

# **Eurol BT – Ingrediente Ativo Proveniente das Folhas da Oliveira Composto por um Blend Natural de Bioflavonóides e Polifenóis.**

**Feira Racine 09 de julho de 2009  
Prof. Cíntia Baradel**



# EUROL<sup>®</sup> BT

*Criado pela Natureza... Inovado pela B&T*

- Ingrediente ativo proveniente das folhas da Oliveira composto por um blend natural de bioflavónoides e polifenóis  
INCI: Olive Leaf Extract, Water

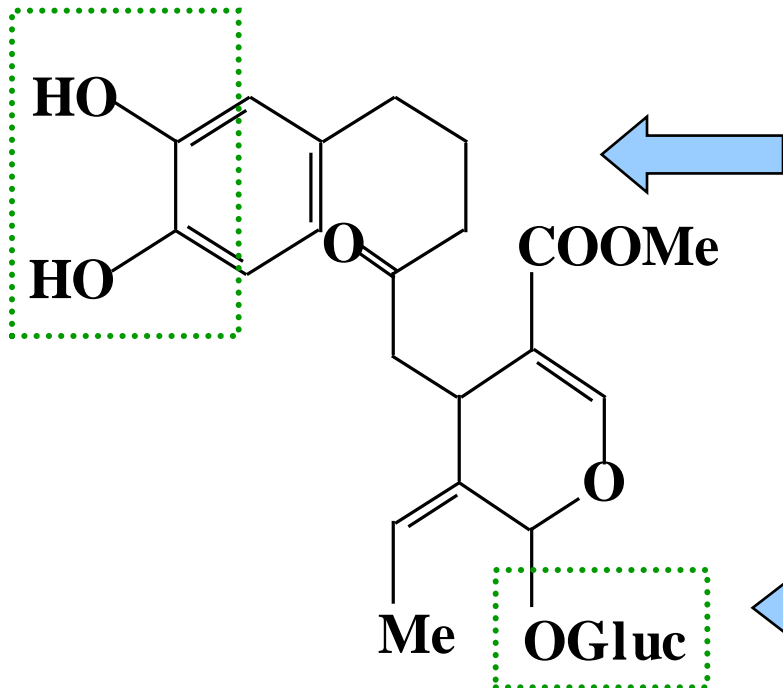
- Principais Propriedades:

- *preservative-free*
- antioxidante/*antiaging*
- hidratação/elasticidade
- bacteriostático
- despigmentante
- anti-irritante
- anti-inflamatório/anti-redness (IL-1)



## EUROL<sup>®</sup> BT

A estrutura mais representativa nas folhas da oliveira é a **OLEOEUROPEINE**, que tem a seguinte fórmula química:

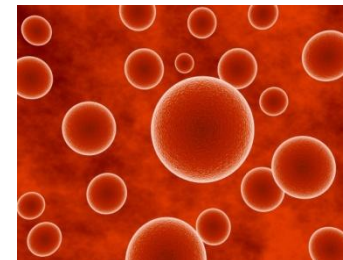


A parte mais importante da estrutura é a fração di-fenólica com ação contra os radicais livres

A parte glucosídica é responsável pela completa solubilidade em água de todo o extrato

# EUROL® BT

## **Estudo *in vitro*: Efeito contra os radicais livres do Eurol®BT em lipoproteínas do plasma**



**Aim:** to evaluate the antioxidation activity performed by Oleuropeina Towards plasmatic lipoproteins

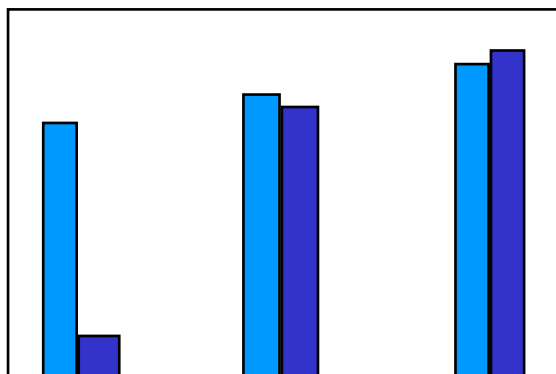
**Procedure:** inducing oxidation by CuSO<sub>4</sub> on plasma lipoproteins

**Results:** by HPLC the quality and quantity of extracted fatty acids have been evaluated

**Conclusions:** poliunsaturated fatty acids of plasma lipoproteins are protected against the action of the Oxidant by Eurol®BT

# EUROL® BT

## EPA, DHA, Linolenic Acid



Blank

Eurol®BT  
0.01%

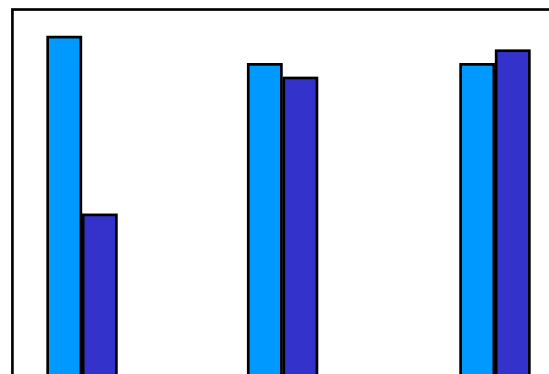
Eurol®BT 0.1%

- without CuSO4
- with CuSO4

**As frações Eicosapentanoico (EPA) (C20:5), Docosahexaenoico (DHA) (C22:6) e Ácido Linolenico diminuem 80% se não forem protegidas.**

iQ Soluções & Química S.A.

