estandarizada) y **N₀** (que es el número de microorganismos inoculados en la formula en **T₀**)

6.3 Inoculación de la muestra

6.3.1 Se pesan 20 g de cosmético se le inoculan 0,2 ml del inóculo anterior de cada microorganismo por separado. Esto es lo que se conoce como T₀

6.3.2 A diferentes tiempos se realiza un control para ver si el número de microorganismos ha descendido o desaparecido totalmente. Se realiza un control a T₇ bacterias y levaduras, T₁₄, y T₂₈ para bacterias, levaduras y mohos.

- TSA (bacterias), SD (*C.albicans*): $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 72 h
- PDA (*A.brasiliensis*): $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 5 días

6.3.3 Recuento de las colonias, del cual obtenemos el **N_x** que es el número de supervivientes en la formula contaminada en cada tiempo de muestreo **T_x** (T₇, T₁₄, T₂₈)

6.4 Control eficacia del neutralizante

Se comprueba que el neutralizante usado (Eugon LT modificado), es capaz de inactivar los conservantes del producto cosmético y a la vez permite el crecimiento de los microorganismos de ensayo.

Para ello se realizan 3 controles:

- **N_v**, es el "número de microorganismos presentes en el inóculo control"
(Valor obtenido mezclando APT más inóculo de cada microorganismo por separado)
- **N_{vn}**, es el "número de microorganismos presentes en la "mezcla control"
(Valor obtenido mezclando el Eugon LT, el APT más inóculo de cada microorganismo por separado)
- **N_{vf}**, es el "número de microorganismos presente en el ensayo".
(Valor obtenido mezclando Eugon LT, muestra más inóculo de cada microorganismo por separado)

La eficacia del neutralizante se demuestra si cumplen los siguientes criterios:

$N_{vf} \geq 0,5 N_{vn}$

N_{vn} es próxima a N_v.

Criterio: la recuperación obtenida debe diferir como máximo un factor de 2 comparado con el valor estandarizado. (Equivale a >50%)

7. CRITERIO DE RESULTADOS

Microorganismos	Bacterias			C. albicans			A. brasiliensis		
Tiempo de muestreo	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T7	T14	T28
Criterio A	$R_x \geq 3$	$R_x \geq 3$ y NI	$R_x \geq 3$ y NI	$R_x \geq 1$	$R_x \geq 1$ y NI	$R_x \geq 1$ y NI	NR	$R_x \geq 0$	$R_x \geq 1$ y NI
Criterio B	NR	$R_x \geq 3$	$R_x \geq 3$ y NI	NR	$R_x \geq 1$	$R_x \geq 1$ y NI	NR	$R_x \geq 0$	$R_x \geq 0$ y NI

NR: no realizado

NI: no hay incremento en el recuento respecto al del tiempo de contacto precedente

RX = 0 cuando $\lg N_0 = \lg N_X$ (No hay incremento respecto al recuento inicial)

En este ensayo se permite una desviación de 0,5 log

Criterio A: expresa la máxima eficacia recomendada que debe alcanzarse. Este criterio considera que el producto está protegido frente a la proliferación microbiana que pueda presentar riesgo potencial para el usuario.

Criterio B: en casos justificados, cuando el criterio A no se puede alcanzar por razones de un incremento de riesgo de reacciones adversas, este criterio B puede ser suficiente (satisfactorio).

8. RESULTADOS DE LA EFICACIA DEL NEUTRALIZANTE

Cepas de referencia	N _v ufc/ml	N _{vf} ufc/ml	N _{vn} ufc/ml
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 dilución: 1:10	440	528	572
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 dilución: 1:10	1584	1496	1672
<i>E. coli</i> ATCC 8739 dilución: 1:10	1936	1254	2024
<i>C. albicans</i> ATCC 10231 dilución: 1:10	1056	946	792
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 dilución: 1:10	506	363	484

9. CONCLUSIÓN DE LA EFICACIA DEL NEUTRALIZANTE

Cepas de referencia	Dilución efectiva	Resultado	
		N _{vf} > 0,5N _{vn}	N _{vn} proxima N _v
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1:10	VALIDADO	VALIDADO
<i>Staphylococcus aureus</i>	1:10	VALIDADO	VALIDADO
<i>Escherichia coli</i>	1:10	VALIDADO	VALIDADO
<i>Candida albicans</i>	1:10	VALIDADO	VALIDADO
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1:10	VALIDADO	VALIDADO

