



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

**VALUTAZIONE IN VITRO DELLA CAPACITÀ
ANTIOSSIDANTE DI UN PRODOTTO
PER USO TOPICO**

***In vitro evaluation of the antioxidant
capability of a topical product***

COMMITTENTE/SPONSOR	LABORATOIRE DR PAUL ET KARIN HERZOG SA Route de Taillepied, 1 1095 Lutry - SWITZERLAND
CAMPIONE/SAMPLE	Chocolate! Lotto/Batch: 541 0415
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	07/07/2014
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/1107/2014/FUNZ/ELB

Pag 1 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via dell'Industria, 29/2
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Premessa/Preliminary

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test eseguito sul prodotto in oggetto.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolare l'interpretazione.

La prima parte fornisce informazioni circa il committente, il prodotto testato, il tipo di test, il laboratorio esecutore, le date di inizio e fine studio e l'identità degli sperimentatori.

La seconda parte descrive il protocollo sperimentale.

La terza parte riporta i risultati e le conclusioni.

This report contains the experimental data compiled during the in vitro studies of the test product.

The test results are presented in a concise table format for easy interpretation.

The first part provides information regarding sponsor and test product identifications, assay type, entrusted laboratory, study initiation and completion dates and supervisory personnel.

The second part describes the study design, including materials and procedures.

The test results and conclusions are presented in the third and last part of the report.

Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto o parti di esso possono essere riprodotti solo con il consenso degli sperimentatori.

The results reported in the present brochure refer only to the tested sample/samples and to the particular experimental conditions hereby described. This report or parts of it can be reproduced only with the experimenters' agreement.

Pag 2 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via dell'Industria, 29/2
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Sommario/Summary

1	PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	4
1.1	COMMITTENTE/SPONSOR	4
1.2	CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED MATERIAL	4
1.3	TEST/ASSAY	4
1.4	LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY	4
1.5	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	4
1.6	RICERCATORE PRINCIPALE/ INVESTIGATOR.....	5
1.7	SUPERVISORE SCIENTIFICO/STUDY DIRECTOR	5
2	PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN	6
2.1	SCOPO DEL TEST/AIM OF THE TEST	6
2.2	ESECUZIONE DEL TEST/ASSAY PROCEDURES	7
2.2.1	<i>Test di attività antiossidante/Antioxidant assay</i>	7
2.2.2	<i>Preparazione del campione /Sample preparation</i>	7
3	PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	8
3.1	ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL CONTROLLO POSITIVO/POSITIVE CONTROL ANTIOXIDANT ACTIVITY	8
3.2	ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL CAMPIONE /ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SAMPLE.....	9
3.3	CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	11
4	BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY	12

—



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

1.1 *Committente/Sponsor*

LABORATOIRE DR PAUL ET KARIN HERZOG SA
Route de Taillepied, 1
1095 Lutry () - SWITZERLAND

1.2 *Campione Analizzato/Tested Material*

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Chocolate! Lotto/Batch: 541 0415	4418/14-02	emulsione di colore beige / beige emulsion

La vitamina C è stata usata come controllo positivo (antiossidante noto)/ Vitamin C has been used as a positive control (well known antioxidant)

1.3 *Test/Assay*

- Misura diretta della capacità antiossidante del prodotto in esame tramite ossidazione indotta con perossidi e analisi colorimetrica /Direct measure of the antioxidant activity of the tested product through peroxides-induced oxidation and colorimetric analysis.

1.4 *Laboratorio Incaricato/Entrusted Laboratory*

ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri, 213/B – 28924
Verbania - Italy - tel +39 (0)323 586239 fax +39 (0)323 496877

1.5 *Date dello Studio/Study Dates*

Inizio/Start: 03/07/2014
Fine/End: 03/07/2014

Pag 4 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1.6 Ricercatore principale/ Investigator

Dr. Clara Sinigaglia, Tecnico di laboratorio biomedico/ Biomedical
laboratory technician
ABICH S.r.l.

1.7 Supervisore scientifico/Study director

Dr. Elena Bocchietto, Biologa specialista in
Biotecnologie / Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2 PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/Aim of the test

I metodi *in vitro* di valutazione dell'attività antiossidante rivestono un grande interesse per dimostrare l'efficacia e la stabilità di prodotti finiti o ingredienti cosmetici anti-invecchiamento, protettivi e rigeneranti della cute. Nel caso specifico, si vuole valutare l'efficacia antiossidante di campioni di creme e la loro capacità di contrastare gli effetti negativi legati allo stress ossidativo ed al rilascio di radicali liberi (ROS) nella cute.