## Arachidonic Acid (C:20)



Blank

Eurol®BT  
0.01%

Eurol®BT 0.1%

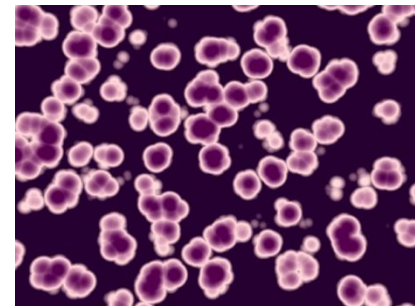
- without CuSO4
- with CuSO4

**Ácido Polinsaturado Aracídico (C20:4) diminui 50% se não for protegido.**

todo potencial da química®

# EUROL® BT

## Estudo *in vitro*: Efeito contra os radicais livres do Eurol®BT em células epiteliais humanas



**Aim:** checking antioxidant activity on complex Biological systems and non toxicity towards cells

**Results:** at the end of incubation analysis a microscopical observation was performed on cells. The analysis has been leaded in HPLC by quality and quantity on cell lysates, to evaluate the amount of fatty acids

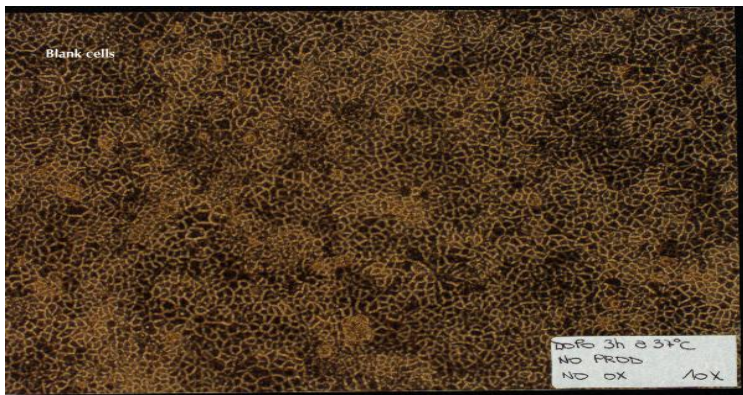
**Procedure:** inducing oxidation by terbuthylhydroperoxide” on fatty acids of cells membrane in a *in vitro* culture in order to mimic as closely as possible the *in vivo* situation

**Conclusions:** poliunsaturated fatty acids of cells membrane are protected Against the action of the oxidant by the Eurol®BT even when employed at very low dosages



## Observação ao Microscópio

### Blank cells



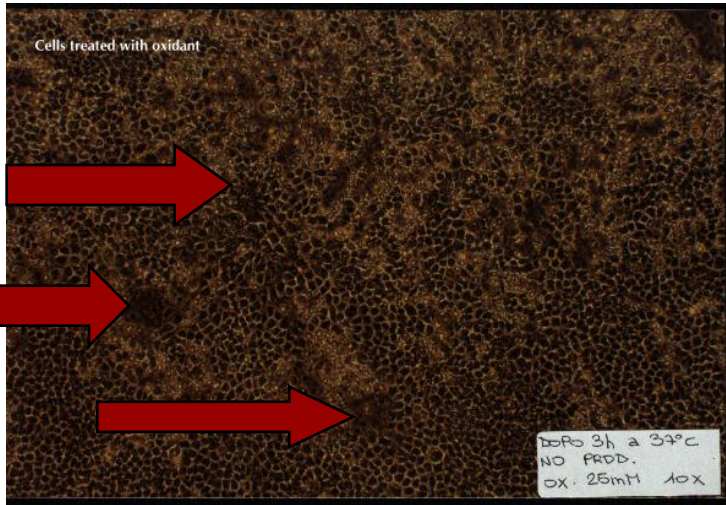
*Blank cells* e células tratadas com Eurol®BT são perfeitamente comparáveis

### Cel tratadas com Eurol®BT

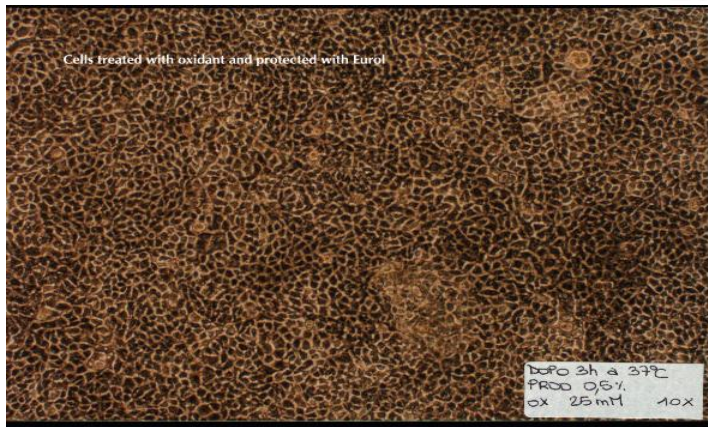


Eurol®BT não apresenta toxicidade nas células epitelias humanas *in vitro*

## Células tratadas com o oxidante



## Cel tratadas com oxidante + Eurol BT



iQ Soluções & Química S.A.

# OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO

O efeito tóxico criado demonstra visíveis danos como indicado na figura

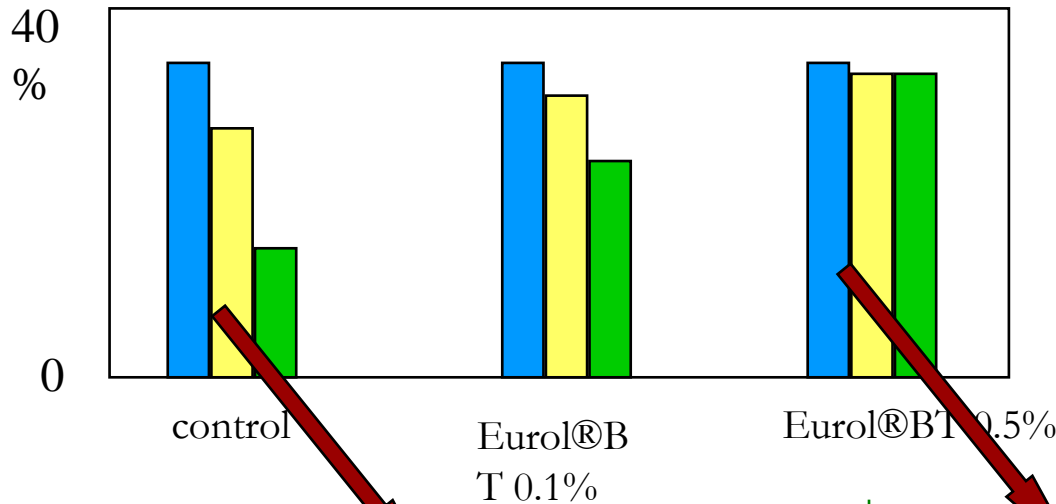
0,5% de Eurol®BT protege as células do efeito tóxico causado pelo oxidante

Essa imagem é perfeitamente comparável com a imagem das células não tratadas

todo potencial da química®

# EUROL® BT

## Ácidos graxos confirmam os resultados:



Ácidos graxos extratos das células lisadas confirmam a ação protetora do Eurol® BT não somente nas células, mas também nas estruturas dos ácidos graxos insaturados

- no oxidant
- oxidant 5mM
- oxidant 25mM

Tratamento com alta concentração de oxidante causa uma diminuição da concentração de ácidos graxos na amostra controle

quantiQ Soluções & Química S.A.

