Tossicologia Sistemica: Rilevanza per la valutazione della sicurezza di un prodotto cosmetico

Corso Valutatore della Sicurezza dei Prodotti Cosmetici

Sestri Levante, 11 - 16 Ottobre 2026

ARGOMENTI TRATTATI

- ✓ **Importanza della tossicocinetica: assorbimento percutaneo;**
- ✓ **Importanza della tossicocinetica: il metabolismo;**
- ✓ **Valutazione della tossicità sistemica;**
- ✓ **Principi di tossicologia genetica: meccanismi ed interpretazione dei risultati**

Prof. Luca Ferraro

Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie

Sezione del Farmaco e Prodotti della Salute

Università degli Studi di Ferrara

Tel: 0532-455276

E-mail: frl@unife.it

CONTENUTI



- ✓ Tossicologia e classificazione degli effetti tossici;
- ✓ Tossicocinetica - Assorbimento cutaneo, percutaneo, orale o per altre vie di somministrazione;
- ✓ Metabolismo (Biotrasformazione): cutaneo, orale o per altre vie di somministrazione;
- ✓ Valutazione della tossicità locale e tossicità sistemica;
- ✓ Tossicità sistemica: NOAEL, LOAL, BMD, TTC (Point of Departure – POD), calcolo dell'esposizione alle sostanze (SED: Systemic Expoxure Dosage) in seguito a dosi singole/ripetute;
- ✓ Valutazione della sicurezza (MOS = Margin of Safety) ed importanza del *Reasoning*;
- ✓ Principi di tossicologia genetica: meccanismi ed interpretazione dei risultati.

RILEVANZA PER LA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA DI UN PRODOTTO COSMETICO

In general, the safety evaluation of cosmetic ingredients by the SCCS is based upon the principles and practice of the risk assessment process universally applied for chemical substances with the challenge that only validated replacement methods (or demonstrated to be scientifically valid) should be used when testing for the purposes of the EU cosmetic legislation.

The safety of cosmetic ingredients is evaluated by exposure-driven risk assessment on the basis of toxicological data.

Valutazione del rischio

Un processo suddiviso in 4 fasi:

- ✓Identificazione del pericolo (usato per la classificazione e l'etichettatura)
- ✓Relazione dose-risposta
- ✓Valutazione dell'esposizione
- ✓Caratterizzazione del rischio

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

Valutazione del rischio

Un processo suddiviso in 4 fasi:

- Identificazione del pericolo (usato per la classificazione e l'etichettatura)
- Relazione dose-risposta
- Valutazione della esposizione
- Caratterizzazione del rischio

A typical safety evaluation procedure comprises the following elements:

1) Hazard identification is carried out to identify the intrinsic toxicological properties of the substance, *i.e.* whether it has the potential to damage human health. It is based on the results of *in vivo* tests, *ex vivo, in vitro* tests, *in silico* methods and read-across, clinical studies, case reports, epidemiological studies and data from Post-Marketing Surveillance (PMS). Intrinsic physical and chemical properties of the substance under consideration are also taken into account.

2) Exposure assessment
Human exposure is calculated based on the declared functions and uses of a substance as cosmetic ingredient, the amount present in the respective cosmetic product categories and their frequency of use.

The single product exposure describes the exposure to a cosmetic ingredient in one product category *via* one route.

The aggregate exposure, in the context of the NoG, is the sum of all relevant single product exposures, so that it describes the exposure from all product categories in which the cosmetic ingredient is used and all relevant exposure routes

Where necessary, exposure of vulnerable consumer groups could be assessed separately (*e.g.* children, pregnant woman, etc.)

Generally, only exposures from the use of a substance as cosmetic ingredient are considered, with the exception of CMR compounds, for which non-cosmetic uses should also be taken into account (see section 3-6.6 and **Appendix 5**).

3) Dose-response assessment
For the relationship between the exposure and the toxic response, a Point of Departure (POD) is determined. The POD is defined as the dose-response point that marks the beginning of a low-dose extrapolation (for threshold and non-threshold compounds). In most Opinions a No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) has been used as POD.

4) Risk characterisation

In risk characterisation, the focus in the NoG is on systemic effects. In the case of a threshold effect, the Margin of Safety (MoS) is mostly calculated from oral toxicity studies, unless robust dermal toxicity data are available1. In the case of an oral toxicity study, the following equation is used:

$$MoS = \frac{POD_{sys}}{SED}$$

RILEVANZA

INFORMAZIONI RICHIESTE

3-5.1 General requirements

When a dossier of a cosmetic ingredient is submitted for evaluation, the SCCS should be provided with the information set out below (the order is as given in **Appendix 2**):

1. *Acute toxicity (if available);*
2. *Irritation and corrosivity (skin and eye);*
3. *Skin sensitisation;*
4. *Dermal/percutaneous absorption; other toxicokinetic data (if available)*
5. *Repeated dose toxicity;*
6. *Mutagenicity / genotoxicity;*
7. *Carcinogenicity (if available);*
8. *Reproductive toxicity (if available);*
9. *Photo-induced toxicity;*
10. *Human data (if available).*
11. *Special investigations.*

TOSSICOLOGIA COSMETICA: DALLE EVIDENZE STORICHE AI NUOVI METODI

Dati tossicologici tradizionali

- Studi animali storici e dati disponibili da altri ambiti regolatori, quando utilizzabili
- Identificazione degli organi bersaglio e degli effetti critici
- Determinazione di NOAEL, LOAEL e BMDL

Valutazione della sicurezza attuale

- Metodi in vitro e modelli in silico
- Read-across e approcci integrati (IATA)
- Modelli tossicocinetici e valutazione dell'esposizione
- Next Generation Risk Assessment (NGRA)

Principio fondamentale: il divieto di nuovi test animali per finalità cosmetiche non elimina il valore scientifico dei dati tossicologici già disponibili.
I dati animali costituiscono ancora un riferimento per interpretare i nuovi metodi e hanno contribuito allo sviluppo e alla valutazione dei metodi alternativi.

Oggi **l'obiettivo** è integrare dati esistenti, metodi in vitro, modelli in silico, approcci NAM (New Approach Methodologies) e altre evidenze scientifiche, riducendo progressivamente la dipendenza dai dati animali.

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

The safety of cosmetic ingredients is evaluated by exposure-driven risk assessment on the basis of toxicological data.

Studi di tossicità sistemica

Tossicocinetica

Tossicologia

TOSSICOLOGIA: scienza che studia la natura e i meccanismi degli effetti avversi (tossici) indotti da sostanze chimiche su sistemi biologici

Valutare la **probabilità d'insorgenza di danni alla salute a determinate esposizioni**
(stima quantitativa del **rischio**)

TOSSICO o VELENO

Tossico: sostanza con proprietà dannose **dirette** o **indirette**

"Tutte le sostanze sono dei veleni; non ne esiste una che non sia un veleno.
La giusta dose differenzia un veleno da un rimedio".



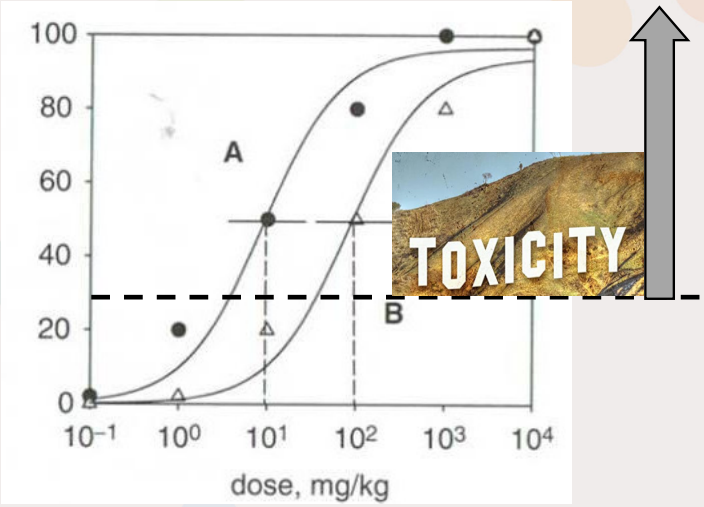
Philippus Aureolus Theophrastus
Bombastus von Hohenheim
detto Paracelsus o Paracelso (1493-1541).

La tossicità è funzione della concentrazione (**esposizione**)

TOSSICITA’

Il **paradigma base** della tossicologia è: la risposta di un organismo ad una sostanza chimica aumenta **proporzionalmente alla dose di esposizione**.

Questo determina una relazione **dose-risposta monotonica**, nella quale l’effetto aumenta nell’intervallo di dosi possibili senza cambiare direzione.



Per le sostanze chimiche **senza potenziale genotossico** esiste una **dose soglia** al di sotto della quale non ci sono effetti avversi

CLASSIFICAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI

LOCALI
danno nel punto di contatto: sostanze caustiche ingerite, gas e vapori irritanti inalati
Irritazione cutanea (cosmetici)

⟺

SISTEMICI
l'effetto si manifesta dopo l'assorbimento e la distribuzione

IMMEDIATI
l'effetto è rapido, dopo una singola esposizione (CN^-)

⟺

RITARDATI
l'effetto si manifesta dopo un lungo periodo dall'esposizione iniziale (sost. cancerogene)

SINGOLA ESPOSIZIONE
Tossicità acuta

⟺

SOMMINISTRAZIONI RIPETUTE
Tossicità da somministrazioni ripetute

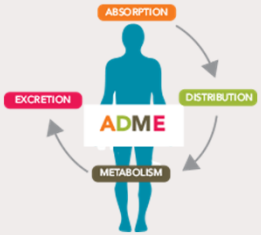
REVERSIBILI
l'effetto scompare quando cessa l'esposizione, il tessuto danneggiato può essere riparato

⟺

IRREVERSIBILI
il danno è permanente (cirrosi, neoplasie, mutagenesi)

TOSSICOLOGIA

TOSSICOLOGIA GENERALE



TOSSICOCINETICA
• **A**ssorbimento; **D**istribuzione; **B**iotrasformazioni; **E**liminazione

TOSSICODINAMICA
• meccanismi d'azione

TOSSICOLOGIA SISTEMICA

EFFETTI DEI TOSSICI SUI VARI ORGANI E APPARATI

TOSSICOLOGIA SPECIALE

MoA

EFFETTI DELLE PRINCIPALI CLASSI DI SOSTANZE TOSSICHE

PROTOCOLLO TOSSICITA' SISTEMICA

TOSSICOCINETICA
Assorbimento; Distribuzione;
Metabolismo; Eliminazione



TOSSICITA' ACUTA
DL_{50} orale
DL_{50} cutanea
CL_{50} inalatoria
Irritazione cutanea
Irritazione oculare
Sensibilizzazione cutanea
Sistemica

GENOTOSSICITA'
Mutagenesi
Clastogenesi
Aneuplodia
Poliplodia

TOSSICITA' DELLO SVILUPPO
Teratogenesi (Ratto, Coniglio)

TOSSICITA' DELLA RIPRODUZIONE

TOSSICITA' A MEDIO TERMINE
Topo: 90 giorni
Ratto: 90 giorni
Cane: 6 mesi -1 anno

TOSSICITA' A LUNGO TERMINE E/O CANCEROGENESI
Topo: 18 mesi
Ratto: 24 mesi

The safety of cosmetic ingredients is evaluated by exposure-driven risk assessment on the basis of toxicological data.

3-3.5.1 TOXICOKINETICS (ADME)

The term "toxicokinetics" is used to describe the time-dependent uptake, distribution and fate of a substance entering the body. This includes Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME). All of these processes need to be known to understand the fate of substances once they come in contact with the body. The testing guidelines for toxicokinetics, including dermal absorption (EC B.36 Toxicokinetics, EC B.44 Skin absorption: *in vivo* method, EC B.45 Skin absorption: *in vitro* method; corresponding with OECD 417 (toxicokinetics), 427 (*in vivo* method), 428 (*in vitro* method), respectively), are designed to elucidate particular aspects of the fate and the potential toxicity of the substance under test. The results may assist in the design of further toxicity studies and their interpretation. Moreover, after absorption of a substance under consideration, its metabolic transformation and fate can have an important effect on its distribution in the body and its excretion, as well as on the toxic potential. Therefore, in specific cases, *in vivo* or *in vitro* biotransformation studies are required. However, the conduct and use of *in vivo* studies is restricted due to the animal testing ban for cosmetic ingredients in the EU.