La eficacia del neutralizante se demostró para todos los patógenos

10. RESULTADOS DE LA EFICACIA DEL CONSERVANTE

		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
INÓCULO	vol (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	N (ufc/ml)	3,50E+07	1,35E+08	3,68E+08	7,30E+06	4,80E+06
T0 14/04/2025	N ₀ (ufc/ml)	3,50E+05	1,35E+06	3,68E+06	7,30E+04	4,80E+04
	lgN ₀	5,54	6,13	6,57	4,86	4,68
T7 21/04/2025	N ₇ (ufc/g)	<10	<10	<10	<10	---
	lgN ₇	1,00	1,00	1,00	1,00	---
	R ₇	4,54	5,13	5,57	3,86	---
T14 28/04/2025	N ₁₄ (ufc/g)	<10	<10	<10	<10	<10
	lgN ₁₄	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R ₁₄	4,54	5,13	5,57	3,86	3,68
T28 12/05/2025	N ₂₈ (ufc/g)	<10	<10	<10	<10	<10
	lgN ₂₈	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R ₂₈	4,54	5,13	5,57	3,86	3,68

Vol: volumen del inóculo

N: n° de microorganismos de la suspensión

N₀: N/100

N_x: n° de microorganismos supervivientes

R_x: reducción de microorganismos supervivientes = lg (N₀) - lg (N_x)

11. GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolución de la carga microbiana en la muestra

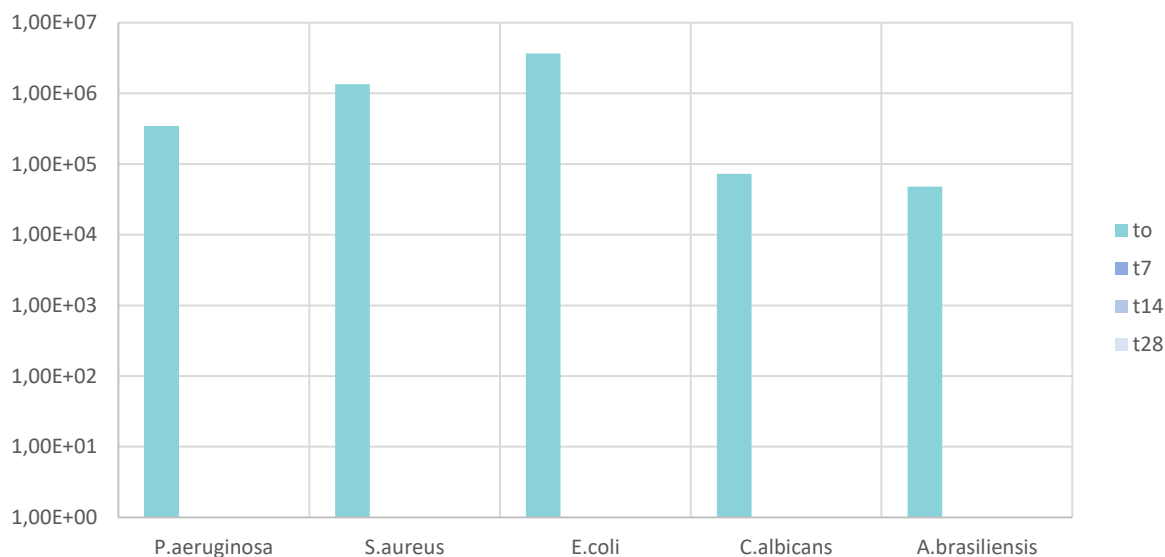
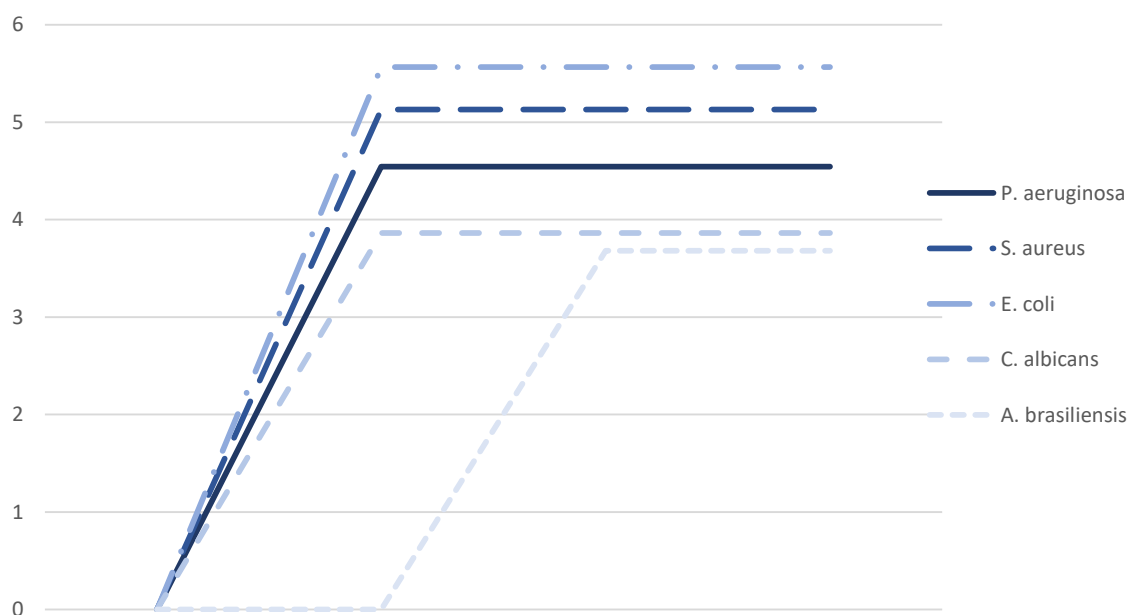


