



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

Mestrino, 31 Maggio 2021

**TEST PREDITTIVO di IPOALLERGENICITA' mediante
PATCH TEST OCCLUSIVO a 72 ore
HYPOALLERGENICITY FORECAST TEST through 72-HOUR
OCCLUSIVE PATCH TEST**

Committente / Customer

**BLUGENIA Srl
VIA BERCHET, 11
35131 PADOVA PD
ITALIA**

Prodotto / Product

WAVE DETERSIVO IN FOGLI

Nostro rif. / Our ref. **ACC12305**

Lotto / Batch **0321**

Data accettazione / Acceptance date **05/05/21**

Applicazione / Application

T.Q.

Eseguito da/ Performed by

Dr. Matteo Bordignon

Presso / At

Eurochem Ricerche Srl
Viale del Lavoro, 6
Mestrino (PD)

Responsabile Laboratorio / Laboratory Manager

Dr. Roberto Zambonin

Responsabile dello Studio / Study Manager

CS

Data analisi / Analysis date

Dal / from 24/05/21 al / to 28/05/21



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

Indice / Index

1. Scopo del test / *Aim of the test*
2. Ricercatori / *Researchers*
3. Volontari / *Volunteers*
4. Campioni di prova e condizioni ambientali / *Samples and ambient conditions*
5. Procedura di prova / *Procedure*
6. Parametri di valutazione e score clinico / *Evaluation parameters and grading*
7. Calcolo del potenziale allergenico / *Calculation of allergenic potential*
8. Risultati / *Results*
9. Conclusioni dello studio / *Conclusions*
10. Dichiarazioni fornite dal cliente / *Customer declarations*
11. Bibliografia / *References*

1. SCOPO DEL TEST / AIM OF THE TEST

Il test predittivo di ipoallergenicità verifica, in una piccola popolazione di persone, se un prodotto provoca reazioni cutanee di tipo allergico in consumatori abituali di tali sostanze.

Gli ingredienti contenuti nei prodotti sono di uso frequente, pertanto i consumatori sono costantemente a contatto con essi, quindi a probabile rischio di avvenuta sensibilizzazione.

Per tutelare la salute dei soggetti che si sottopongono alla prova, lo studio predittivo di ipoallergenicità non prevede di sensibilizzare i volontari, ma considera eventuali sensibilizzazioni indotte da precedenti e costanti contatti con potenziali allergeni.

The hypoallergenicity forecast test aims to discover, in a small number of people, if a product induces cutaneous allergic reactions in usual consumers of those substances. Product ingredients are frequently used therefore the consumers are in constant contact with them and at probable risk of occurred sensitization.

In order to protect the subjects health, the hypoallergenicity forecast study does not involve the sensitization of the subjects skin, but takes into consideration the possible reactions induced by the product on possibly sensitized individuals which have been frequently exposed to potential common allergens.

2. Ricercatori / Study investigators

L'applicazione del prodotto viene eseguita da personale tecnicamente qualificato ed addestrato sotto la supervisione di un medico specialista in dermatologia. Le valutazioni cutanee vengono effettuate da un medico specialista in dermatologia.

The application of the product is made by technically qualified and trained persons with the supervision of a medical dermatologist. Skin evaluations are made by a dermatologist.

3. Volontari / Volunteers

Il test viene condotto su 20 volontari adulti ambosessi, selezionati dopo l'applicazione dei criteri di inclusione/non inclusione.

Vengono esclusi dal test:

- Bambini e minorenni;
- Donne incinte o in fase di allattamento;
- Portatori di dermatiti;
- Soggetti con anamnesi positiva per reazioni cutanee di tipo allergico;
- Soggetti in trattamento con antinfiammatori steroidei o non steroidei;
- Soggetti che abbiano partecipato a prove analoghe nel mese precedente.

Prima dell'inizio del test ai partecipanti viene reso noto, tramite scheda informativa, lo scopo e la natura dello studio e i possibili rischi derivanti dalla partecipazione allo studio.

Ai partecipanti viene altresì richiesto un consenso informato scritto alla sperimentazione.

Per ciascun volontario viene compilata una scheda che registra la data del test e i prodotti testati.



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

The test is run on 20 healthy volunteers of both sexes, selected after application of inclusion/non-inclusion criteria.

Subjects excluded are:

- Children and persons below the age of consent;*
- Pregnant or lactating women;*
- Subjects affected by dermatitis;*
- Subjects under anti-inflammatory drug therapy (either steroidal or non-steroidal);*
- Subject who participated in analogue tests in the last one month.*

Before the test starts, all participants are made aware of the purpose and nature of the study and of any foreseeable risks involved in participation in the study and give written informed consent to the experimentation.