Apart from data on dermal absorption, further toxicokinetic data for cosmetic ingredients are only available under certain circumstances, but their relevance may be high for extrapolating both *in vivo* and *in vitro* animal data to the human situation.

Any route-to-route extrapolation of toxicity can be performed in a case-by-case manner based on expert judgement of scientific information, including available toxicokinetic information. It can, however, only be performed in the case of systemic toxicity. In this regard, not only the degree of absorption, but also metabolism should be considered (ECHA, 2012a, 2015).

1. Metodi *In Vitro* (Pelle Umana o Equivalenti)

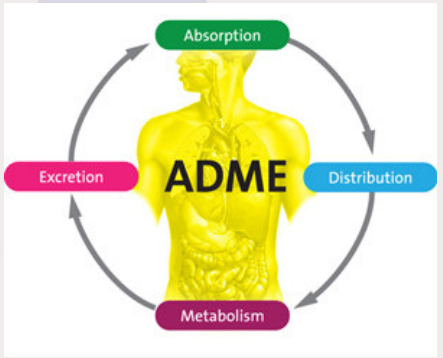
Il gold standard non animale per la valutazione dell'assorbimento cutaneo utilizza la pelle umana o i suoi surrogati in un apparato di diffusione controllata.

Metodo	Descrizione	Vantaggi
Celle di Franz (Franz Diffusion Cells)	È il metodo più accreditato. La sostanza viene applicata su un campione di **pelle umana escissa** (generalmente da interventi di chirurgia estetica) o su **epidermide ricostruita** (modelli 3D). La diffusione attraverso la pelle viene misurata nel tempo raccogliendo il fluido del compartimento ricevente.	Rilevanza fisiologica (se si usa pelle umana), riproducibilità, accreditato dalle agenzie regolatorie (es. OECD Test Guideline 428).
Modelli di Epidermide Ricostruita	Si utilizzano modelli di pelle 3D ingegnerizzati, formati da cheratinociti umani, che mimano la struttura della barriera cutanea.	Meno variabili rispetto alla pelle umana, facilmente scalabili, eticamente non problematici.

DESTINO DELLA SOSTANZA NELL'ORGANISMO

Quantità di xenobiotico a cui l'organismo viene esposto

Fattori che coinvolgono:
la via di assorbimento
la via di distribuzione
il metabolismo
la via di eliminazione



Tossicità sistemica?

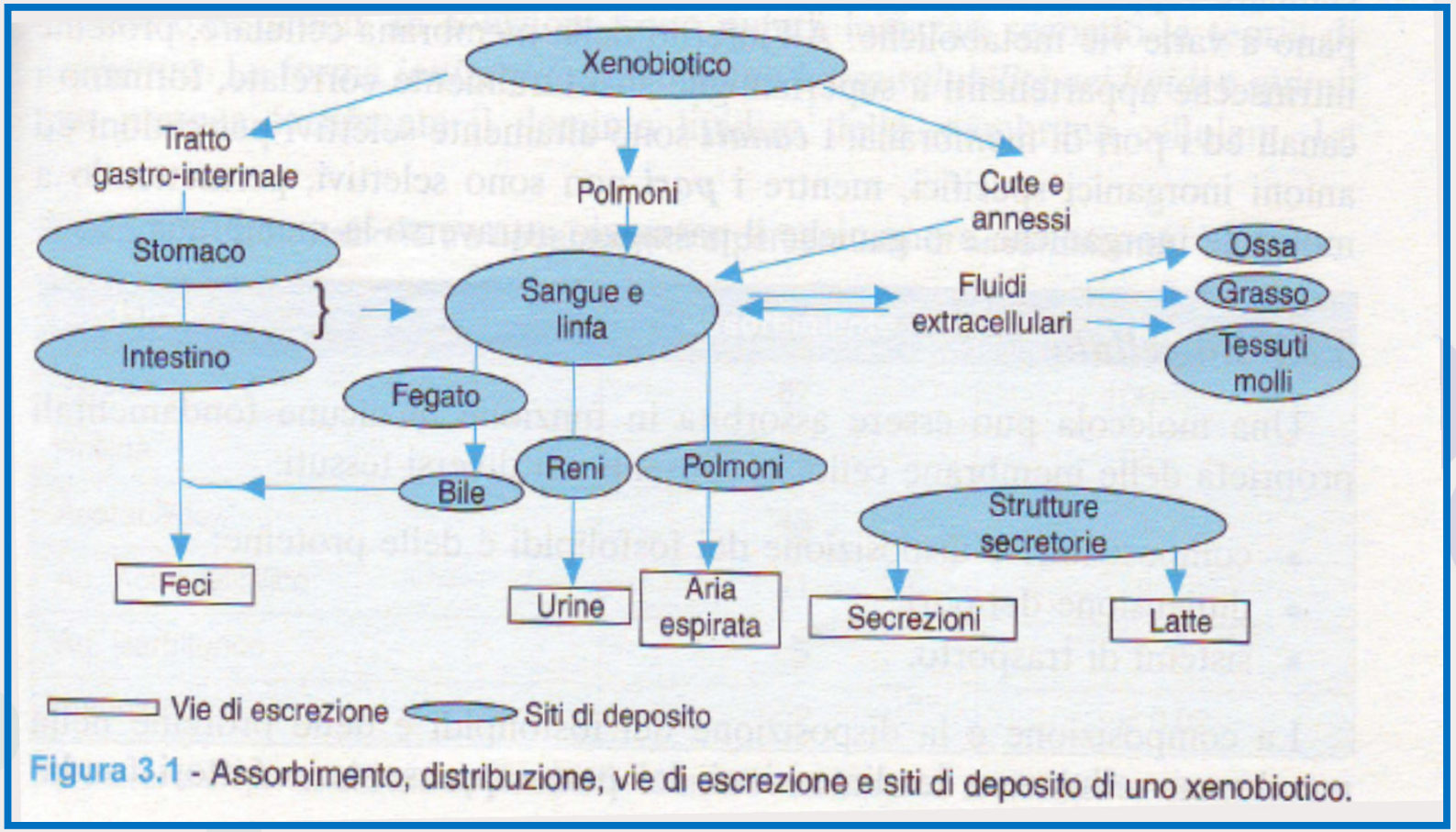
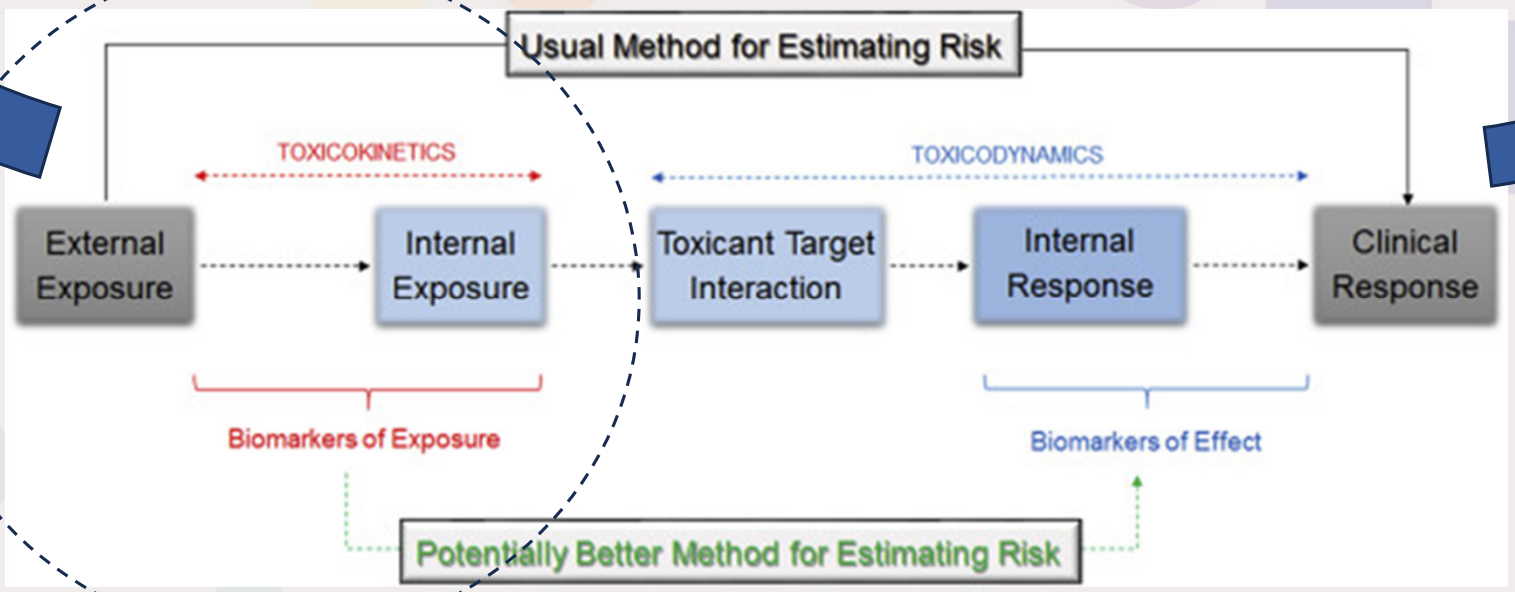
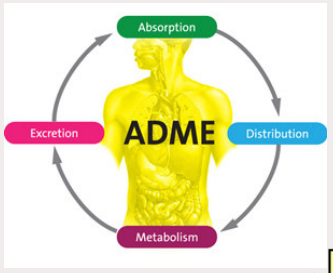


Figura 3.1 - Assorbimento, distribuzione, vie di escrezione e siti di deposito di uno xenobiotico.

Da: Tossicologia – Galli, Corsini, Marinovich – Piccin Ed.




Usual Method for Estimating Risk
TOXICOKINETICS
TOXICODYNAMICS
External Exposure
Internal Exposure
Toxicant Target Interaction
Internal Response
Clinical Response
Biomarkers of Exposure
Biomarkers of Effect
Potentially Better Method for Estimating Risk







SITO DI ESPOSIZIONE

tossico

External Dose

A	assorbimento	eliminazione presistemica	*A*
B	distribuzione verso il bersaglio	distribuzione fuori dal bersaglio	*B*
C	riassorbimento	escrezione	*C*
D	attivazione metabolica tossificazione	detossificazione	*D*

tossico finale

molecola bersaglio

SITO BERSAGLIO

Internal Dose

i processi indicati favoriscono o si oppongono al movimento del tossico verso il suo sito d'azione

Regolamento (G.U. del 30 novembre 2009. In vigore dall '11 luglio 2013)
ALLEGATO 1: Informazioni sulla sicurezza dei prodotti cosmetici- "*Cosmetic product safety report*"(CPSR)
Parte A: INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA

6. Esposizione al prodotto cosmetico

La **valutazione dell'esposizione** è un elemento **essenziale** della valutazione dei rischi. L'obiettivo di questa sezione è di determinare la quantità di prodotto cosmetico che viene in contatto con le superfici esterne del corpo umano oppure con i denti e le membrane mucose della bocca in condizioni normali o ragionevolmente prevedibili di uso, per ciascun uso, e la frequenza d'uso. Tiene conto delle risultanze concernenti l'«**uso normale e ragionevolmente prevedibile**».

3-3.2 IDENTIFICATION OF RELEVANT EXPOSURE SCENARIOS

In order to assess exposure of the end users, relevant exposure scenarios have to be identified that comprise all the important functions and uses of a cosmetic ingredient (see Section 3-3.1). These scenarios need to describe "reasonably foreseeable exposure conditions" (Cosmetics Regulation (EC) No 1223/2009, Article 16 f), under which these the cosmetic product should be safe.