Lo stress ossidativo, infatti, è una delle principali cause di invecchiamento biologico ed è coinvolto nello sviluppo di molte patologie cutanee, dalle dermatiti ai melanomi. L'esposizione a raggi UV, a sostanze inquinanti, al fumo così come l'assunzione di alimenti, di farmaci o situazioni patologiche possono aumentare il contenuto di sostanze ossidanti nella cute, o ridurre l'efficienza degli antiossidanti endogeni.

L'esposizione a stress ossidativo porta alla formazione di ROS che a loro volta causano danni alle membrane cellulari (perossidazione lipidica), così come alle strutture proteiche ed al DNA, fino ad arrivare alla morte della cellula. Sostanze antiossidanti come le vitamine A, E e C, sono spesso aggiunte ai prodotti cosmetici per contrastare i processi ossidativi nelle cellule cutanee e ritardare l'invecchiamento.

Lo scopo di questo studio è di investigare la potenzialità antiossidante di un prodotto. In particolare viene valutata l'inibizione della formazione indotta da perossidi di un substrato cromogenico rappresentato dal catione radicalico ABTS (2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-acido sul fonico). In presenza di un eventuale agente antiossidante, la formazione del catione è inibita. La capacità antiossidante è calcolata quantitativamente in percentuale in rapporto con il controllo negativo. La vitamina C, un noto antiossidante liposolubile, è inserita nel test come controllo positivo.

In vitro methods to evaluate anti-oxidant, regenerating and anti-age properties of cosmetic products are of great interest to assess their protective effectiveness and stability. In this specific case, we investigated the antioxidant efficacy of samples of creams and their activity in counteracting oxidative stress and free-radicals release in the skin.

Oxidative stress is one of the main cause of the aging process and it is involved in the development of many serious human diseases. Exposure to UVA rays, pollutants, tobacco's smoke, as well as diet, drugs intake or pathologies can increase the level of oxidants in the skin cells or decrease the effectiveness of endogenous antioxidant systems.

Following exposure to oxidative stress Reactive Oxygene Species (ROS) formation, damages to the cells membrane and to DNA may occur in the cell, leading to cell transformation or even death. Anti-oxidant molecules such as vitamin A, C and E are often added to topical products to counteract the negative effect of oxidative stress and delay the cell aging process.

The aim of the present work was to investigate the anti-oxidant activity of a topical product through a spectrophotometric assay. In particular way, we evaluated the inhibition of a peroxide-induced chromogenic substrate (ABTS radical cation -2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) development. The colour development is inhibited when any antioxidant agent was added in the reaction. The anti-oxidant capability of the tested substance is measured as a percentage related to the negative control, while vitamin C, a well known liposoluble antioxidant, is used as a positive control.

Pag 6 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

2.2.1 Test di attività antiossidante/Antioxidant assay.

L'ABTS è una sostanza cromogena che può essere convertita nella sua forma monocationica radicalica (ABTS^{•+}) se trattata con un agente ossidante come l'acqua ossigenata (H₂O₂) in presenza di perossidasi. La forma radicalica dell'ABTS è colorata e presenta diversi picchi di assorbimento nel visibile, tra i quali uno a 405 nm.



L'aggiunta di sostanze antiossidanti, capaci di donare un elettrone o un atomo di idrogeno, inibisce la formazione dell' ABTS^{•+}. Seguendo nel tempo lo sviluppo di colore è possibile confrontare le cinetiche di reazione del campione nei confronti di un controllo positivo (vitamina C) e di un controllo negativo.

The ABTS is a chromogenic substrate that can be converted in the radical ABTS^{•+} following the treatment with an oxidant agent such as hydrogen peroxide (H₂O₂) with horseradish peroxidase. The radicalic form of ABTS is a chromogen that can be measured spectrophotometrically in the visible, with a peak at 405nm.



In the presence of antioxidant substances, being able to give an electron or an atom of hydrogen, this colour formation is inhibited. Following during time the development of colour is possible to compare the kinetics of reaction of the sample towards a positive (vitamin C) control and of a negative control.

2.2.2 Preparazione del campione /Sample preparation

Il campione è stato diluito in tampone fosfato alle seguenti concentrazioni: 50mg/ml, 25mg/ml e 10mg/ml. Come controllo negativo è stato utilizzato tampone fosfato. Il controllo positivo, cioè la vitamina C, è stata testata alla concentrazione di 10µg/ml.