A form registering the date and the product(s) tested is completed for each volunteer.

4. Campioni di prova e condizioni ambientali / Samples and ambient conditions

Il prodotto viene registrato nel programma informatico di accettazione di Eurochem Ricerche al momento dell'arrivo, e conservato a temperatura ambiente (a meno di specifica indicazione contraria del committente)

Il test viene svolto in ambiente condizionato a temperatura e umidità controllata.

Upon arrival, the product is registered on the Eurochem Ricerche data processing system and kept at room temperature (unless otherwise requested).

The test is performed in an air-conditioned room, with the room temperature and the relative humidity controlled.

5. Procedura di prova / Test Procedure

Il prodotto viene testato su almeno 20 volontari.

Considerata la particolare tipologia del campione (prodotto per il lavaggio dei tessuti) ed il suo normale impiego (utilizzo "in lavatrice"), che non prevede un contatto prolungato del prodotto con la cute se non accidentale, si utilizza una variante del metodo classico. Tale variante prevede il lavaggio di un tessuto standard (un fazzoletto bianco di cotone è particolarmente indicato per la prova) con le quantità indicate in etichetta a 50°C, e successiva applicazione del tessuto.

I campioni di tessuto devono essere preparati un giorno prima dell'esecuzione della prova.

Il tessuto così trattato viene quindi tagliato in pezzetti di circa 50 mm quadrati e conservato in contenitori di vetro opportunamente codificati.

Il campione viene deposto in Finn Chambers di alluminio, che vengono applicate sulla cute del dorso con cerotto poroso. In alternativa è possibile utilizzare i cerotti Curatest F.

I campioni liquidi vengono fatti assorbire su dischetti di carta filtro Whatman 3 di dimensioni uguali a quella della camera di alluminio. I detersivi vengono diluiti in acqua (1:10). Creme e lozioni sono applicate direttamente nella camera con una siringa monouso da insulina. Le polveri sono inumidite con acqua deionizzata e quindi applicate come descritto per le creme. Gli aerosol vengono spruzzati sulla carta da filtro e applicati come descritto per i liquidi, dopo aver lasciato evaporare il propellente.

La cute viene deterata con acqua. I cerotti vengono applicati in regione paravertebrale, a livello scapolare.

I campioni vengono lasciati in situ per 72 ore, ricordando al paziente di non lavare la zona per l'intera durata del test. La rimozione viene eseguita dallo sperimentatore, che provvede a ripulire le aree di applicazione da eventuali residui del prodotto.

The product is tested on 20 volunteers.

Considering the particular sample feature (fabric wash product) and its normal use (washing machine), that involves no prolonged skin contact if not accidental, a change of classical method is used. This change makes use of a standard fabric (a white cotton handkerchief is especially recommended for the test) washed with the labeled quantity of washing product at 50°C, and subsequent fabric application.

Fabric samples have to be prepared the day before test execution.

The prepared fabric is then cut in 50 square mm pieces and preserved in coded glass containers

The product is tested on 20 volunteers.



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

The sample is posed into aluminum Finn Chambers or Curatest F, and applied to the skin of the back .

Sample of the product have been applied following their usual use: as they are. Detergents are applied following their dilution to a 10% solution. Aqueous samples are left to absorb to Whatman 3 filter-blotting paper disks, similar in size to the aluminum chamber. Cream and lotion are directly applied into the Finn Chamber by using an insulin syringe. Powders are moistened with deionized water and applied as for cream. Aerosol products are sprayed onto blotting paper disks, after evaporation of the propellant are applied to the Finn Chamber. The involved skin area is cleaned with water. Plasters are applied to the paravertebral zone, at the interscapula level. The cosmetic products are left in contact with the skin surface for 72 hours. Removal of the Finn Chamber and cleaning of the skin area from residual cosmetic product is carried out by the experimenter.

6. Parametri di valutazione e score clinico / Evaluation parameters and grading

La valutazione delle reazioni viene fatta 15 minuti e 24 ore dopo la rimozione delle Finn Chambers (72 e 96 ore dopo l'applicazione del prodotto), seguendo la seguente scala di valutazione SIDAPA:

The visual assessment of skin irritation is made 15 minutes and 24 hours after removal of Finn Chambers (72 and 96 hours after product application), according to the following scoring scale SIDAPA:

Tab 1.