Safety Assessment

To confirm the requirements of the European Cosmetic Regulation EU 1223/2009 according to Chapter III, Article 10 in the currently valid version for the following products

Sample-Cream
Bulk-Art.: 45000
Fp-Art.: FW-001 (100ml), FW-002 (50ml)

just an Example

A.5. Normal and reasonably foreseeable use

The product is used for skin care for the face. The product remains on the skin after application. Due to the appearance and the distribution channel (cosmetic studios) of the product, it is clear that the product is intended for use by adults. Users can also be pregnant women, nursing mothers and sick persons.
The product description on the label/package insert clearly indicates that the product will be used in accordance with its intended purpose; misuse is not to be expected.

USO NORMALE E RAGIONEVOLMENTE PREVEDIBILE

Il prodotto è indicato come struccante per il viso. Non è necessario sciacquare. In un suo uso ragionevolmente prevedibile, il prodotto viene a diretto contatto con la pelle del viso.



The following parameters describe an exposure scenario. However, the list is not exhaustive, and further parameters may need to be taken into account. Note that all routes of exposure (dermal, oral and inhalation) should be considered in view of the intended use of the product.

- cosmetic product type (s) in which the ingredient may be used
- method of application as detailed as possible, *e.g.* rubbed-on, sprayed, applied and washed off, etc.; considerations whether the product is a rinse-off or leave-on product and which retention factor should be applied
- concentration of the ingredient in the marketed cosmetic product
- quantity of the product used at each application
- frequency of use
- total area of skin contact
- duration of exposure
- target consumer groups (*e.g.* children, people with sensitive, damaged or compromised skin) where specifically required
- application on skin areas exposed to sunlight
- location of use (indoors/outdoors) and ventilation

TOSSICOCINETICA

Scenario	Esempio	Conseguenza sulla valutazione
Uso normale	Crema viso una volta al giorno	Esposizione prevista
Uso più frequente	Crema applicata più volte al giorno	Aumento della dose giornaliera
Uso prolungato	Prodotto leave-on mantenuto sulla cute	Maggiore durata del contatto
Quantità superiore	Applicazione abbondante di una crema	Aumento dell'esposizione
Applicazione su aree diverse	Crema utilizzata anche su collo e décolleté	Aumento della superficie esposta
Uso combinato	Più cosmetici contenenti lo stesso ingrediente	Possibile esposizione aggregata
Popolazioni specifiche	Prodotti destinati ai bambini	Necessità di considerare caratteristiche ed esposizione della popolazione interessata

Uso normale + uso ragionevolmente prevedibile → stima dell'esposizione → valutazione del rischio.

Regolamento (G.U. del 30 novembre 2009. In vigore dall '11 luglio 2013)
ALLEGATO 1: Informazioni sulla sicurezza dei prodotti cosmetici- "*Cosmetic product safety report*"(CPSR)
Parte A: INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA

6. Esposizione al prodotto cosmetico

Descrizione dell'esposizione al prodotto cosmetico, che tenga conto dei risultati di cui alla sezione 5 riguardanti:

- **la sede di applicazione**; l'estensione della superficie di applicazione; la quantità di prodotto applicata; la durata e la frequenza d'uso; le vie di esposizione normali e ragionevolmente prevedibili;
- la popolazione target (o esposta). Va tenuto conto anche dell'esposizione potenziale di una determinata popolazione.
- Nel calcolo dell'esposizione va tenuto conto anche degli effetti tossicologici da considerare (ad es. potrebbe essere necessario calcolare l'esposizione per unità di superficie cutanea o per unità di peso corporeo). Sarebbe opportuno tenere conto anche dell'eventuale esposizione secondaria attraverso vie diverse da quelle conseguenti all'applicazione diretta (ad es. inalazione involontaria di spray, ingestione involontaria di prodotti da applicare sulle labbra, ecc.).

VIE DI ESPOSIZIONE AL TOSSICO

- ✓ **Cutanea**
- ✓ Orale
- ✓ Intradermica
- ✓ Intramuscolare
- ✓ Sottocutanea
- ✓ Intraperitoneale
- ✓ Inalatoria
- ✓ Endovenosa



COSMETICI
SITI DI APPLICAZIONE/CONTATTO

- ✓ *EPIDERMIDE*
- ✓ *PELI e CAPELLI*
- ✓ *UNGHIE*
- ✓ *LABBRA*
- ✓ *DENTI e CAVO ORALE*
- ✓ *MUCOSE ESTERNE FEMMINILI e MASCHILI*

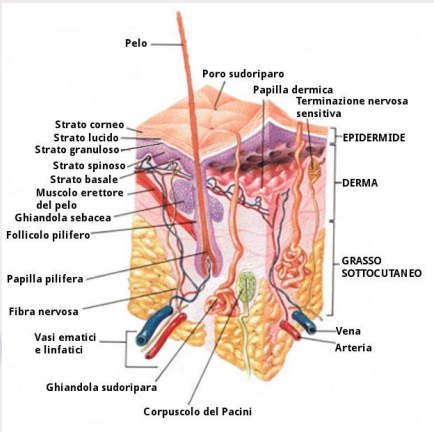
Non dimentichiamo, però, che potrebbero essere ingeriti o inalati!



Tossicità sistemica

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

APPLICAZIONE SULLA CUTE E ASSORBIMENTO PERCUTANEO



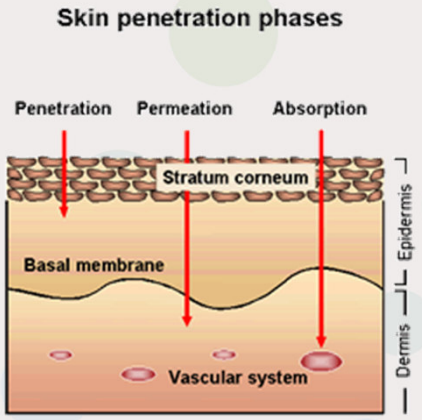
The **dermal/percutaneous absorption** process is a global term which describes the passage of compounds across the skin. This process can be divided into three steps:

- **penetration** is the entry of a substance into a particular layer or structure such as the entrance of a compound into the *stratum corneum*;
- **permeation** is the penetration through one layer into another, which is both functionally and structurally different from the first layer;
- **resorption** is the uptake of a substance into the vascular system (lymph and/or blood vessel), which acts as the central compartment.

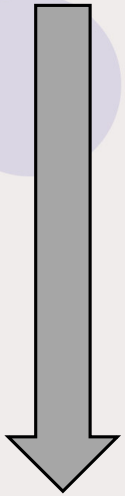
Assorbimento vs. Penetrazione

È fondamentale che i futuri valutatori della sicurezza distinguano tra i termini usati in tossicologia cutanea:

Termine	Definizione Esatta	Rilevanza per la Tossicità Sistemica
Penetrazione	Il passaggio di una sostanza attraverso lo **strato corneo** (lo strato più esterno della pelle) e/o il raggiungimento degli strati cutanei vitali (epidermide e derma).	Indica che la sostanza è *entrata* nella pelle, ma non necessariamente che ha raggiunto il sangue.
Assorbimento Percutaneo	Il passaggio di una sostanza da un sito di applicazione sulla pelle nella **circolazione sistemica (il sangue)**.	Misura l'**Esposizione Interna**. Solo la sostanza assorbita contribuisce alla **Tossicità Sistemica** (effetti su organi distanti).



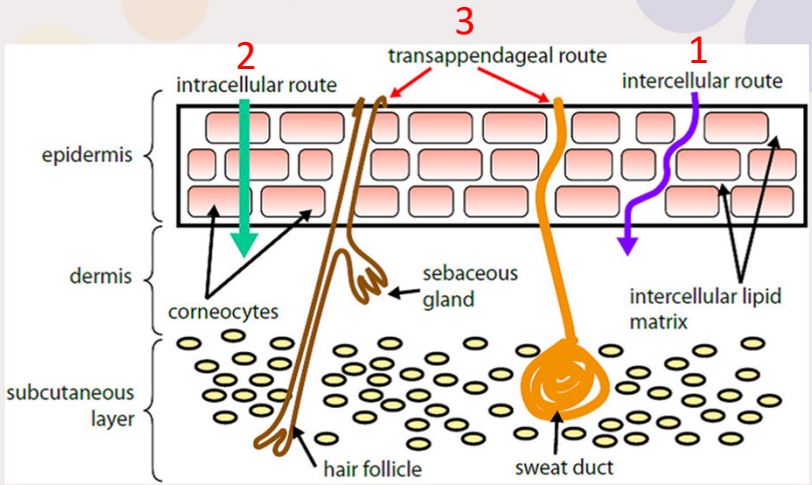




Possibile tossicità sistemica

La permeazione cutanea di uno xenobiotico è **fortemente limitata dallo strato corneo** (bassa permeabilità dei suoi elementi cellulari alla maggior parte dei soluti).
Essa può avvenire attraverso 3 modalità:

1) **Via intercellulare**: penetrazione tra le cellule dello strato corneo (via di penetrazione preferenziale per i composti polari ad alto peso molecolare).
2) **Via transcellulare**: penetrazione attraverso le cellule dello strato corneo (molecole giustamente lipofile e basso PM).
3) **Via pilosebacea (annessi cutanei)**: attraverso i follicoli piliferi, le ghiandole sudoripare o sebacee (% trascurabile).

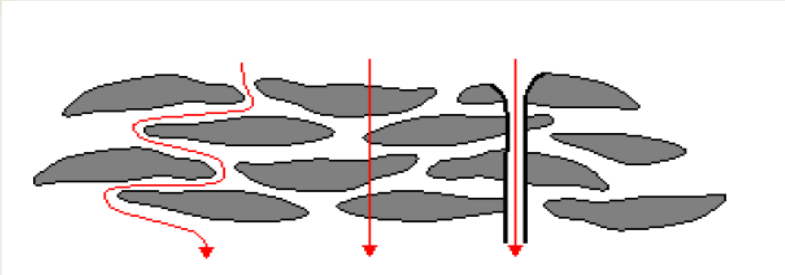


ANNESSI CUTANEI (3)

L'area disponibile per l'assorbimento tramite questi è piccola (circa 0,1%) e perciò questa via di solito non contribuisce sensibilmente al flusso a regime di un farmaco.

Tuttavia, questa via **può essere percentualmente importante per ioni e grandi molecole polari** che attraversano lo strato corneo con difficoltà.

Rappresenta un'utile e rapida via di assorbimento per molecole liposolubili di grandi dimensioni.