The sample has been solubilized in phosphate buffer at the following concentrations: 50mg/ml, 25mg/ml and 10mg/ml. Phosphate buffer alone has been used as a negative control. The positive control, vitamin C, has been tested at 10µg/ml.

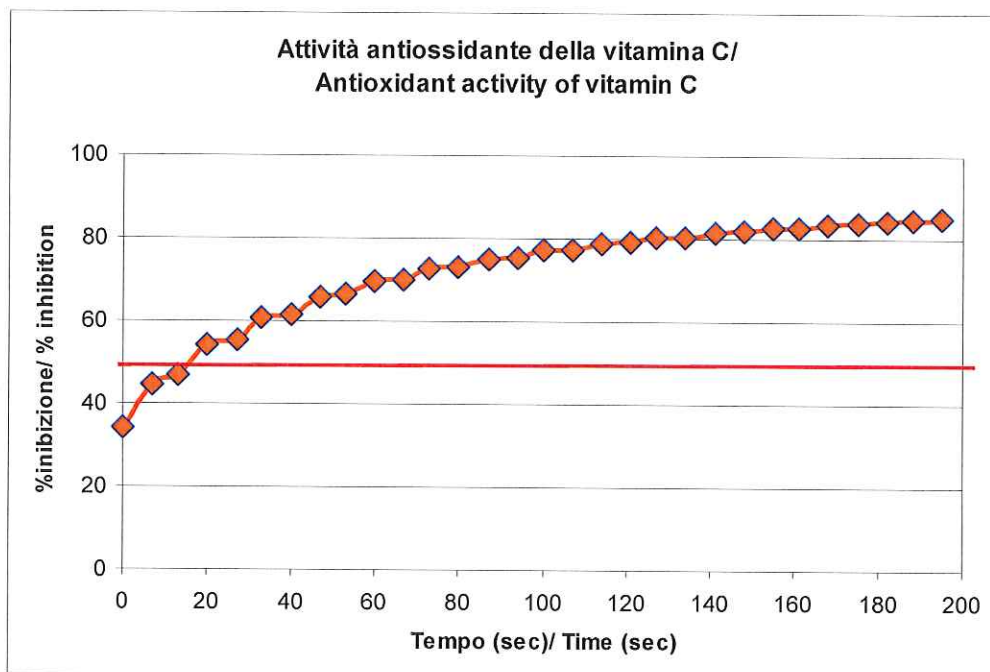


ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 *Attività antiossidante del controllo positivo/Positive control antioxidant activity*



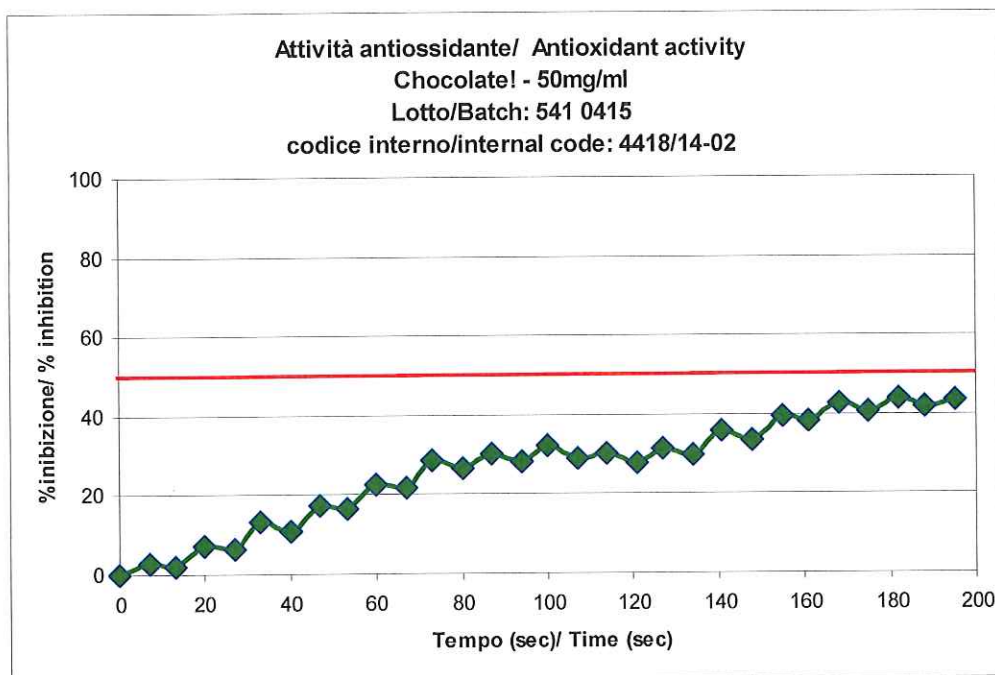
Alla concentrazione di 10 μ g/ml, dopo 20", la vitamina C è in grado inibire del 50% la reazione di ossidazione dell'ABTS. La sua efficacia antiossidante rimane elevata e stabile proseguendo la misurazione per 200". / After 20", at 10 μ g/ml concentration, vitamin E shows a 50% inhibition of the ABTS oxidation reaction. Its antioxidant activity is high and stable while measuring it up to 200 seconds.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3.2 Attività antiossidante del campione /Antioxidant activity of the sample