- (NR)	assenza di eritema no erythema
+/-	reazione dubbia Doubtful reaction
+	eritema uniforme, edema, eventuale papule o accenno a vescicolazione Homogeneous erythema, oedema, possible papules or hint of vesicles
++	eritema, edema, papule e vescicole evidenti, che possono debordare dall'area di applicazione erythema, oedema, strong papules and vesicles, that can overflow the application area
+++	eritema, edema, papule e vescicole molto evidenti, talvolta confluenti in bolle Erythema, oedema, very strong papules and vesicles, sometimes flowing together in bubbles

7. Calcolo del potenziale allergenico / Calculation of allergenic potential

Per il calcolo del **Potenziale allergenico** vengono considerate:

- Tutte le reazioni lievi o conclamate (da + a +++); indipendentemente che permangano o meno per almeno 24 ore).

Nel calcolo finale del numero di reazioni allergiche totali, una reazione che perdura nel tempo viene considerata una sola volta.

Dalla somma del numero di reazioni allergiche totali sopra indicate viene calcolata la conseguente percentuale di reazioni allergiche, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Percentuale di reazioni allergiche} = \frac{\text{N}^\circ \text{ reazioni allergiche totali}}{20} \times 100$$

I dati riportati nello studio si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi.

Il presente studio non può essere riprodotto parzialmente senza autorizzazione scritta del laboratorio.

Data reported in the study relate only to the analyzed sample.

This Study cannot be reproduced partially without written permission of the laboratory.



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

Vengono inoltre segnalate in tabella, sebbene esse non rientrino nel calcolo della presenza/attività di allergeni comuni, eventuali reazioni di natura irritativa.

Sulla base di dati riportati in letteratura e in relazione alla percentuale di manifestazioni allergiche ottenute, la presenza/attività di allergeni comuni (Potenziale Allergenico) del prodotto testato può essere considerata:

The following type of reactions are considered in detail for the Allergenic Potential calculation:

- Any type of reactions from + to +++ (which persist or not for at least 24 hours)

Reactions that persist for at least 24 hours are considered only ONCE in the calculation of total number of allergic reactions.

The percentage of allergic reactions is obtained on the basis of total allergic reaction cases, by means of the following mathematical calculation:

$$\text{Percentage of Allergic Reactions} = \frac{\text{total allergic reactions number}}{20} \times 100$$

Moreover possible irritative reactions are reported in the table, although they are not considered in the calculation of presence/activity of common allergens.

On the basis of the data reported in literature and according to the obtained percentage of allergic reactions, the presence/activity of common allergens (Allergenic Potential) can be considered:

<i>% di REAZIONI ALLERGICHE %of ALLERGIC REACTIONS</i>	<i>PRESENZA/ATTIVITA' di ALLERGENI COMUNI PRESENCE/ACTIVITY of COMMON ALLERGENS</i>
<i>0% ≤ 5%</i>	<i>NULLA/ NONE</i>
<i>>5% ≤ 10%</i>	<i>DEBOLE/MINIMUM</i>
<i>>10% ≤ 30%</i>	<i>LIEVE/MILD</i>
<i>>30% ≤ 50%</i>	<i>MODERATA/MODERATE</i>
<i>>50% ≤ 80%</i>	<i>FORTE/STRONG</i>
<i>> 80%</i>	<i>MASSIMA/MAXIMUM</i>

I dati riportati nello studio si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi.

Il presente studio non può essere riprodotto parzialmente senza autorizzazione scritta del laboratorio.

Data reported in the study relate only to the analyzed sample.

This Study cannot be reproduced partially without written permission of the laboratory.



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

8. Risultati/Results

Prodotto/Product: WAVE DETERSIVO IN FOGLI

POTENZIALE ALLERGENICO/ALLERGENIC POTENTIAL

N° di CASI TRATTATI <i>TOTAL NUMBER of SUBJECTS:</i>	20
N° di REAZIONI ALLERGICHE TOTALI (*) <i>TOTAL NUMBER of ALLERGIC REACTIONS (*)</i>	0
PERCENTUALE di REAZIONI ALLERGICHE <i>PERCENTAGE of ALLERGIC REACTIONS</i>	0%

N° di reazioni irritative osservate <i>N° of irritative reactions observed</i>	0
---	----------

(*) vengono considerate tutte le reazioni da + a +++ (perdurate o non perdurate nel tempo)

(*) only the reactions from + to +++ (that are detectable or not after 24 hours) are considered.

Una reazione che perdura nel tempo viene considerata UNA SOLA VOLTA nel numero di manifestazioni allergiche totali e nel calcolo della percentuale.