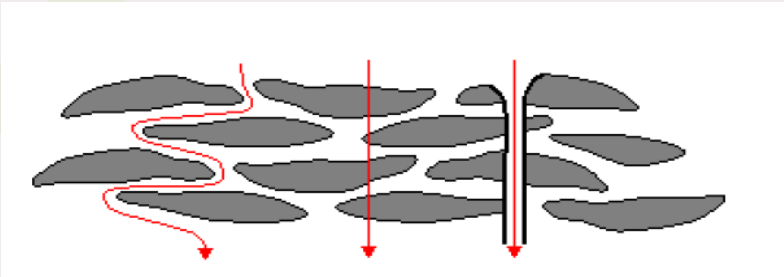


VIE DI PENETRAZIONE ATTRAVERSO LA CUTE

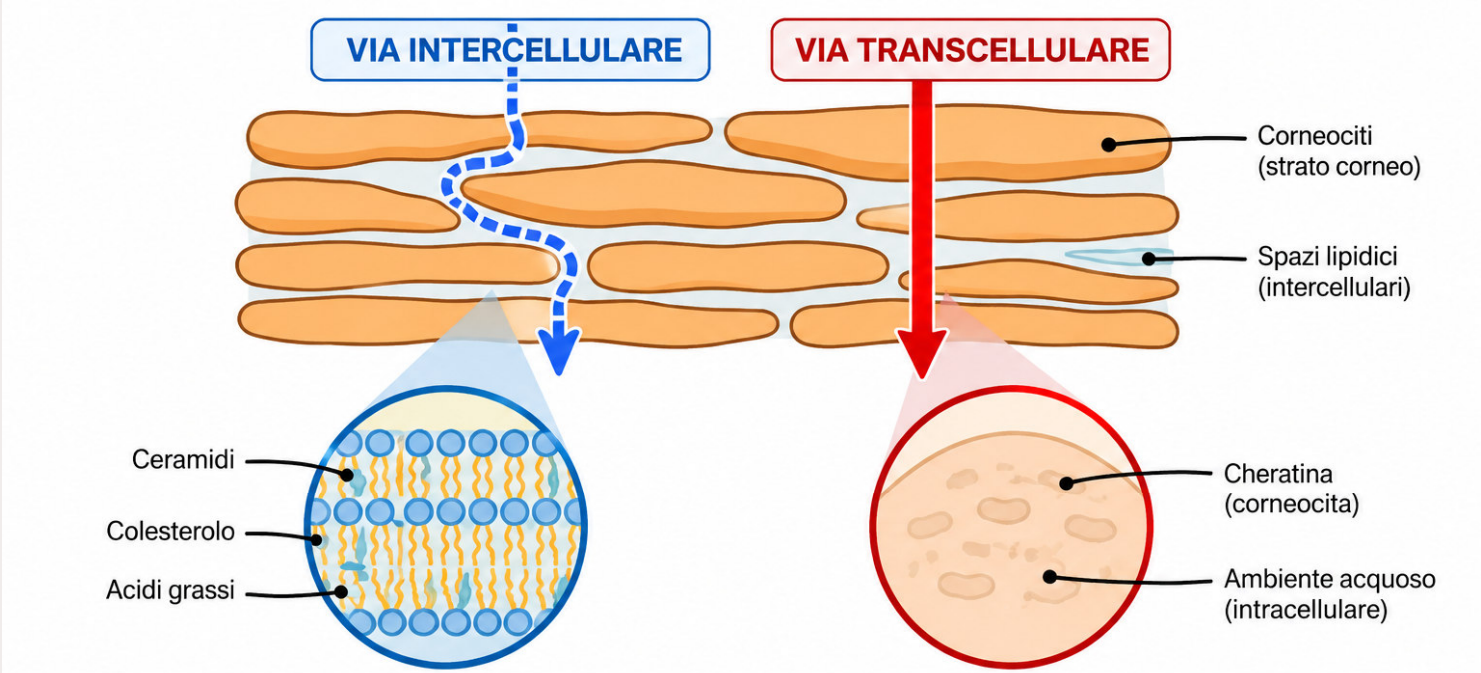
VIA INTERCELLULARE (1) E INTRACELLULARE (2)

Alla via **intercellulare**, attraverso la matrice lipidica dello strato corneo, rappresenta la principale via di permeazione per molte sostanze.

La penetrazione **transcellulare** diretta consiste nel passaggio della molecola dapprima attraverso la parete cellulare del corneocita e successivamente nella migrazione delle molecole polari verso le zone acquose del corneocita. E' evidente che l'intero processo si basa sul principio di diffusione passiva. Studiando le condizioni che favoriscono il passaggio transcellulare, si è visto che un basso peso molecolare ed una sufficiente solubilità nei lipidi e nell'acqua garantiscono l'assorbimento delle sostanze applicate sulla cute.



PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DELLA SOSTANZA



VIA INTERCELLULARE

- Passaggio attraverso la **matrice lipidica** dello strato corneo
- Percorso tortuoso tra i corneociti
- **Principale via** di permeazione per molte sostanze sufficientemente lipofile

VIA TRANSCELLULARE

- Passaggio attraverso i corneociti
- Alternanza di ambienti lipidici e acquosi
- Richiede un equilibrio favorevole tra lipofilia e solubilità

FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSORBIMENTO PERCUTANEO?

3-3.5.1.1 DERMAL/PERCUTANEOUS ABSORPTION

Human exposure to cosmetic substances occurs mainly *via* the skin. In order to reach the circulation (blood and lymph vessels), cosmetic ingredients must cross a number of cell layers of the skin, of which the rate-determining layer is considered to be the *stratum corneum*.

A high number of factors influence this process, including the molecular weight, charge, lipophilicity of the compounds, the thickness and composition of the *stratum corneum* (which depends on the body site), the duration of exposure, the amount of topically applied product, the concentration of target compounds, occlusion, vehicle, skin integrity, etc.

FATTORI LEGATI ALLA MOLECOLA

CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE
(ingrediente)

- ✓ Dimensioni della molecola
- ✓ Dissolubilità: velocità assorbimento sarà proporzionale alla capacità di dissoluzione
- ✓ Diffusibilità (***LEGGE DI FICK***)
- ✓ Liposolubilità (Coefficiente di Ripartizione lipidi/acqua)
- ✓ Grado di ionizzazione ovvero Dissociabilità (pKa- pH della zona) (***LEGGE DI HENDERSON-HASSELBACH***)

LEGGE DI FICK



$$\frac{dQ}{dt} = - \frac{D \times Krip}{e} \times S\ (C1 - C2)$$

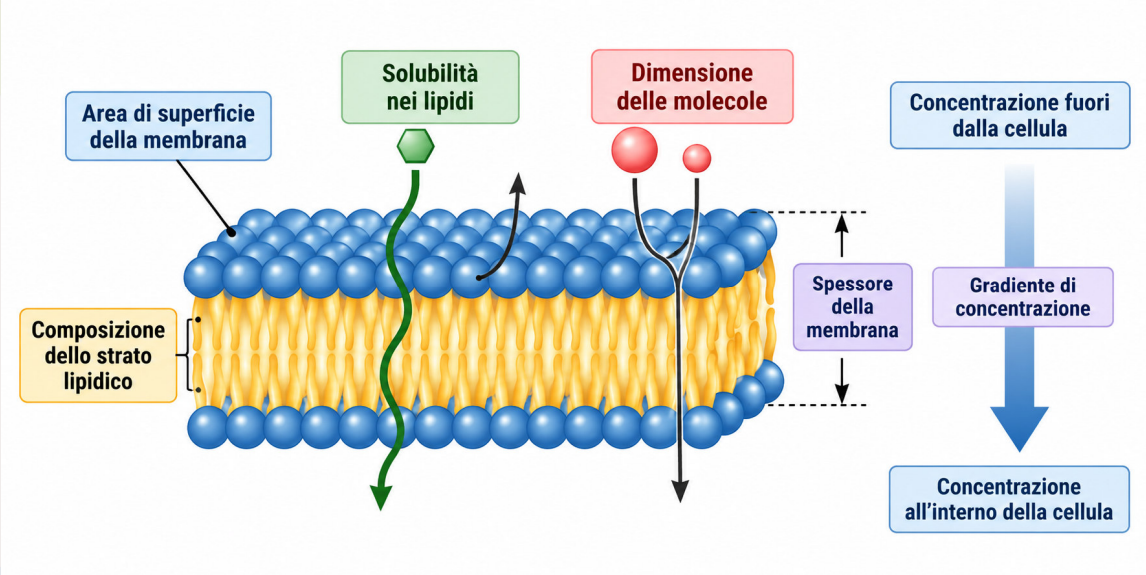
$\frac{D \times Krip}{e}$ → *Coeff. Di Permeabilità*

$\frac{dQ}{dt}$	Velocità di diffusione (quantità di composto assorbita nell'unità di tempo)
D	Coeff. di Diffusione (capacità di diffondere in base alle sue proprietà)
Krip	Coeff. di Ripartizione (olio / acqua)
e	Spessore della membrana ove avviene l'assorbimento
S	Superficie della zona di Assorbimento
(C1 - C2)	Differenza di concentrazione ai due lati della membrana

LEGGE DI FICK

La velocità di spostamento di un composto (attraverso la cute) per diffusione passiva dipende dalla sua concentrazione nel veicolo, dalla superficie e spessore dell'area di applicazione, dalla sua solubilità in acqua e dal suo coefficiente di ripartizione olio/acqua.

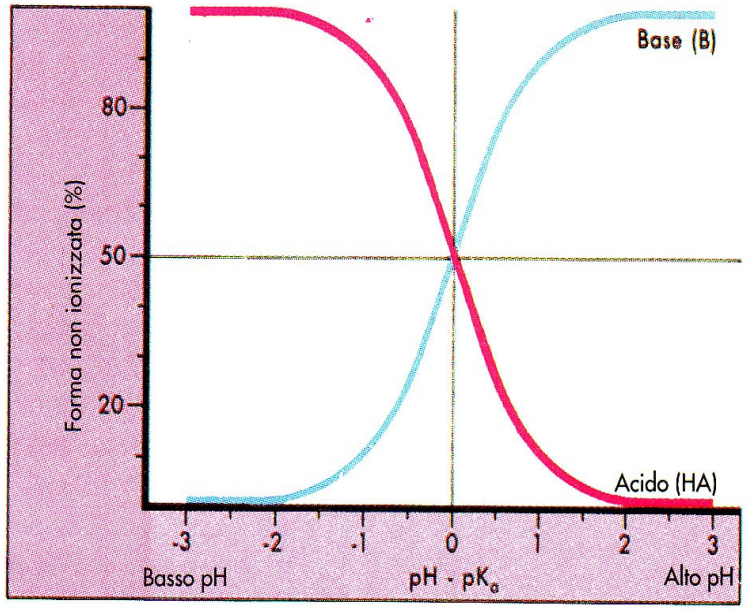
Le sostanze con caratteristiche di solubilità sia nell'acqua che nei lipidi sono buoni candidati per la diffusione attraverso strato corneo, epidermide e derma.



DISSOCIABILITA’

pH	Acido Benzoico	% Non-Ionizzata	Anilina	% Non-Ionizzata
1	COOH	99,9	NH_3^+	
2		99		0,1
3		90		1
4		50		10
5		10		50
6	COO^-	1	NH_2	90
7		0,1		99

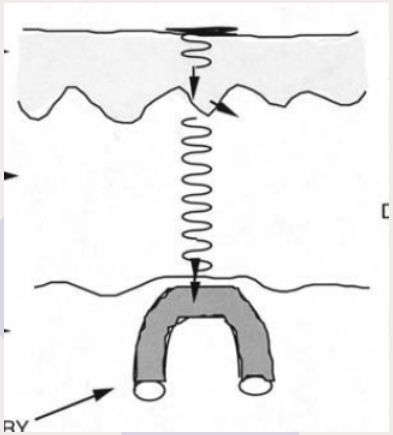
Figura 5-3. Effetti del pH sulla ionizzazione dell’acido benzoico (pK_a 4) e dell’anilina (pK_a = 5).



Percentuale di composto presente nella forma non ionizzata (HA, acido; B, base), a differenti valori di pH, in relazione al pKa del farmaco

LEGGE DI FICK - POSSIBILE RILEVANZA

FATTORI LEGATI ALLA ZONA

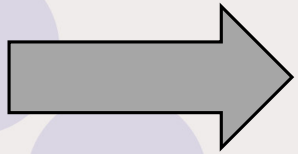


- Superficie esposta: maggiore superficie → maggiore quantità potenzialmente assorbita.
- Spessore dello strato corneo: influenza la resistenza alla diffusione.
- Idratazione e integrità della barriera: possono modificare la permeabilità.
- Sede anatomica: palpebre, volto, tronco e palmi/piante presentano caratteristiche differenti.

La sede anatomica influenza la permeazione cutanea. Nella valutazione della sicurezza, questa variabilità viene considerata attraverso lo scenario d'uso, i dati di assorbimento pertinenti e, quando necessario, assunzioni conservative.

FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSORBIMENTO PER VIA PERCUTANEA

- ✓ Stato della cute: ha molta importanza soprattutto lo strato di idratazione, in quanto aumenta le dimensioni dei pori e favorisce la velocità di assorbimento delle sostanze idrosolubili.
- ✓ Variabilità dello spessore e della permeabilità della regione cutanea (permeabilità crescente: plantare<avambraccio<cuoio capelluto<scroto<faccia posteriore del padiglione auricolare)

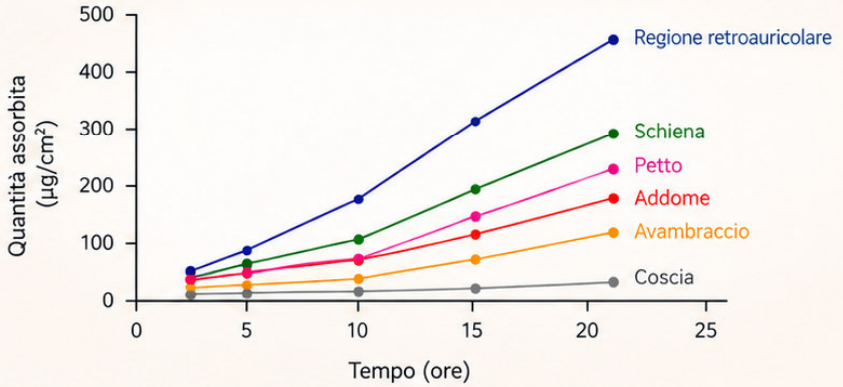


- ✓ Presenza di abrasioni, lesioni ulcerative, ustioni → discontinuità dello strato corneo → aumento rischio di effetti sistemici
- ✓ Grado di vascolarizzazione (flogosi, aumento localizzato e generale della T° corporea)
- ✓ Età (neonato-cute più sottile e idratata)

VARIABILITÀ DELL'ASSORBIMENTO PERCUTANEO TRA DIVERSE SEDI ANATOMICHE

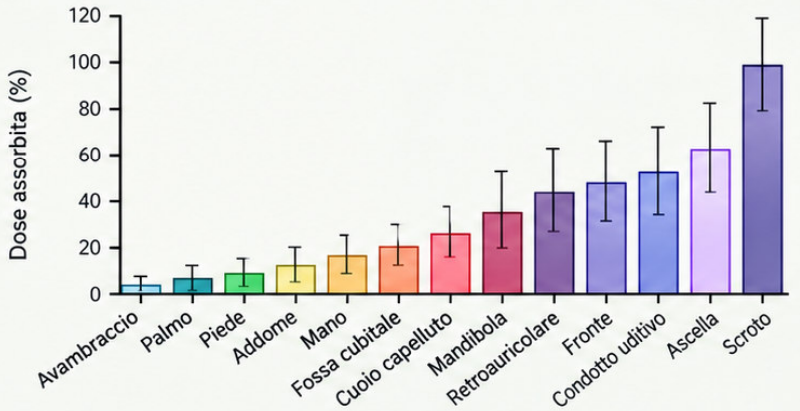
La permeabilità cutanea varia tra le **sedi anatomiche**, ma l'entità delle differenze dipende anche dalle **proprietà della sostanza** e dalla **formulazione**.

Esempio di cinetica di assorbimento su diverse regioni cutanee



Assorbimento cumulativo di una sostanza modello (es. marker non reattivo) applicata su diverse sedi cutanee umane in condizioni non occlusive.

Variabilità anatomica dell'assorbimento percutaneo



Assorbimento percutaneo relativo (media ± DS) dello stesso marker su diverse sedi anatomiche umane, espresso come percentuale rispetto alla sede più permeabile (adattato da studi con sostanze modello).

La stessa sostanza, applicata su regioni cutanee diverse, può determinare un'esposizione sistemica differente.

FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSORBIMENTO PER VIA PERCUTANEA

- ✓ Stato della cute: ha molta importanza soprattutto lo strato di idratazione, in quanto aumenta le dimensioni dei pori e favorisce la velocità di assorbimento delle sostanze idrosolubili.
- ✓ Variabilità dello spessore e della permeabilità della regione cutanea (permeabilità crescente: plantare<avambraccio<cuoio capelluto<scroto<faccia posteriore del padiglione auricolare)
- ✓ Presenza di abrasioni, lesioni ulcerative, ustioni → discontinuità dello strato corneo → aumento rischio di effetti sistemici
- ✓ Grado di vascolarizzazione (flogosi, aumento localizzato e generale della T° corpo
- ✓ Età (neonato-cute più sottile e idratata)

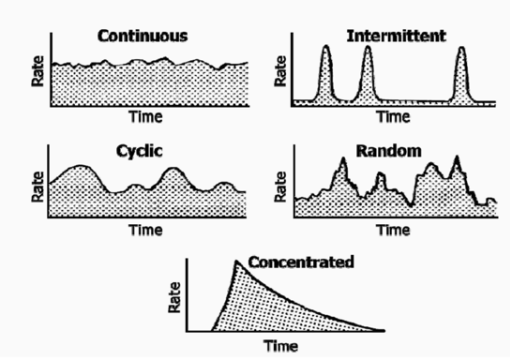


FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSORBIMENTO CUTANEO DEGLI INGREDIENTI COSMETICI

Formulazione
Veicolo, eccipienti, solubilità, occlusione

Modalità d'uso
Dose, frequenza e superficie di applicazione

Tempo di contatto
Leave-on e rinse-off



Condizioni cutanee
Integrità della barriera, sede anatomica, idratazione



ESPOSIZIONE AL PRODOTTO

Esposizione consumatore

a) sede di applicazione	Il prodotto è applicato sul viso
b) l'estensione della superficie di applicazione	565 cm^2 *
c) la quantità di prodotto applicata	Il prodotto contiene < 5g di cosmetico, si considera quindi in via cautelativa che tutto sia assorbito dalla salvietta e applicato sulla pelle *
d) la durata e la frequenza d'uso	Il prodotto non è da risciacquo (LEAVE ON) e la sua durata sulla superficie cutanea è abbastanza breve. La frequenza d'uso è 1 volte / giorno *
e) le vie di esposizione normali e ragionevolmente prevedibili	Le vie d'esposizione normali e ragionevolmente prevedibili sono quelle cutanee.
f) la popolazione target (o esposta). Va tenuto conto anche dell'esposizione potenziale di una determinata popolazione	Persone adulte di sesso maschile o femminile
g) dimensioni particelle	Il prodotto non contiene ingredienti in forma nano

** The SCCS'S notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation - 8th revision – categoria prodotto "hand wash soap"*

Regolamento (G.U. del 30 novembre 2009. In vigore dall '11 luglio 2013)
<u>ALLEGATO 1:</u> Informazioni sulla sicurezza dei prodotti cosmetici- "*Cosmetic product safety report*"(CPSR)
<u>Parte A: INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA</u>

6. Esposizione al prodotto cosmetico

Descrizione dell'esposizione al prodotto cosmetico, che tenga conto dei risultati di cui alla sezione 5 riguardanti:

- ✓ **<u>la sede di applicazione</u>**; l'estensione della superficie di applicazione; la quantità di prodotto applicata; la durata e la frequenza d'uso; le vie di esposizione normali e ragionevolmente prevedibili;
- ✓ la popolazione target (o esposta). Va tenuto conto anche dell'esposizione potenziale di una determinata popolazione.
- ✓ Nel calcolo dell'esposizione va tenuto conto anche degli effetti tossicologici da considerare (ad es. potrebbe essere necessario calcolare l'esposizione per unità di superficie cutanea o per unità di peso corporeo). Sarebbe opportuno tenere conto anche dell'eventuale esposizione secondaria attraverso vie diverse da quelle conseguenti all'applicazione diretta (ad es. inalazione involontaria di spray, ingestione involontaria di prodotti da applicare sulle labbra, ecc.).
- ✓ Va tenuto conto in particolare anche degli eventuali effetti sull'esposizione dovuti alla granulometria.

Ora dovrebbe essere più chiara la necessità di tutte queste valutazioni…

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562
www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients ☆,☆☆

R. Kroes [a], A.G. Renwick [b,*], V. Feron [c], C.L. Galli [d], M. Gibney [e], H. Greim [f], R.H. Guy [g], J.C. Lhuguenot [h], J.J.M. van de Sandt [i]

[a] Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, c/o Seminariehof 38, NL- 3768 EE Soest, The Netherlands
[b] School of Medicine, University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Bassett Crescent East, Southampton SO16 7PX, UK
[c] Business Unit Toxicology and Applied Pharmacology, TNO Quality of Life, P.O. Box 360, NL 3700 AJ Zeist, The Netherlands
[d] Laboratory of Toxicology, University of Milan, Via Balzaretti 9, Milan 20133, Italy
[e] UCD Institute of Food and Health, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland
[f] Technical University of Munich, Hohenbachernstrasse 15-17, D-85354 Freising-Weihenstephan, Germany
[g] University of Bath, Department of Pharmacy and Pharmacology, Claverton Down, Bath BA2 7AY, UK
[h] ENSBANA, Université de Bourgogne, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France
[i] TNO Quality of Life, Utrechtseweg 48, 3704 HE Zeist, The Netherlands

Importante!

Therefore, the amount (or the percentage of the applied dose) of a particular chemical that is absorbed may differ widely from formulation to formulation. In consequence, it is totally inappropriate to assign a single value to the potential for a chemical to be absorbed under use conditions, without taking into consideration the nature of the vehicle and the level at which the chemical is present therein.

FLUSSO MASSIMO

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562
ELSEVIER
www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients ☆,☆☆

R. Kroes [a], A.G. Renwick [b,*], V. Feron [c], C.L. Galli [d], M. Gibney [e], H. Greim [f], R.H. Guy [g], J.C. Lhuguenot [h], J.J.M. van de Sandt [i]

Table 3
Classification of chemicals (on the basis of their physicochemical properties) in terms of their potential to be absorbed across the skin

J_{max} (μg/cm²/h)	MW (Da)	log *P*	Category
$J_{max} = 0$	Non-reactive chemicals > 1000 Da	Any	Negligible
$J_{max} < 0.1$	> 300	< −1 or > 5	Low
$0.1 < J_{max} < 1.0$	~ 200–300	> 2.0, 2.5	Medium low
$1.0 < J_{max} < 10$	~ 150–250	~ 1.0–2.0	Medium high
$10 < J_{max} < 100$	~60–200	~ 0.5–3.5	High
$J_{max} > 100$	<150	−0.5–2.0	High

J_{max}, maximum flux; MW, molecular weight; log *P*, log of the octanol:water partition coefficient.

4.3.2. Theoretical principles regarding percutaneous absorption

The maximum flux (J_{max}), at which a chemical can cross the skin, is theoretically achieved when it is maintained in a saturated solution (or in neat chemical form) on the surface. The relevant equation that applies in these circumstances is Fick's first law:

$$J_{max} \cong \frac{D}{h} * K_{skin/vehicle} * C^{sat}_{vehicle} \quad (1)$$

where D is the chemical's diffusivity across the skin (typically that through the stratum corneum, the skin's least permeable and outermost layer), h is the diffusion path-length, $K_{skin/vehicle}$ is the compound's partition coefficient between the skin and the vehicle contacting the surface, and $C^{sat}_{vehicle}$ is its saturation solubility in the vehicle. Given

Ritroviamo i fattori che condizionano l'assorbimento attraverso la cute

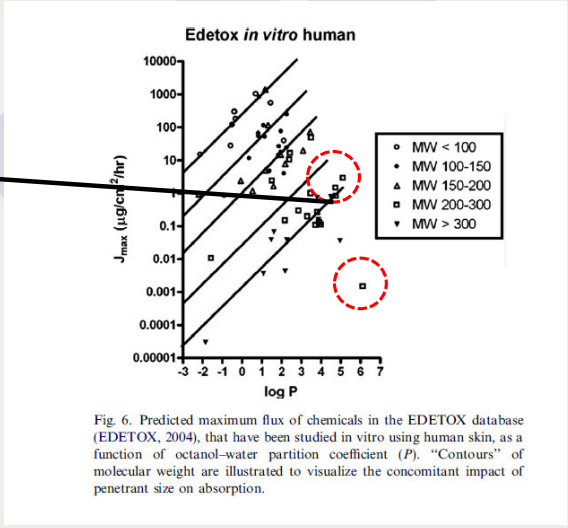


Fig. 6. Predicted maximum flux of chemicals in the EDETOX database (EDETOX, 2004), that have been studied in vitro using human skin, as a function of octanol–water partition coefficient (*P*). "Contours" of molecular weight are illustrated to visualize the concomitant impact of penetrant size on absorption.