Tratamento com 0.5% de Eurol® BT previne até mesmo os danos oxidativos causados pela alta concentração de oxidante

todo potencial da química®



**EUROL® BT**

**Estudo *in vivo*:  
Avaliação da elasticidade e da hidratação  
na pele de voluntários humanos**



**Aim:** to evaluate the activity of Eurol®BT on Human skin in a Cosmetic form after long term use.

**Procedure:** volunteers use Eurol®BT in a cosmetic form for 6 weeks; measurements of skin hydration and elasticity are taken in two areas of the face, forehead and cheek

**Results:** Skin-hydration and Skin-elasticity measured by corneometer and cutometer.

**Conclusions:** skin hydration and skin elasticity sensitively increase on cheek and forehead, the two areas tested, as shown by Mathematical elaboration of the initial and final values.

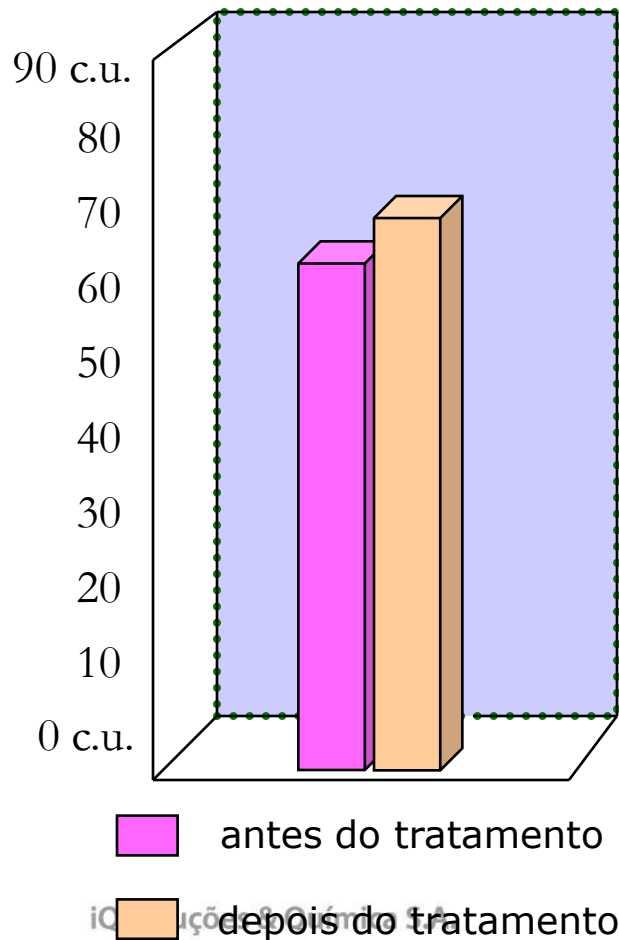


**EUROL® BT**

## TRATAMENTO:

- Human volunteers have been treated twice a day with a gel containing 0.5% of **Eurol®BT** .
  - The treatment lasted 6 weeks.
  - At the beginning and at the end of the treatment, instrumental measurements of skin hydration and elasticity are taken in two areas of the face: forehead and cheek.
  - The data obtained were then analyzed and statistically compared.

## HIDRATAÇÃO DA PELE



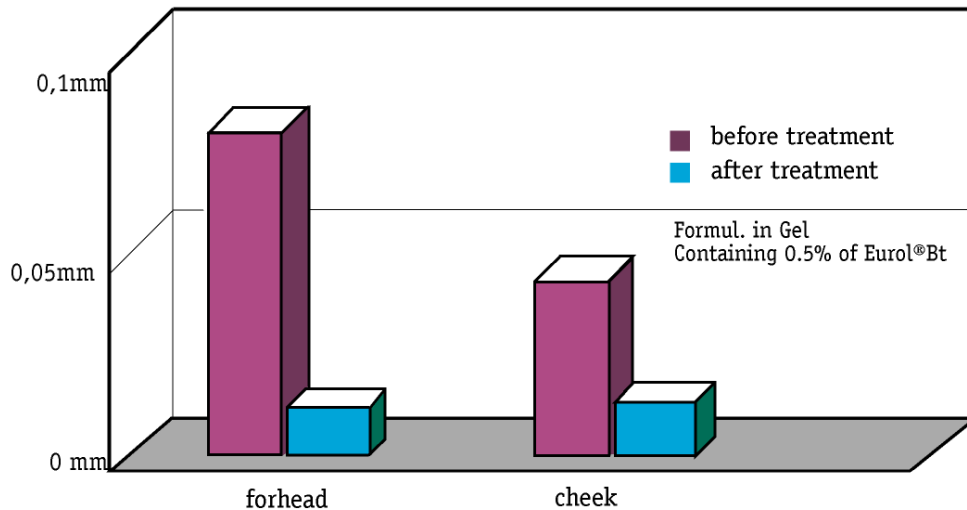
## EUROL® BT

Skin hydration is measured by a corneometer CM820: it consists of a square shaped sensor that, when pressed on the skin, indicates skin hydration expressing it in corneometrics units (c.u.)

### Hidratação da pele:

Foi registrado um aumento da hidratação da pele igual a **6.8%** depois do teste.

## ELASTICIDADE DA PELE



Melhoria do "retorno" da pele depois da sucção. Uma diminuição significativa da distância da posição original da pele: **64.3%** na bochecha e **81.1%** na testa.

iQ Soluções & Química S.A.

## EUROL® BT

Skin elasticity is measured by a cutometer SEM 474: it measures the stretch capacity and residual deformation of the skin. Skin surface is sucked into the opening of a measuring probe with a constant depression (350 mbar for 5 sec.). The air depression is then annulled and released skin can return to its original position

todo potencial da química®

**EUROL<sup>®</sup> BT****TESTE ANTI-MICROBICO**  
*In Vitro*

As Olive leaf is known to be resistant in nature to microbiological and insect attack, the research has been focused on the anti-microbial activity of compounds contained in Olives,

Olive Oil and Vegetal Waters.

SECOIRIDOIDES ( Oleuropein an derivatives ), besides the significative anti-oxidant efficacy, have been recently shown to inhibit or delay the rate of growth of a range of bacteria ( both gram + and gram -).