Gráfico 2. Evolución de la reducción de microorganismos supervivientes en la muestra (R_x respecto al tiempo)



12. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La muestra ensayada:

**CREMA LIPOLITICA INTENSIVA
I5001 V2 / ISAAK KUZMAR**

Evaluada según la **ISO 11930:2019 Ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético**, cuando se inocula con las cepas:

Bacterias: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *E.coli* ATCC 8739

Mohos y Levaduras: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 *Candida albicans* ATCC 10231

CUMPLE con los criterios establecidos en la tabla del apartado "7. CRITERIOS DE RESULTADOS" pág7

13. GARANTÍA DE CALIDAD

El challenge test es un ensayo de proceso que se realiza para controlar proceso de naturaleza repetitiva. Por lo tanto, se acepta que este estudio no sea inspeccionado en una base individual durante las fases experimentales sino, que se lleve a cabo de manera aleatoria o periódica.

Los puntos de proceso inspeccionados por Garantía de Calidad y que se detallan en el Registro REG-169 han sido :

- Inicio del estudio
- Control de medios
- Control de cepas
- Validación neutralizante
- Inóculo
- Resultados T7
- Resultados T14
- Resultados T28

Garantía de Calidad y el Director del Estudio, tras la revisión de los puntos de proceso anteriormente detallados, certifican que :

1. No se presentaron desviaciones que afectaran a la calidad o integridad del estudio o interpretación de los resultados en el informe final.

2. El informe final refleja los datos brutos del estudio.



Fdo: Erica Ruiz
Director Calidad



Fdo: Montse Diaz
Director Estudio

14. OBSERVACIONES

Ingredients: Aqua, Aloe barbadensis Leaf Juice, Glyceryl Stearate SE, Glycerin, Isopropyl Myristate, Caffeine, Cetyl Alcohol, Cetearth-12, Carnitine, Maltodextrin, Tocopheryl Acetate, Xanthan Gum, Disodium EDTA, Ethylhexylglycerin, Fucus vesiculosus Extract, Camelia sinensis Leaf Extract, Gelidium sesquipedale Extract, Laminaria digitata Extract, Ulva lactuca Extract, Centella Asiatica Extract, Ubiquinone, Methyl Nicotinate, Citric Acid, Phenoxyethanol, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Parfum.

15. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos para la fórmula:

**CREMA LIPOLITICA INTENSIVA
I5001 V2 / ISAAK KUZMAR**

Cumplen con el criterio A establecido según la norma ISO 11930 para la Evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético.

El producto tiene un sistema conservante efectivo.

16. FIRMAS

*Los resultados obtenidos hacen referencia siempre y exclusivamente a la muestra enviada por el cliente al Laboratorio Eurolab-Limsa



Fdo: Montse Diaz
Resp. Dpto. Microbiología

Firmado Electrónicamente por:
EUROLAB TESTING AND RESEARCH S.L.

L'Hospitalet de Llobregat, 30 de mayo de 2025

Versión informe	Fecha modificación	Motivo modificación
V0	---	---