Table 3
Classification of chemicals (on the basis of their physicochemical properties) in terms of their potential to be absorbed across the skin

J_{max} (μg/cm²/h)	MW (Da)	log *P*	Category
$J_{max} = 0$	Non-reactive chemicals > 1000 Da	Any	Negligible
$J_{max} < 0.1$	> 300	< −1 or > 5	Low
$0.1 < J_{max} < 1.0$	~ 200–300	> 2.0, 2.5	Medium low
$1.0 < J_{max} < 10$	~ 150–250	~ 1.0–2.0	Medium high
$10 < J_{max} < 100$	~60–200	~ 0.5–3.5	High
$J_{max} > 100$	<150	−0.5–2.0	High

J_{max}, maximum flux; MW, molecular weight; log *P*, log of the octanol:water partition coefficient.

Table 4
Proposed default adjustment factors for the % dose absorbed of cosmetic ingredients across the skin

J_{max} (μg/cm²/h)	Default% dose absorbed per 24 h
Non-reactive chemicals with MW > 1000	Negligible
$J_{max} < 0.1$	10
$0.1 < J_{max} < 10$	40
$J_{max} > 10$	80

J_{max}, maximum flux.

SCCS utilizza queste proprietà come elementi di supporto alla valutazione, non come una formula automatica per attribuire una percentuale di assorbimento.



Safety Assessment

To confirm the requirements of the European Cosmetic Regulation EU 1223/2009 according to Chapter III, Article 10 in the currently valid version for the following products

Sample-Cream
Bulk-Art.: 45000
Fp-Art.: FW-001 (100ml), FW-002 (50ml)

Dermal absorption:

The dermal absorption was either taken from the literature or estimated.

The estimation is based on the classification of chemicals based on their physico-chemical properties with respect to their potential to be absorbed by the skin. The basis is the following table.

flux (Jmax µg/cm²/h)	*M [g/mol]*	*log Pow*	*max. Absorption*
0	> 1000	any	neglible
< 0,1	> 300	< - 1 or > 5	< 10%
0,1 - 1,0	~ 200 - 300	> 2.0 - 2.5	< 10%
1,0 - 10,0	~ 150 - 250	1.0 - 2.0	< 20%
10,0 - 100,0	~ 60 - 200	0.5 - 3.0	< 40%
> 100	< 150	0.5 - 1.5	< 80%
perfume oils, preservatives, extracts	any	any	100 % (worst case)

with log Pow = Partition coefficient octanol-water

EXAMPLE



Dermal Absorption	51.2	in vitro	highest value at different test models	TD0004

Dermal Absorption	1	in silico	due to high molecular weight (>10,000) no absorption is possible.	

	Result	Test type	Test description	Source
Dermal Absorption	100	in silico	worst case	

c. Substances with very low dermal absorption

A retrospective study of the Annex substances present in the Opinions (2000-2014) of the SCCS and its predecessors has shown that the cosmetic ingredients characterised by the following physicochemical properties may be indicative of very low dermal absorption (Ates *et al.*, 2016). For dealing with data on very low dermal absorption, see Section 3-6.10.

- MW>500 Da,
- High degree of ionisation,
- Log P_{ow} ≤-1 or ≥4,
- Topological polar surface area >120 $Å^2$,
- Melting point > 200°C

3-6.11 SUBSTANCES WITH VERY LOW DERMAL ABSORPTION

In the case where a cosmetic ingredient is a substance with a very low dermal absorption {see Section 3-3.5.1.1(c)}, some studies could be waived since systemic exposure *via* dermal absorption is expected to be minimal. In such a case, the following minimum set of data should be made available in order to assess the safety of cosmetic ingredients with very low bioavailability:

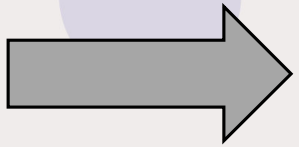
- Experimentally determined physicochemical data
- Local toxicity
- Mutagenicity/Genotoxicity
- High quality *in vitro* dermal absorption study, according to the SCCS Basic Criteria {3-3.5.1.1 (b}.

There may be cases for which it is either not necessary or technically not possible to provide some of the information mentioned above: in such cases **a scientific justification** must be given.

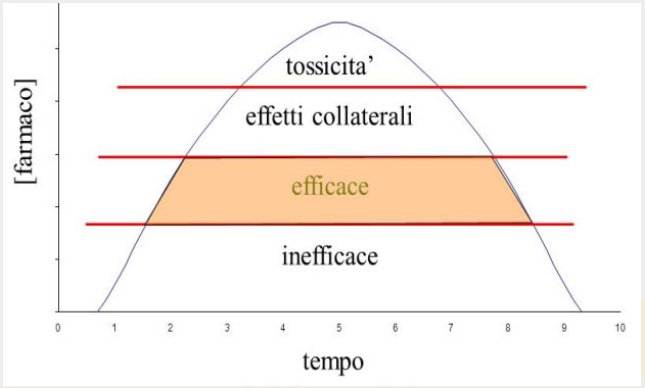
Alcune indicazioni……

It is advised to perform dermal absorption studies in the risk assessment process. In the absence of experimentally determined dermal absorption, **50%** bioavailability as default value of the substance is used. This conservative value may also be used in cases where only inadequate absorption data are available.

For products intended for oral use, like toothpastes and mouthwashes, inevitably some amount will be ingested. If no experimentally derived data are provided, the SCCS will take the conservative absorption value of 100%.



Secondo la dodicesima revisione delle Notes of Guidance, in assenza di dati sperimentali adeguati si utilizza generalmente un valore conservativo di assorbimento dermico del 50%.



La differenza nella C_{max} ha importanti ricadute sulla possibile tossicità

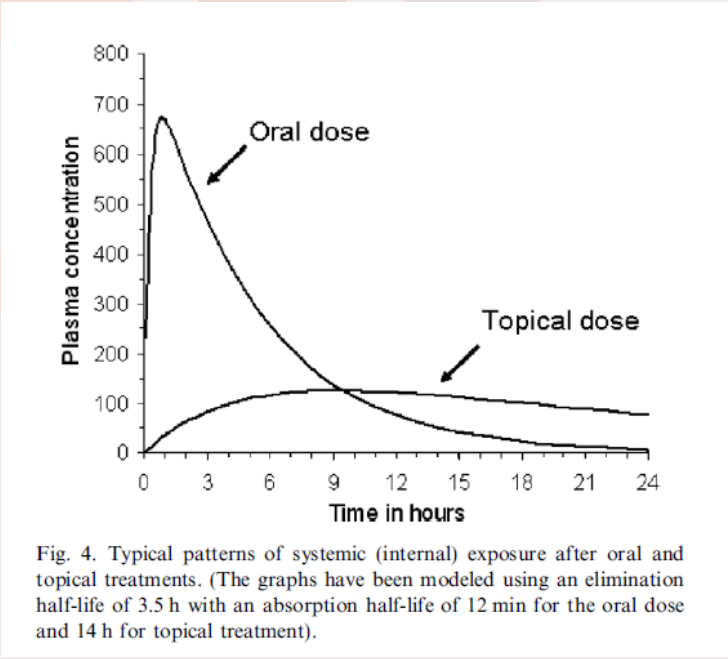


Fig. 4. Typical patterns of systemic (internal) exposure after oral and topical treatments. (The graphs have been modeled using an elimination half-life of 3.5 h with an absorption half-life of 12 min for the oral dose and 14 h for topical treatment).

R. Kroes et al. / Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562

Alcune indicazioni……

It is advised to perform dermal absorption studies in the risk assessment process. In the absence of experimentally determined dermal absorption, **50%** bioavailability as default value of the substance is used. This conservative value may also be used in cases where only inadequate absorption data are available.

For products intended for oral use, like toothpastes and mouthwashes, inevitably some amount will be ingested. If no experimentally derived data are provided, the SCCS will take the conservative absorption value of 100%.

If information on the extent of inhalation absorption is available from experimental studies and/or physico-chemical parameters, this information is used. However, if no data are presented, the SCCS considers that for the calculation of inhalation exposure an absorption of **100%** should be used.

IMPORTANZA DI DETERMINARE L'ASSORBIMENTO CUTANEO DI UN COSMETICO

La determinazione di **assenza di assorbimento cutaneo** (ma anche orale o inalatorio, se queste sono possibili vie di esposizione del cosmetico), limita fortemente la necessità di procedere con test di tossicità più o meno complessi (tossicità sistemica).

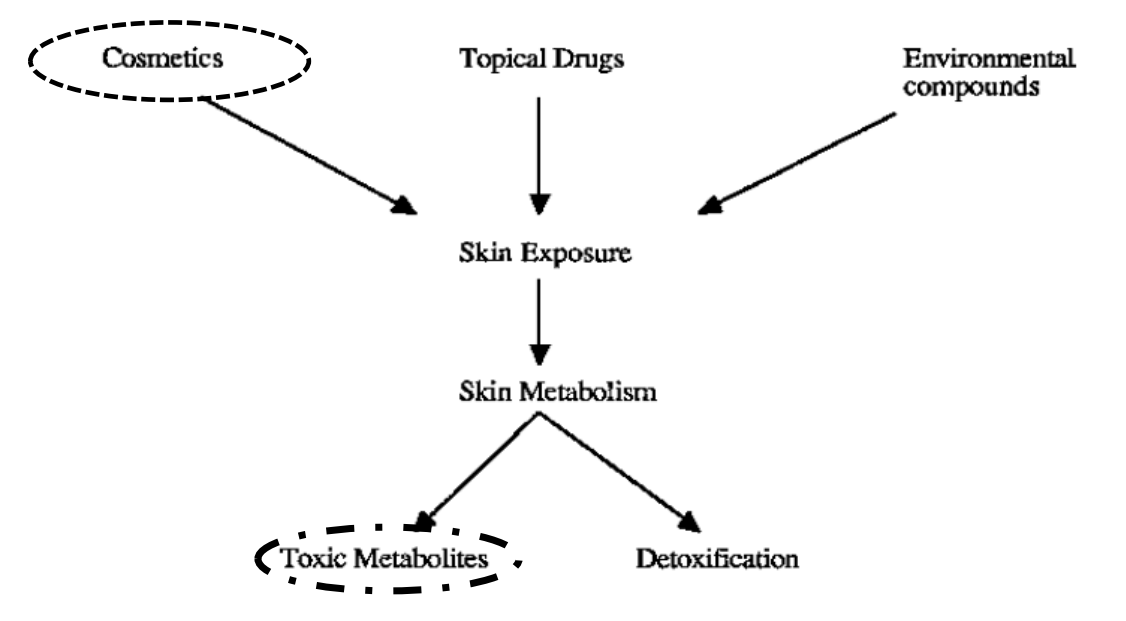
Although data on systemic or dermal metabolism is not a regular requirement for SCCS safety evaluation, such data is helpful and sometimes required to complete the toxicity profile of a cosmetic ingredient.

3-3.5.2 DIFFERENCES IN METABOLISM FOR DIFFERENT ROUTES

3-3.5.2.1 SYSTEMIC METABOLISM

Metabolism of xenobiotic substances in mammals mainly occurs *via* phase I and/or phase II reactions mediated by xenobiotic metabolising enzymes (XMEs). This can also involve active transport of substances in (Phase 0) and/or out of the cells (Phase 3). Phase I reactions such as oxidation, reduction, hydrolysis etc. introduce functional groups into the molecule (functionalisation). Phase II reactions render the xenobiotic substance or its metabolite(s) more hydrophilic so that they can be better eliminated *via* bile or urine, by conjugation mainly with glutathione, glucuronic acid or sulfate. In most cases, phase I metabolites that may be reactive are also inactivated by these conjugation reactions.