**EUROL<sup>®</sup> BT**

**MIC: MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION**

**EUROL<sup>®</sup> BT %**

Staphylococcus aureus	0.08%
Staphylococcus epidermidis	0.04%
Bacillus subtilis	0.08%
Escherichia coli	0.16%
Klebsiella pneumoniae	0.16%
Pseudomonas aeruginosa	0.16%
Pseudomonas cepacia	0.16%

**EUROL<sup>®</sup> BT** mostra uma atividade bacteriostática em baixa concentração.

**Estudo *in vitro***  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TIROSINASE**  
(Spectrophotometric assay for the assessment of tyrosinase inhibition)

**Principle of the method:**

TYROSINE - Tyrosinase Enzyme → L-DOPA - Tyrosinase Enzyme → L-DOPA-Quinone + 2 Hydrogen Ion (H<sup>+</sup>)

**SPECTROPHOTOMETRIC METHOD:**

\*Use Tyrosine as a substrate and bromophenol blue (BPB) as an H<sup>+</sup> acceptor.

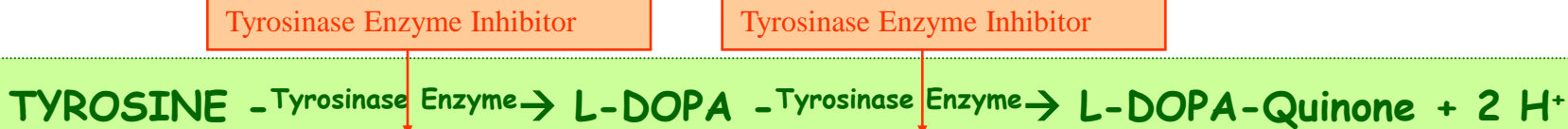
\*The activity of mushroom tyrosinase and the activity of potential inhibitors is evaluated through the spectrophotometric detection of the increased absorbance at 450 nm of the reduced form of BPB, both in presence and in absence of Eurol®BT (0.5% in water at pH 7.0).



## CASE 1)



## CASE 2)

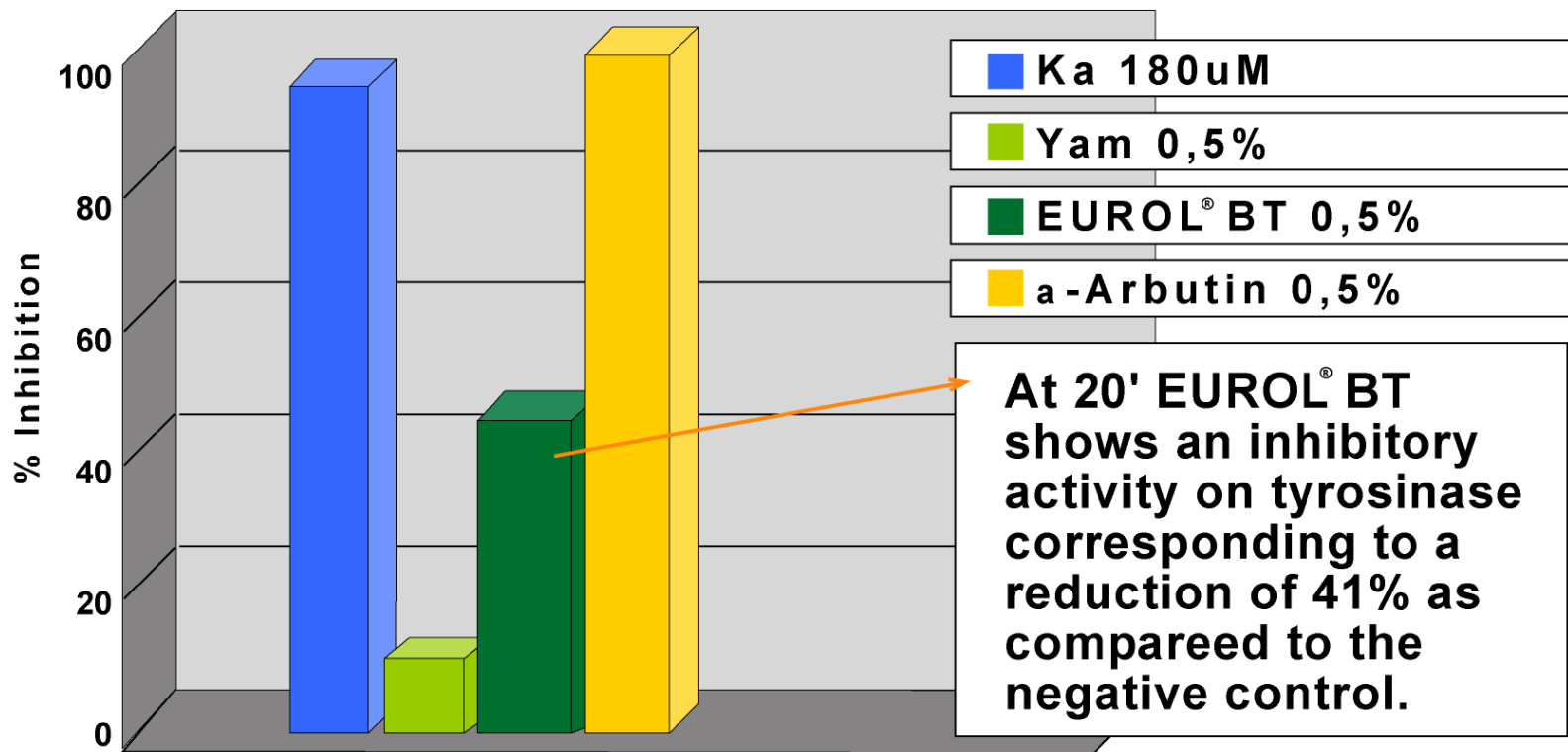


## AMOSTRAS TESTADAS:

PRODUTO	QUANT. TESTADA	ORIGEM	ATIVIDADE	DESVANTAGEM
ÁCIDO KÓJICO	180 µM	Aspergillus Oryzae	Inibe a enzima tirosinase quelando íons de cobre	Agente sensibilizante. Em altas concentrações exerce um efeito negativo na tireóide.*
YAM BEAN EXTRACT	0.5%	Pachyrhizus erosus	Inibi a enzima tirosinase	Baixa atividade
ALFA-ARBUTIN	0.5%	Arctostaphylos Uva-Ursi (Bearberry) & Ericaceae	Competidor do receptor da enzima tirosinase	Precursor da hidroquinona* (skin-irritating product)
EUROL® BT	0.5%	Olea Europaea (Olive) Leaf Extract, Water	Ingrediente multifuncional. <b>Também</b> inibe a enzima tirosinase.	-