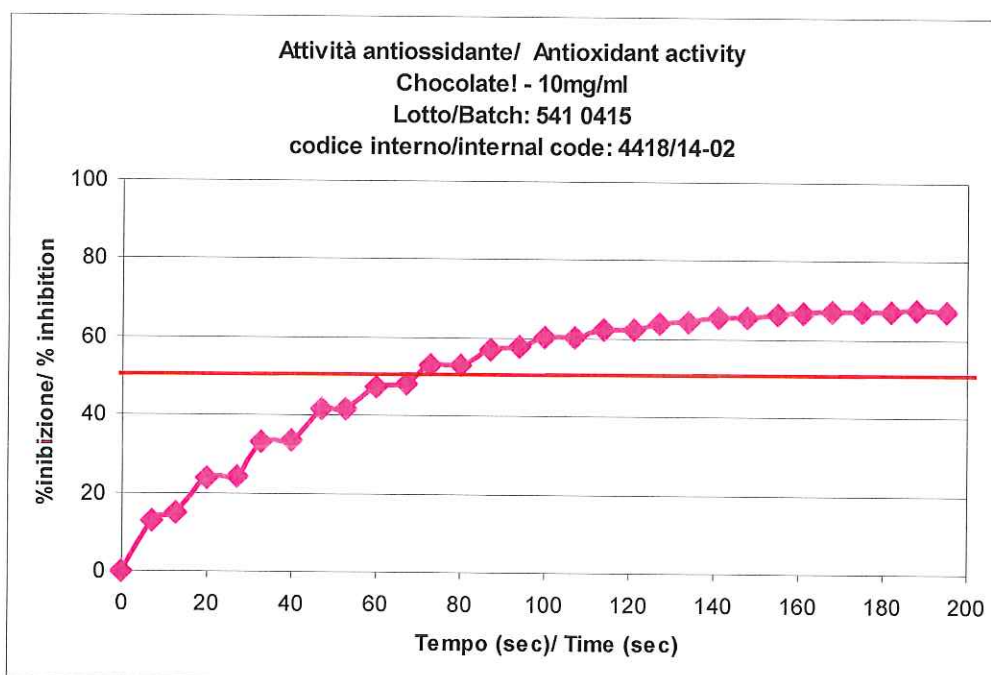
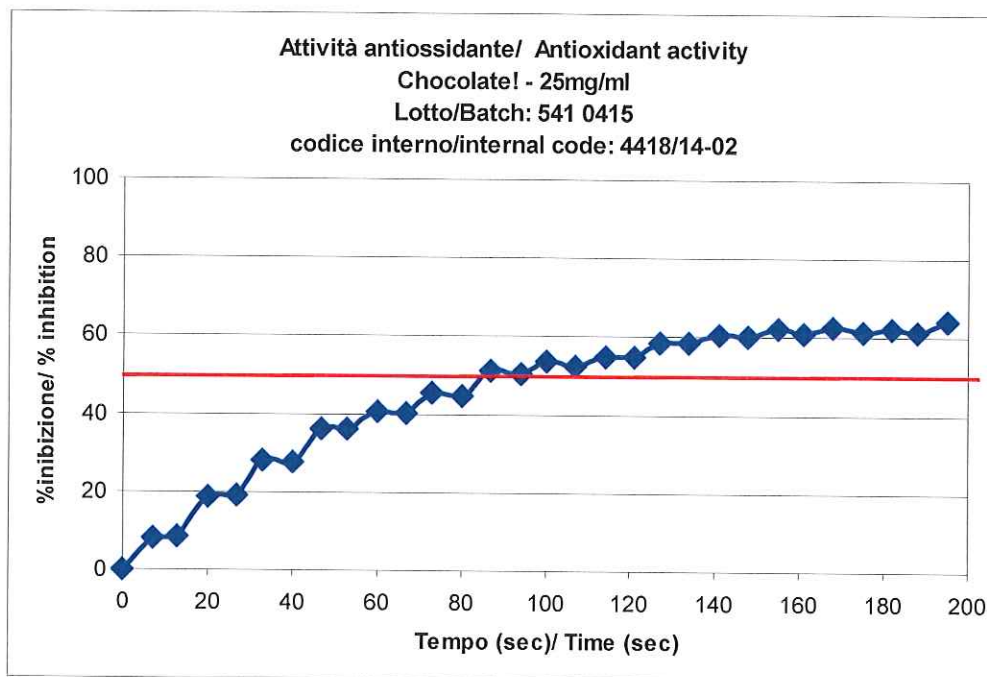