METABOLISMO (BIOTRASFORMAZIONE)



Tossico: sostanze con proprietà dannose **dirette** o **indirette**

La biotrasformazione modifica gli xenobiotici, generalmente aumentando la loro idrosolubilità e facilitandone l'eliminazione. Può determinare inattivazione/detossificazione, ma anche bioattivazione con formazione di metaboliti biologicamente attivi o tossici.

RILEVANZA

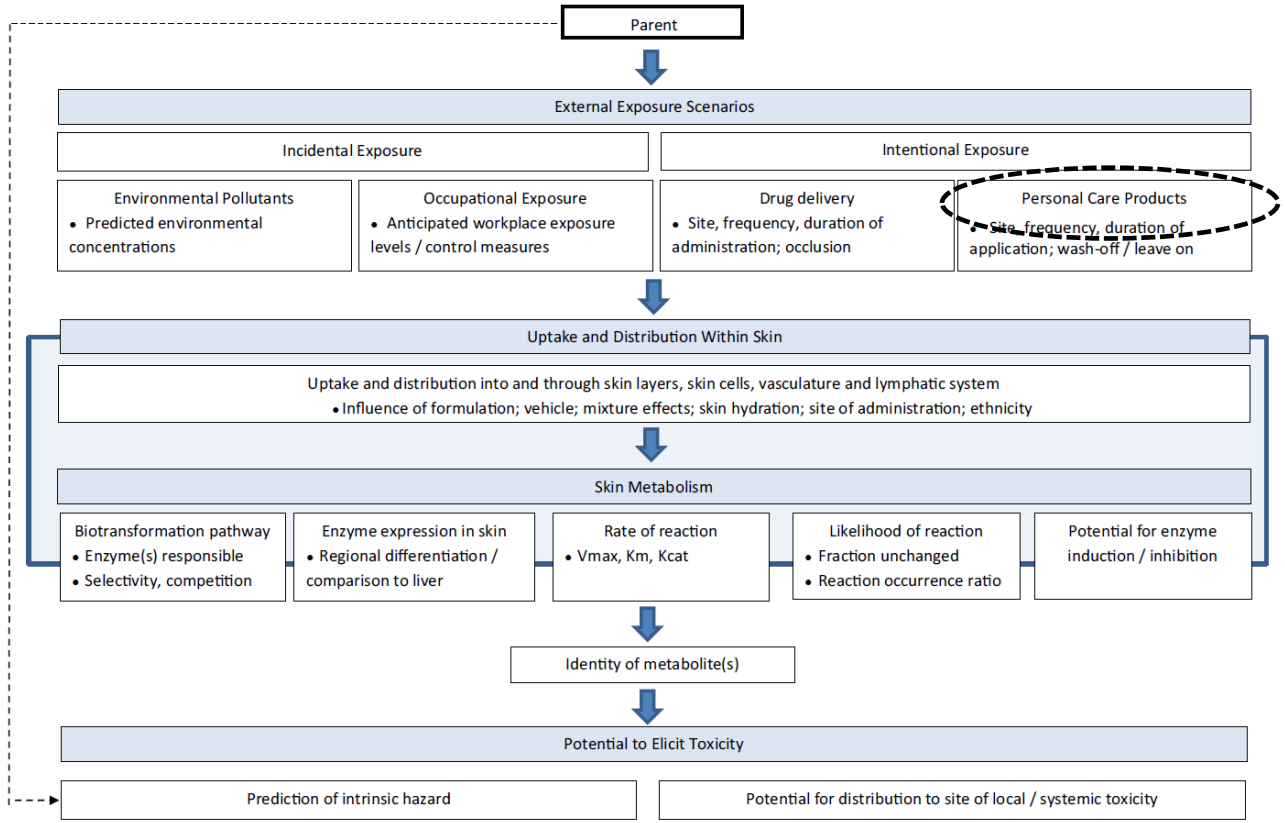


Fig. 1. Factors that govern the potential for a parent or metabolite to elicit toxicity and types of data required to aid prediction.

Computational Toxicology 3 (2017) 44–57

Contents lists available at ScienceDirect

Computational Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/comtox

In silico prediction of skin metabolism and its implication in toxicity assessment

J.C. Madden [a,*], S. Webb [b], S.J. Enoch [a], H.E. Colley [c], C. Murdoch [c], R. Shipley [d], P. Sharma [e], C. Yang [f], M.T.D. Cronin [a]

Regulatory Toxicology and Pharmacology 76 (2016) 74–78

Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph

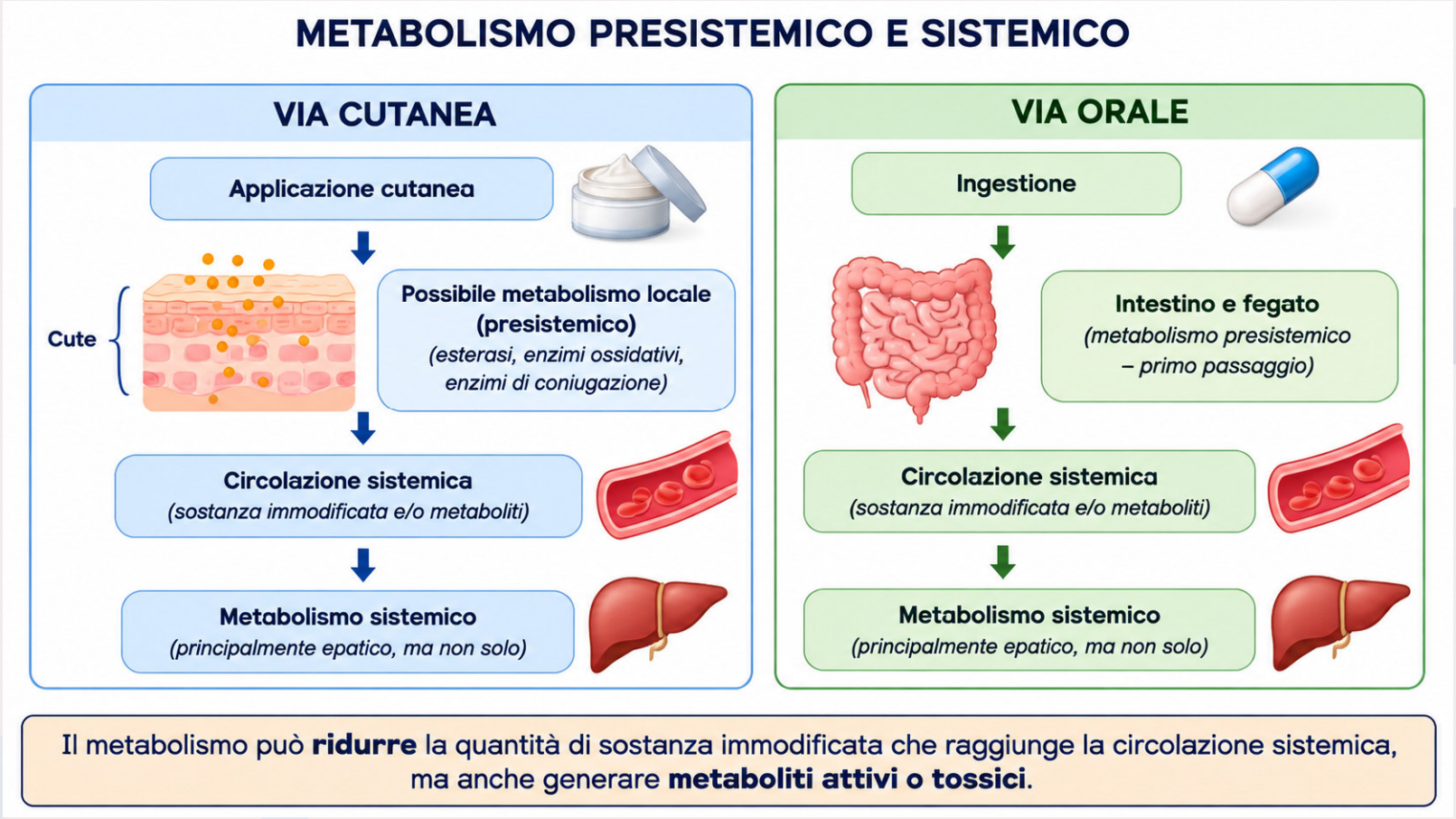
Linking existing *in vitro* dermal absorption data to physicochemical properties: Contribution to the design of a weight-of-evidence approach for the safety evaluation of cosmetic ingredients with low dermal bioavailability

Gamze Ates [a, *, 1], Fabian P. Steinmetz [b, 1], Tatyana Yordanova Doktorova [c], Judith C. Madden [b, 2], Vera Rogiers [a, 2]

[a] Department of In Vitro Toxicology and Dermato-cosmetology, Vrije Universiteit Brussel, Laarbeeklaan 103, B-1090 Brussels, Belgium
[b] QSAR and Modelling Group, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences Liverpool John Moores University, Byrom Street, Liverpool, L3 3AF, England, United Kingdom
[c] Unit of Toxicology, Scientific Institute of Public Health (IPH), Juliette Wytsmanstraat 14, B-1050, Brussels, Belgium

sure) rather than external exposure (Partosch et al., 2015). For completeness, decisions relating to internal exposure following oral/dermal administration should include considerations of metabolism. Indeed, when one wants to omit the determination of a NOA(E)L-value it is important to consider the possibility of metabolic activation, since the metabolites formed could be more toxic than the original mother molecule. An additional safety factor could then be added whenever considered to be necessary. Several *in vitro* and *in silico* models are available for predicting metabolism following oral exposure and there is increasing interest in the area of skin metabolism for which models are currently being developed (as reviewed recently by Dumont et al., 2015). Though in the cosmetic sector the TTC concept has been accepted for the safety assessment of impurities for which the identity is known but toxicity data are lacking (Kroes et al., 2007; SCCS/1564/15), more evidence is still needed to prove the applicability of the internal TTC for cosmetic ingredients.

METABOLISMO (BIOTRASFORMAZIONE)



SITI DI BIOTRASFORMAZIONE

FEGATO

POLMONE **RENE** **TRATTO G.I.**

Attività metabolizzante dei vari organi rispetto al fegato

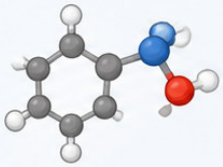
FEGATO	100%
POLMONE	20-30%
RENE	8%
INTESTINO	6%
PLACENTA (a termine)	5%
CUTE	**1%**

Enzimi

- bassa specificita' di substrato, scarsa efficienza catalitica
- elevato numero, notevole ubiquità

METABOLISMO: FASI E PRINCIPALI REAZIONI

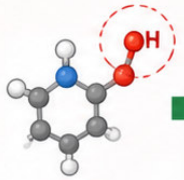
SOSTANZA ORIGINARIA
(lipofila, meno polare)



FASE I
Funzionalizzazione

Reazioni principali:
- Ossidazione
- Riduzione
- Idrolisi

Enzimi (esempi):
- Citocromi P450
- Esterasi
- Altre ossidasi/riduttasi

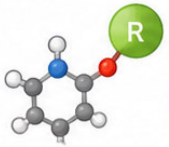


Metabolita
più polare
(gruppo funzionale)

FASE II
Conjugazione

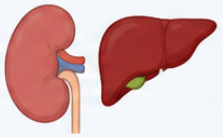
Reazioni principali:
- Glucuronazione
- Solfatazione
- Coniugazione con glutatione
- Coniugazione con amminoacidi (es. glicina, taurina, glutammina)
- Acetilazione, metilazione

Enzimi (esempi):
- UDP-glucuronosiltransferasi (UGT)
- Sulfotransferasi (SULT)
- Glutatione-S-transferasi (GST)
- N-acetiltransferasi (NAT)
- Metiltransferasi (MT)



Metabolita coniugato
(più idrofilo)

ELIMINAZIONE
(bile e/o urine)



Maggior lipofilia
Maggiore permeabilità

Aumento dell'idrofilia

Maggiore idrosolubilità
Facilità di eliminazione

Le reazioni di fase I e fase II non devono necessariamente verificarsi in sequenza:
una sostanza può essere direttamente **coniugata**.