\* Vielhaber, G. et al. IFSCC Magazine, vol 9, n 3, 227-234, 2006

# Efeito Inibitório do EUROL® BT contra a atividade da enzima tirosinase em 20 minutos (in %):





## RESULTADOS:

\* **EUROL®BT** INIBE A ENZIMA TIROSINASE SEM AFETAR NEGATIVAMENTE A PELE;

\* A ATIVIDADE DESENVOLVIDA PELA ALFA-ARBUTINA OU ÁCIDO KÓJICO É A MELHOR, MAS ESSA É A ÚNICA ATIVIDADE DESSES PRODUTOS E ELES TÊM IMPORTANTE DESVANTAGENS PARA A PELE;

• **EUROL®BT** É UM INGREDIENTE MULTIFUNCIONAL COM UM PERFIL SEGURO FUNCIONANDO TAMBÉM COMO "WHITENING SYSTEM".



## Estudo *In-Vitro*

# Avaliação da “Eye-irritation Potential” em shampoos contendo Eurol®BT

### SHAMPOO 1:

Sodium Lauroyl Glutamate	12.0%
Lauryl Glucoside	5.0%
Cocamidopropyl Betaine	8.0%
Sodium Laureth Sulphate	13.0%
Demineralized Water	up to 100

### SHAMPOO 2:

Sodium Lauroyl Glutamate	12.0%
Lauryl Glucoside	5.0%
Cocamidopropyl Betaine	8.0%
Sodium Laureth Sulphate	13.0%
<b>EUROL®BT</b>	<b>0.5%</b>
Demineralized Water	up to 100

**Objetivo do teste:** usado red blood cells para quantificar efeitos adversos dos surfactantes e detergentes produzidos na membrana citoplasmática (hemólise) em combinação com o dano celular (liberação de proteínas – denaturação).

### SHAMPOO 3:

Sodium Lauroyl Glutamate	12.0%
Lauryl Glucoside	5.0%
Cocamidopropyl Betaine	8.0%
Sodium Laureth Sulphate	13.0%
<b>EUROL®BT</b>	<b>1.0%</b>
Demineralized Water	up to 100

## RESULTADOS

The irritation index, Lysis / Denaturation ratio shows  
(higher denaturation, higher surfactants irritation, lower H/D ratio):

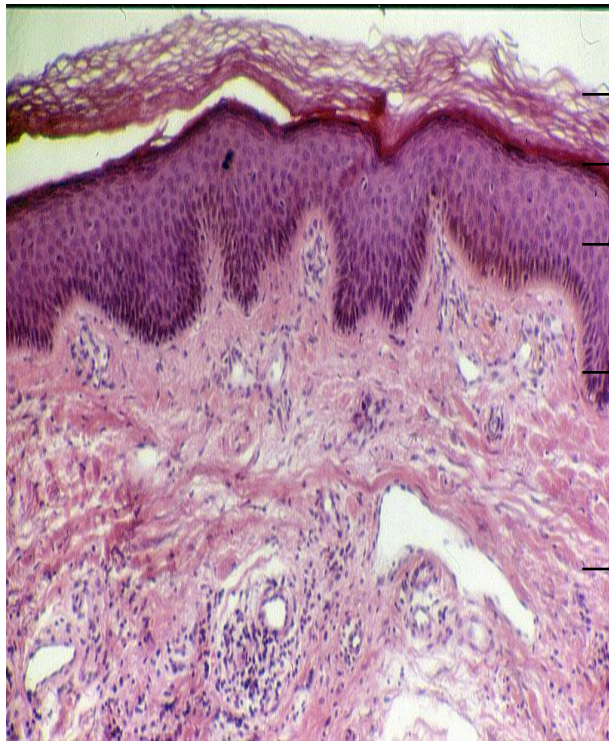
<b>SHAMPOO 1</b>	<b>H/D 41</b>
<b>SHAMPOO 2</b>	<b>H/D 58</b>
<b>SHAMPOO 3</b>	<b>H/D 92</b>
<b>SLS 1%</b>	<b>H/D 0.45</b>

## CONCLUSÕES

Nas condições ideais do teste, o SHAMPOO 2 contendo Eurol BT pode ser considerado **MENOS IRRITANTE** em relação ao SHAMPOO 1. O controle positivo, SLS 1%, mostrou ser irritante.