Il campione alla concentrazione di 50mg/ml mostra una leggera attività antiossidante non raggiungendo però il 50% di inibizione dopo 200" di reazione./ The sample at 50mg/ml shows a slight antioxidant activity not reaching the 50% of inhibition after 200" of reaction.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi





ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Commento/ Comment

Il campione alla concentrazione di 50mg/ml mostra una leggera attività antiossidante non raggiungendo però il 50% di inibizione dopo 200" di reazione./ The sample at 50mg/ml shows a slight antioxidant activity not reaching the 50% of inhibition after 200" of reaction.

Il campione testato alle concentrazioni di 25mg/ml e 10mg/ml mostra una buona attività antiossidante raggiungendo il 50% di inibizione dopo circa 70"/80" di reazione. La sua efficacia antiossidante aumenta proseguendo la misurazione per 200" (raggiungendo il 65-70% di inibizione)./ The tested sample at 25mg/ml and 10mg/ml concentrations shows a good antioxidant activity reaching the 50% of inhibition after 70"/80"" of reaction. Its antioxidant efficacy increase up to 200" (reaching 65-70% of inhibition).

3.3 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati sopra riportati il prodotto/On the bases of the results here shown, the product:

Chocolate!

Lotto/Batch: 541 0415

POSSIEDE CAPACITA' ANTIOSSIDANTE.

DOES SHOW ANTIOXIDANT CAPABILITY.

Data/Date: 07/07/2014



Il Supervisore scientifico/ Study Director
Dr. Elena Bocchietto

Pag 11 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev 03

www.abich.it

Direzione, uffici e
laboratorio analisi:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

Centro studi clinici e
cosmetologici:
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via dell'Industria, 29/2
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Pelle E., Mammone T., Marenus K., Diciano D. and Maes D. (2002) A Test for antioxidant activity in cosmetic formulations. *J. Cosmet. Sci* 53, 237-240
2. Nakagawa K., Fujii S., Ohgi A. and Uesato S. (2005) Antioxidative Activity of 3-O-Octanoyl-(+)-Catechin, a Newly Synthesized Catechin, in Vitro. *J. Health Sci.*, 51(4) 492-496
3. Asghar M.N., Khan I.U., Arshad M.N. and Sherin L. (2007) Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chim. Slov.* 54, 295-300
4. D. Villaño, M. S. Fernández-Pachón, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla (2004) The antioxidant activity of wines determined by the ABTS $\sqrt{+}$ method: influence of sample dilution and time. *Talanta* 64(2), 501-509.
5. Marý'a I. Gil, Francisco A. Toma's-Barberan, Betty Hess-Pierce, Deirdre M. Holcroft and Adel A. Kader. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581-4589
6. Mustafa Ozgen, R. Neil Reese, Artemio Z. Tulio Jr., Joseph C. Scheerens, and A. Raymond Miller. (2006) . Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (4), 1151 -1157.
7. Gao, Heng; Shupe, Todd F.; Hse, Chung Y.; Eberhardt, Thomas L. (2006) Antioxidant activity of extracts from the bark of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Holzforchung*, Vol. 60: 459-462
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* May;26(9-10):1231-7
9. Anna Gliszczyn'ska-Świgło (2005) Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food and Chem.* 96 (1) 131-136.
10. W. Russell McLauchlan, Julie Sanderson, Michael Quinlan, Gary Williamson (1998) Measurement of the Total Antioxidant Activity of Human Aqueous Humor. *Clinical Chemistry* 44, No. 4.

Pag 12 / 12
REL/1107/2014/FUNZ/ELB