Reactions that persist for at least 24 hours are considered only ONCE in the calculation of total number of allergic reactions.

9. CONCLUSIONI/CONCLUSIONS

Tutti i soggetti selezionati per la prova hanno completato il test.

Il prodotto è stato testato in occlusione per 72 ore su 20 volontari sani. Il controllo effettuato a 24 ore dalla rimozione dell'occlusione ha fornito il seguente risultato:

All the selected subjects completed the test.

The product was tested under occlusive conditions for 72 hours on 20 healthy subjects. The check performed 24 hours after the occlusion removal yielded the following result:



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

Prodotto/Product: WAVE DETERSIVO IN FOGLI

% di REAZIONI ALLERGICHE	0%
% of ALLERGIC REACTIONS	

Non si sono osservate reazioni di tipo irritativo.

No irritative reaction was observed.

10. Dichiarazioni fornite dal cliente / Customer declarations

Dichiarazione che il prodotto cosmetico sottoposto a test ottempera al Regolamento CE sui cosmetici e in particolare che:

- non contiene alcuna sostanza di cui è proibito l'uso in prodotti cosmetici. (allegato II)
- non contiene alcuna sostanza utilizzata sopra i limiti previsti dal Regolamento cosmetico (allegato III)
- i coloranti, i conservanti e i filtri UV impiegati nel prodotto figurano nelle liste positive approvate nella CE e sono utilizzati ad una concentrazione conforme all'uso previsto dal Regolamento cosmetico (allegati IV – V – VI)
- il prodotto e i suoi componenti sono stati analizzati da un esperto qualificato al fine di garantire che le informazioni esistenti sul prodotto e sui suoi componenti giustificano l'esposizione all'uomo e che non ci si attende alcun rischio significativo per i volontari nelle condizioni dello studio proposto e che si ricorre al patch test allo scopo esclusivo di confermare tali conclusioni.

Declaration that the tested cosmetic product is approved by the Regulation EC and in particular:

- *the product doesn't contain substances prohibited in cosmetic products by the Regulation EC (annex II)*
- *the product doesn't contain substances not in accordance with the restriction of the Regulation EC (annex III)*
- *the colorants, preservatives and UV filters inserted in the product are included in the positive list and they are used at a concentration provided for by the Regulation EC(annex IV-V-VI)*
- *The test product and its constituents have been reviewed by a safety expert to ensure that the existing information on the product and on its constituents (as the general toxicological profile of the ingredients, their chemical structure and the exposure level) justifies human exposure and that no significant risk for the volunteers is to be expected under the condition of the proposed study).*

Il Responsabile di Laboratorio

Laboratory Manager

Dr. Roberto Zamborin

Il Direttore del Laboratorio

Laboratory Director

Stefano Pandolfo

Il Dermatologo

Dermatologist

Dr. Matteo Bordignon



Eurochem Ricerche S.r.l.

Analisi, ricerca e sviluppo, consulenza

Viale del Lavoro, 6 – 35035 Mestrino (PD) – ITALY

Tel. +39 049 9002844 – Fax +39 049 6458057

info@eurochemricerche.it www.eurochemricerche.it

Studio / Study n°RAP13071

11. Bibliografia / References

Seidenari S. Diagnostica non invasiva in dermatologia. Ed. EDRA 1998

Serup J, Jemec G B E. Handbook of non-invasive methods and the skin. CRC Press, Inc. 1995

Angelini G, Bonamonte D, Cassano N, Foti C, Grandolfo M. Dermatiti da contatto. Clinica Dermatologica Università di Bari 1999.

Sertoli A, Fabbri P. I test epicutanei nella diagnostica e nella ricerca allergo immunologica. Edizioni Medicea. Firenze 1977

Jackson E M. Irritation and sensitization, in Cosmetic Science and Technology Series. Marcel Dekker Inc. 1990: 8: 23-42.

Pelfini C. Effetti indesiderati da cosmetici: dall'indagine sulla popolazione ai test epicutanei. Cosmesi Dermatologica 1990: 32: 51-62.

Veraldi S, Bigardi A. I test epicutanei. Doctor Dermatologia. Nov-Dic. 1991: 13-17.

Test guidelines for the assessment of human skin tolerance of potentially irritant cosmetic ingredients – COLIPA Guidelines. August 1997.

Cosmetic product test guidelines for the assessment of human skin compatibility – COLIPA Guidelines. August 1997.

Bonomonte D et al. La rilevanza clinica nella dermatite allergica da contatto: proposta di scoring. Annali italiani di Dermatologia allergologica clinica e sperimentale. 2006: 60: 41-46