**Estudo *in vitro***  
**Avaliação do efeito anti-inflamatório do Eurol® BT**  
**em cultura de queratinócitos humana**

**Estrutura da pele**



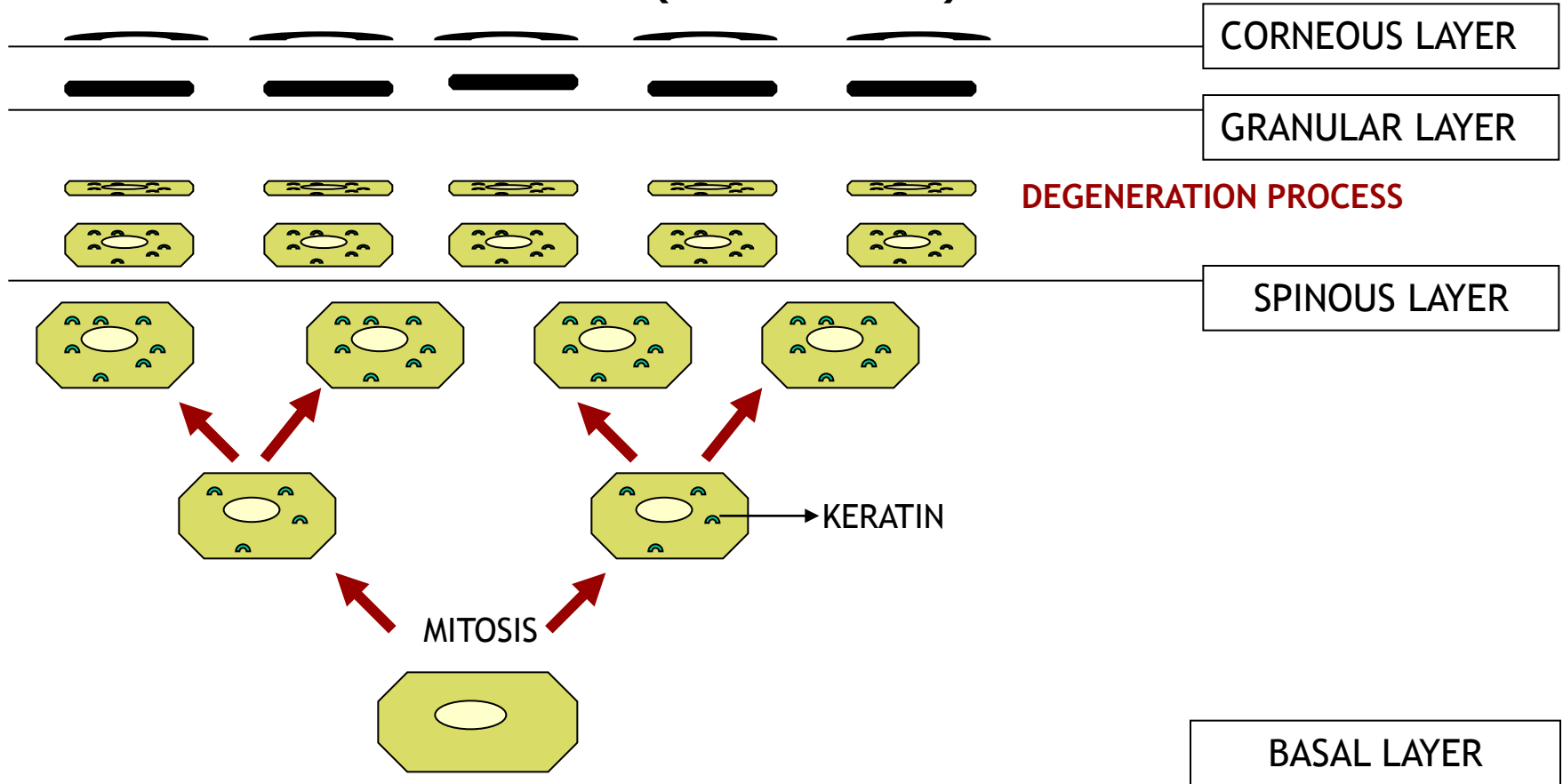
- Estrato Córneo
- Estrato Granuloso
- Estrato Espinhoso
- Células da camada basal
- **Derma**

**EPIDERME:**  
**QUERATINÓCITOS**

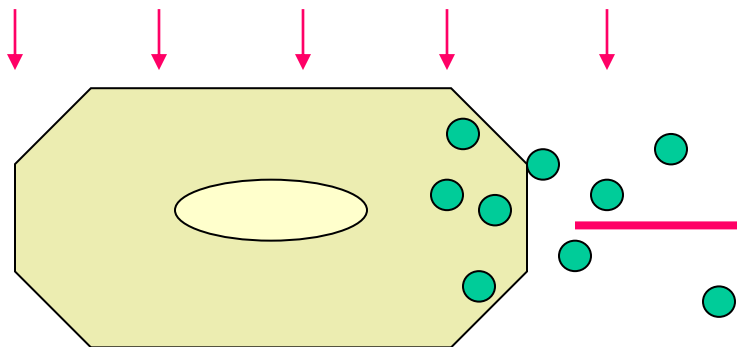


## CICLO DE VIDA DOS QUERATINÓCITOS

Lamellar bodies (Keratin bodies)

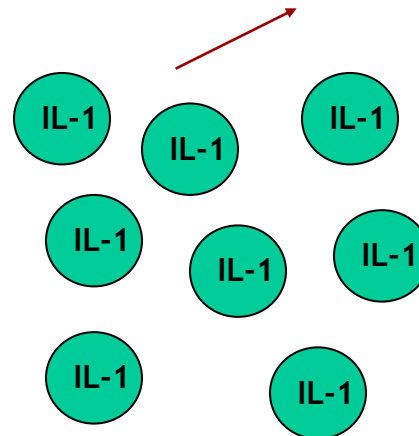


EXTERNAL PRO-INFLAMMATORY STIMULATION



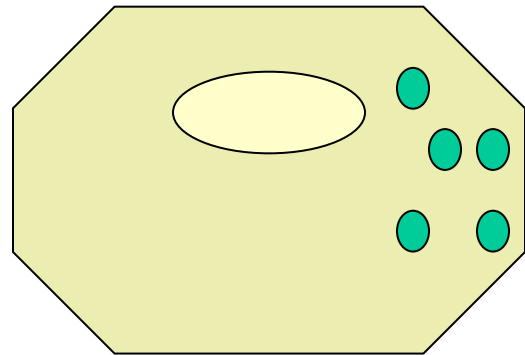
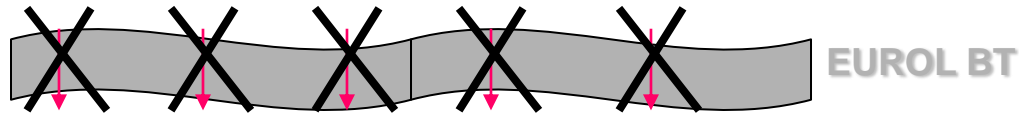
KERATINOCYTE Cell

(IL 1=Interleukin-1)

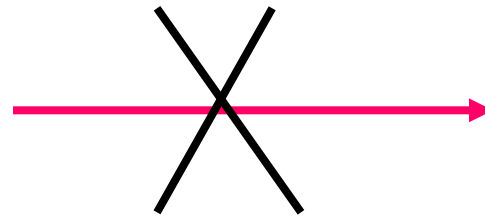


Inflammation  
Pathways

**EXTERNAL PRO-INFLAMMATORY STIMULATION**



**KERATINOCYTE**





## MATERIALS & METHODS:

HUMAN KERATINOCITES, cell line 2544 R<sub>14</sub>

CULTURE MEDIUM: DMEM – Glutamine 2 mM – Penicillin 50 UI/ml – Streptomycin 50 µg/ml – Foetal Calf Serum 10%

CULTURE: 37°C, 5%CO<sub>2</sub>

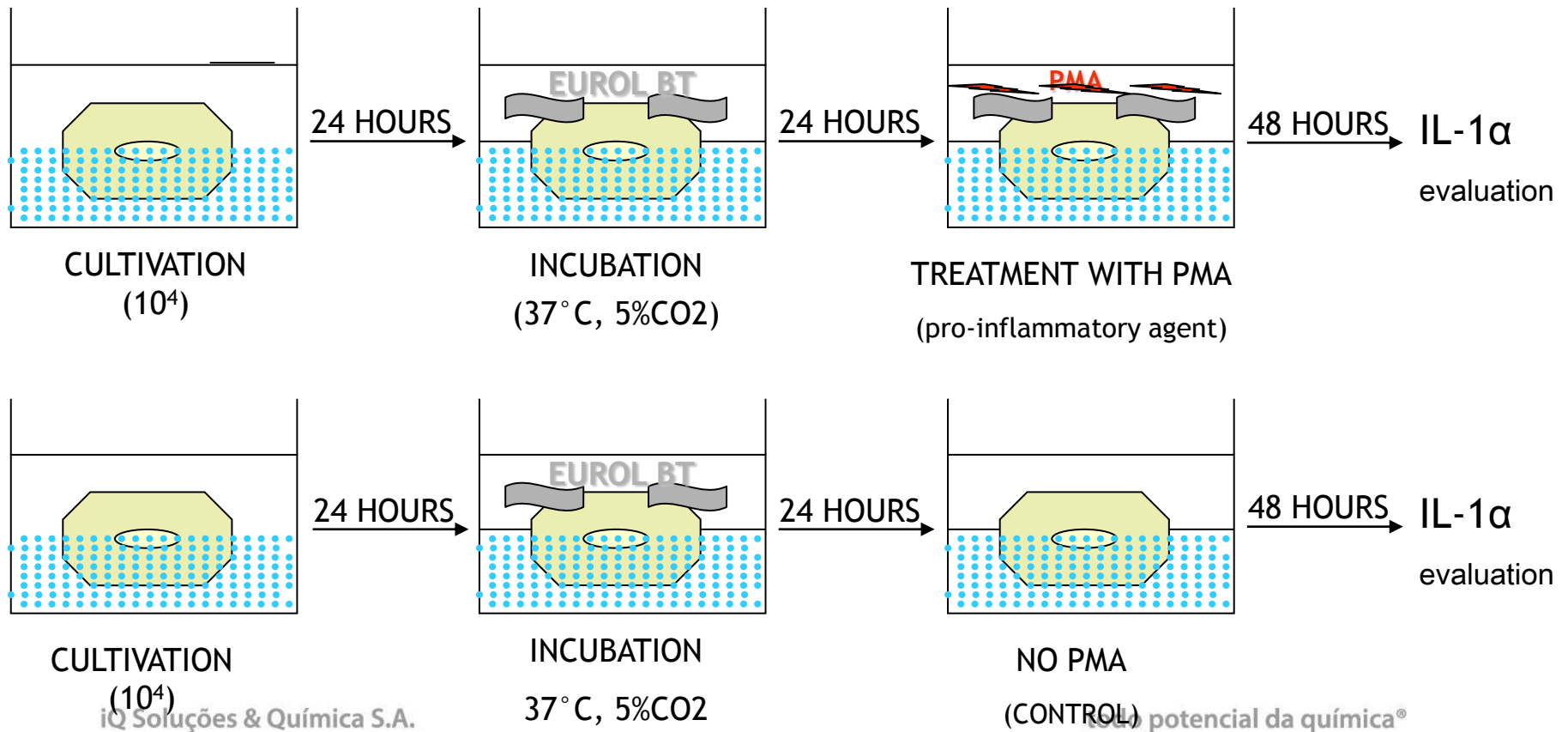
**EUROL®BT TESTED CONCENTRATIONS: 0.32x10<sup>-2</sup>, 1.60x10<sup>-2</sup>**

REFERENCE: DEXAMETHASONE 10<sup>-7</sup>M (compound well recognized for its anti-inflammatory effect via IL-1 inhibition - positive control).

ACTIVATOR SYSTEM:

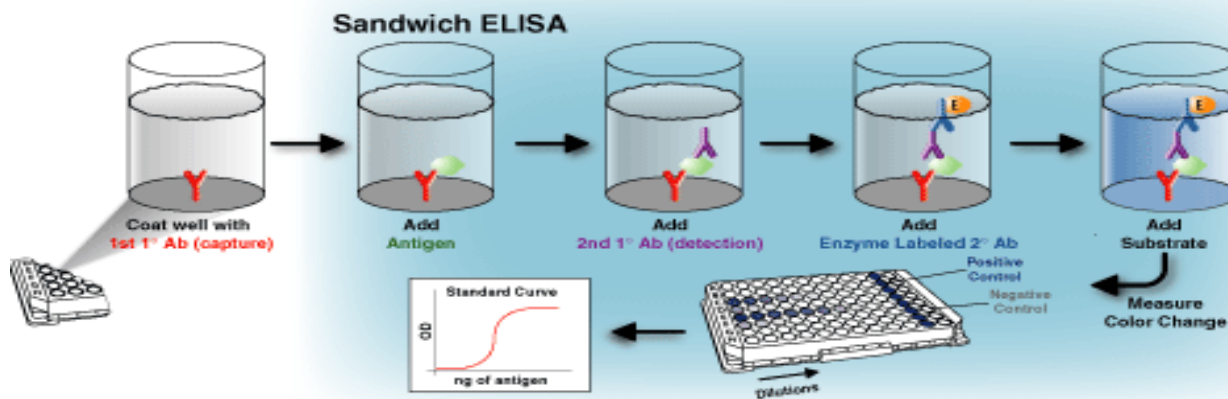
PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE (PMA) 0.1 µg/ml

# TRATAMENTO:



## PARAMETROS DE AVALIAÇÃO:

\*IL1alpha FROM THE COLLECTED MEDIA WAS MEASURED USING **ELISA KITS**:  
IL1alpha (Interleukin 1 alpha, cytokine pathway), Eli-par, Diaclone, ref. 851.600.010



\*RAW DATA WERE TRANSFERRED TO AND ANALYSED WITH PRISM software  
(Graph Pad Software)

\*THE INTER-GROUP COMPARISONS WERE PERFORMED BY VARIANCE ANALYSIS  
(ANOVA) FOLLOWED MULTIPLE COMPARISONS TEST OF DUNNETT

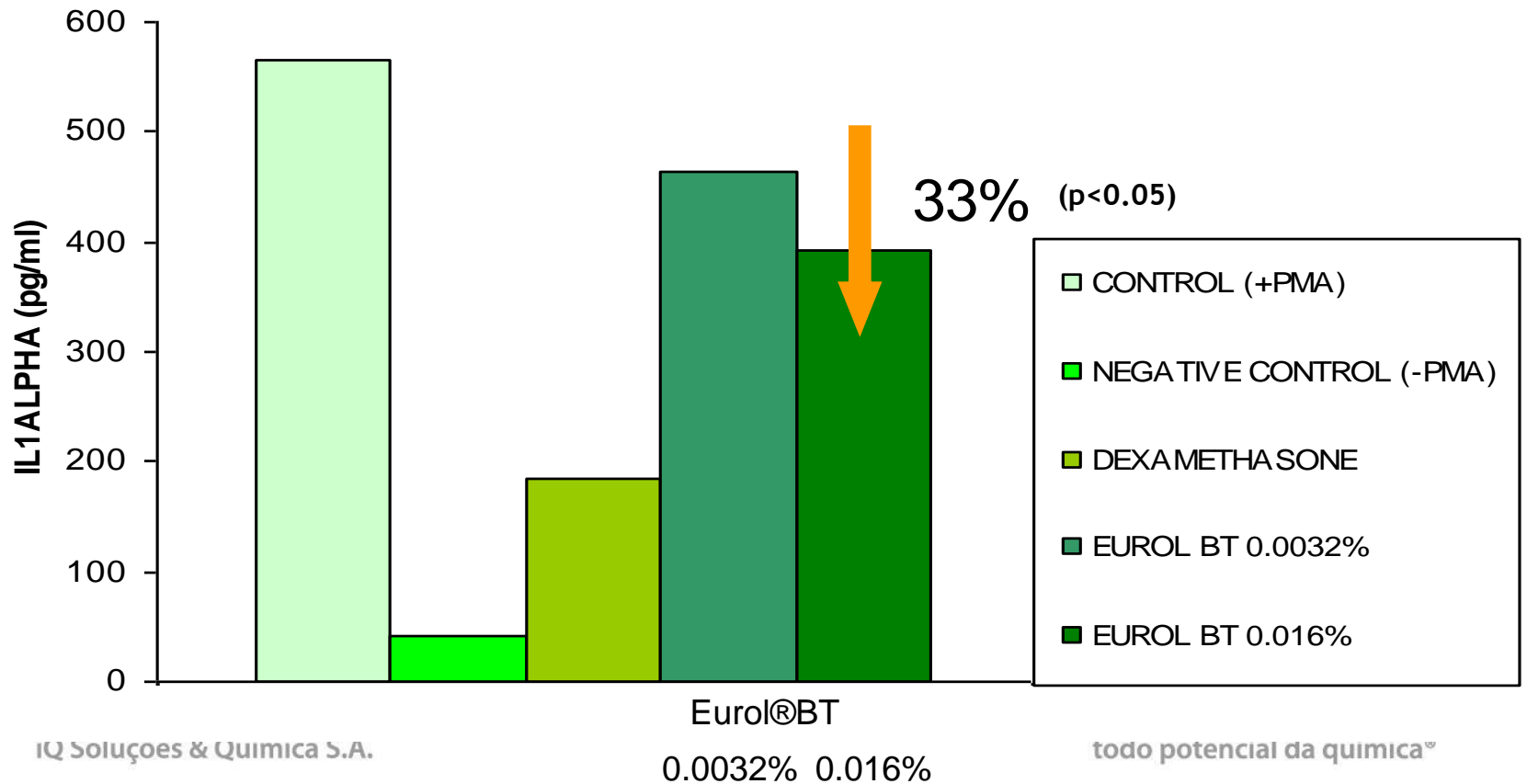
## RESULTADOS:

TREATMENT	CONCENTRATION	IL1ALPHA (pg/ml)	% IL-1 INHIBITION
CONTROL (+ PMA)	-	564.29	-
NEGATIVE CONTROL (- PMA)	-	40.76 <b>(p&lt;0.05)</b>	93%
DEXAMETHASONE (POSITIVE CONTROL)	10 <sup>-7</sup> M	185.53 <b>(p&lt;0.05)</b>	67%
<b>EUROL®BT</b>	<b>0.32x10<sup>-2</sup> %</b>	<b>464.87</b>	<b>17%</b>
<b>EUROL®BT</b>	<b>1.60x10<sup>-2</sup> %</b>	<b>393.38</b> <b>(p&lt;0.05)</b>	<b>33%</b>



# RESULTADOS:

## IL1ALPHA ASSAY (+PMA)



# EUROL® BT

## CONCLUSÕES

- \* 0.016% DE EUROL® BT INIBE 33% DA LIBERAÇÃO DA IL-1 ALPHA DOS QUERATINÓCITOS EM CULTURA (TESTE *IN-VITRO*)
- EUROL® BT FUNCIONA COMO UM AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO
- \* EUROL® BT PROTEGE A PELE DO PROCESSO ANTI-INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELA ACNE BACTÉRICA, PELES MUITO SENSÍVEIS, RAIOS UV, AGENTES EXTERNOS (VENTO, TEMPERATURA)....

**EUROL® BT**

## TESTES DE SEGURANÇA

**Red blood cell test**

**Patch test**

Testes in vivo e in vitro permitem definir **Eurol®BT** como  
**absolutamente seguro**, não irritante e não tóxico



## Red blood cell test *in vitro*

Irritation potential is evaluated through the interaction of Eurol®BT with red-blood cell membrane. Red blood cells are incubated with the product at appropriate dilution, hemolysis and denaturation are monitored photometrically.

index	class
> 100	not irritant
> 10	slightly irritant
> 1	moderately irritant
> 0.1	<b>strongly irritant</b>
< 0.1	<b>very irritant</b>

**RESULTADOS**  
**irritation index: non detectable**

Eurol®BT, according to data from literature, has a **DL 50 not detectable**, this means that it is **absolutely non toxic**.

Testes in vivo e in vitro permitem definir **Eurol®BT** como **absolutamente seguro**, não irritante e não tóxico



# EUROL® BT

## Patch test (Em voluntários humanos)

Eurol®BT, applied undiluted under occlusive conditions to intact back skin of 20 healthy volunteers, has shown the following irritation index

index	class
< 0.5	not irritant
0.5 - 2.0	slightly irritant
2.1 - 5.0	moderately irritant
<b>5.1 - 8.0</b>	<b>strongly irritant</b>

RESULTADOS  
15 minutos: 0.3  
24 horas: 0.3

Testes in vivo e in vitro permitem definir **Eurol®BT** como **absolutamente seguro**, não irritante e não tóxico



# MUITO OBRIGADA !

[cintia.baradel@quantiQ.com.br](mailto:cintia.baradel@quantiQ.com.br)