3-3.5.2.2 DERMAL METABOLISM

Skin is both a physical and a biochemical barrier to the absorption of chemicals, micro-organisms and particulate materials. Besides the role of the *stratum corneum* as the most critical structure with a barrier function, there is growing evidence that XMEs may have physiological functions in addition to defence of xenobiotic substances. Hence, constitutive expression and regulation (induction) of XMEs is tissue-specific, also in skin. Most of the major enzymes found in the liver may also be present in the skin but often at lower activity levels. Phase II reactions in skin apparently play a greater role than phase I reactions of which the metabolic capacity is considered very low. It is plausible to assume that the role of phase II enzymes in skin is primarily to inactivate exogenous substances, thus supporting the barrier function of skin (Oesch *et al.*, 2007; SCCP/1171/08, Oesch *et al.*, 2014; Gundert-Remy *et al.*, 2014).

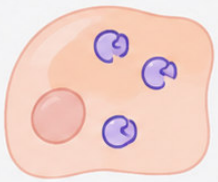
INDUZIONE ENZIMATICA: CONCETTO E RILEVANZA PER I COSMETICI

Cosa significa?

L'induzione enzimatica è un **aumento dell'espressione e/o dell'attività** degli enzimi di biotrasformazione (in particolare del **citocromo P450**) in seguito a un'esposizione ripetuta a una sostanza (induttore).

Effetto dell'induzione sul metabolismo

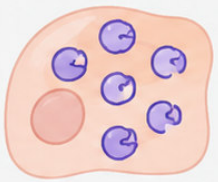
Condizioni basali



Livello normale di enzimi (es. CYP450)

Esposizione ripetuta a un induttore

Dopo induzione



Aumento dell'espressione e dell'attività enzimatica (es. CYP450)

Conseguenze possibili

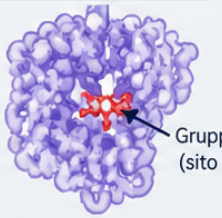
Maggiore metabolismo della sostanza originaria
→ minore esposizione sistemica alla sostanza immodificata.

Maggiore formazione di metaboliti
→ che possono essere inattivi (detossificazione) oppure attivi o potenzialmente tossici (bioattivazione).

Il ruolo del citocromo P450

- Il **citocromo P450** (CYP) è una famiglia di enzimi di fase I coinvolti soprattutto in reazioni di ossidazione.
- Molti **ingredienti cosmetici possono essere substrati del CYP450** e quindi essere metabolizzati da questi enzimi.
- L'induzione può interessare diverse isoforme (es. CYP1A, CYP2B, CYP3A), con effetto enzima- e sostanza-specifico.

Citocromo P450



Gruppo eme (sito attivo)

Esempi di ingredienti cosmetici substrati del CYP450

Fragranze (terpeni, muschi)

Alcuni conservanti (es. parabeni)

Filtri UV (es. benzofenoni)

Alcuni emollienti e lipidi

La **variabilità individuale** nell'induzione enzimatica può modificare **l'esposizione** alla sostanza originaria e ai suoi metaboliti, con possibili implicazioni per il profilo di sicurezza degli ingredienti cosmetici.

In mammals, expression and regulation of XMEs depend on many factors, including genetic factors (polymorphisms), external causes (*e.g.*, enzyme inducers or inhibitors), individual factors such as gender, age, nutrition, health status (disease), pregnancy and several other factors. These potential individual differences are considered in risk assessment by the use

Fattore che influenza il metabolismo	**Possibile influenza sul metabolismo**
Genetica	Polimorfismi degli enzimi metabolizzanti → differenze individuali
Età	Attività enzimatica variabile durante lo sviluppo e l'invecchiamento
Sesso e fattori ormonali	Possibili differenze nell'espressione e nell'attività enzimatica
Dieta e stato nutrizionale	Disponibilità di cofattori e modulazione dell'attività enzimatica
Patologie	Alterazioni del metabolismo, soprattutto nelle malattie epatiche
Farmaci e fattori ambientali	Possibile induzione o inibizione degli enzimi metabolizzanti

La variabilità metabolica può modificare l'esposizione alla sostanza originaria e ai suoi metaboliti, influenzandone la tossicità.



(ii) **Toxicokinetic parameters** may differ between various age groups of children and adults and can result in reduced metabolism, clearance and/or longer half-life that might either increase or decrease the potential risk of an adverse reaction in newborns, depending on the substance (Renwick *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001, Felter *et al*, 2015).

For the CYP450s in the liver, lower activities in newborns/early infants as compared to adults have been described (Johnson, 2003). This data suggests that the extent of bioactivation or metabolic detoxification in children between one and ten years will in generally be lower than that in adults. It is also known that detoxification of xenobiotic substances or metabolites by phase II enzymes may be lower in newborns and infants compared to adults due to yet incomplete development of xenobiotic metabolising enzymes (XME) in the liver (*e.g.*, UDP glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) and some esterases; see SCCS/1446/11). Therefore, depending on the cosmetic ingredient in question, the balance between activating and inactivating XME activities may be crucial for systemic exposure.

In general, however, it is assumed that a specific assessment factor for age-related differences in toxicokinetics is not required (SCCS/1446/11).

With respect to skin metabolism, it is recognised that some metabolic enzymes seem to be less expressed in the skin of children, in particular under the age of 1 year. Hence, neonates, newborns and early infants might have higher internal exposure to certain cosmetic ingredients after dermal application than adults. For a sound risk assessment, relevant human data regarding metabolism are necessary. These data could for instance be gained by an approach combining *in vitro* data on the metabolism of the cosmetic ingredient under investigation and PBPK/PBTK modelling. For such toxicokinetic modelling of the biotransformation in humans of different age groups, relevant *in vitro* data regarding phase I and phase II biotransformation are needed both in human skin and liver (SCCS/1446/11).

Although data on systemic or dermal metabolism is not a regular requirement for SCCS safety evaluation, such data is helpful and sometimes required to complete the toxicity profile of a cosmetic ingredient.

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION

12TH REVISION

INCI-Name: Heptyl Undecylenate

	Result	Test type	Test description	Source
NOAEL (90 Days)	100	animal	OECD 408 with undec-10-enoic acid (ECHA: OECD 408 with heptanol NOAEL = 1000 mg/kg bw/d)	TD0483
Skin Irritation	not irritating	clinically	HRIPT on 51 volunteers	TD0394
Eye Irritation	not irritating	animal	no adv. effects of alkyl esters in this molecular weight range known	TD0011
Sensitization	non-sensitizing	clinically	OECD 422C (DPRA) + HRIPT on 51 volunteers	TD0394
Dermal Absorption	100	in silico	worst case	
Genotoxicity	non-mutagenic	in vitro	OECD 471 with heptanol and undec-10-enoic acid	TD0482
Carcinogenicity	non-carcinogenic	in silico	no adv. effects due to chemical structure to be expected	
Reproductive toxicity	non-toxic to reproduction	animal	OECD 421 with Undec-10-enoic acid, NOAEL > 450 mg/kg bw/d, OECD 422 with Heptanol, NOAEL > 1000 mg/kg bw/d	TD0482
Teratogenicity	non-teratogenic	animal	OECD 421 with Undec-10-enoic acid, NOAEL > 450 mg/kg bw/d, OECD 422 with Heptanol, NOAEL > 1000 mg/kg bw/d	TD0483
Phototoxicity	non-phototoxic	in silico	no absorption in the relevant UV range	
Photosensitization	non-sensitizing	in silico	no absorption in the relevant UV range	
Molecular weight	282.46			
log POW	7.5		calculated	TD0011
CIR-Data	Heptyl Undecylenate is used up to 26 % in cosmetic products, its use is assessed as safe by the CIR.			TD0011
Special Considerations	Heptyl Undecylenate is the ester of heptanol (C7) with undec-10-enoic acid (C11), which are formed under physiological conditions. The lowest values of the individual substances were therefore used to assess systemic toxicity.			

Data on metabolism of a substance is primarily obtained by *in vitro* or *ex vivo* methods using cellular or tissue materials from laboratory animals and increasingly from human sources.

Much progress has been made during the last years in preserving metabolic capacity and regulation of XMEs in cells in culture, for instance by developing 3D-cultivation techniques. At present, these methods are still under development (Anton *et al.*, 2015; Baptista *et al.*, 2016; Fang and Eglen, 2017; Chen *et al.*, 2018).

Under *in vitro* conditions, first pass effects cannot be captured.

- SCCS spinge verso l'utilizzo di **Nuovi Metodi (NAMs)** e **approcci integrati (IATA, AOP)** per ridurre la dipendenza da test animali e migliorare l'accuratezza predittiva, anche per *endpoint* sistemici che coinvolgono il metabolismo

- Nei dossier, è atteso che il valutatore fornisca *justification* / motivazione per le scelte modellistiche (parametri cinetici, trasformazioni metaboliche assunte) e discutere le incertezze con trasparenza.

- In casi di scarsa disponibilità di dati metabolici, SCCS richiede che il valutatore adotti principi conservativi e consideri scenari peggiorativi (*worst-case*).



Un IATA ben costruito considera il **metabolismo** a vari livelli:

- Attività enzimatica nei modelli in vitro (es. metabolizzazione nei tessuti 3D)
- Previsioni in silico di biotrasformazione (modelli QSAR o software dedicati)
- Integrazione di **frazioni metaboliche** nei modelli PBPK
- Discussione del **ruolo di metaboliti attivi o tossici**

3-3.5.2.2 DERMAL METABOLISM

Skin is both a physical and a biochemical barrier to the absorption of chemicals, micro-organisms and particulate materials. Besides the role of the *stratum corneum* as the most critical structure with a barrier function, there is growing evidence that XMEs may have physiological functions in addition to defence of xenobiotic substances. Hence, constitutive expression and regulation (induction) of XMEs is tissue-specific, also in skin. Most of the major enzymes found in the liver may also be present in the skin but often at lower activity levels. Phase II reactions in skin apparently play a greater role than phase I reactions of which the metabolic capacity is considered very low. It is plausible to assume that the role of phase II enzymes in skin is primarily to inactivate exogenous substances, thus supporting the barrier function of skin (Oesch *et al.*, 2007; SCCP/1171/08, Oesch *et al.*, 2014; Gundert-Remy *et al.*, 2014).

There are examples that only small percentages of substances are metabolised in skin. On the other hand, in some cases nearly complete biotransformation during dermal absorption was observed. Whereas the fate of chemicals in the skin with regard to the type and degree of metabolism was considered a matter of uncertainty (SCCP/1171/08), much progress has been made in the characterisation of XMEs in human skin and cutaneous metabolism, including the metabolic competence of cutaneous cell types, such as keratinocytes and dendritic cells. Moreover, the development and metabolic characterisation of *in vitro* skin models has made progress.

Physiologically Based Pharmaco-Kinetic models

Extrapolation from *in vitro* metabolism data to the *in vivo* situation may be difficult although some progress has been made, in particular in combination with Physiologically Based PharmacoKinetic (PBPK) modelling (Coecke *et al.*, 2013; Wilk-Zasadna *et al.*, 2014; see also Section 3-3.5.3). Often, *in vivo* data from laboratory animals, or even more from humans, is helpful or even indispensable in order to clarify if or to which extent relevant metabolites are formed (see OECD 417 on toxicokinetics).

MODELLI PBPK: DALL'ESPOSIZIONE ALLA DOSE INTERNA

I modelli PBPK sono **modelli matematici** che descrivono l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) di una sostanza, integrando:

- **Parametri fisiologici**: volumi degli organi, flussi sanguigni, caratteristiche dei tessuti.
- **Proprietà della sostanza**: lipofilia, solubilità, legame alle proteine, permeabilità.
- **Parametri metabolici**: clearance e attività enzimatica.
- **Condizioni di esposizione**: dose, via di esposizione e durata.

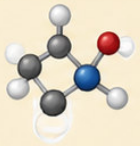
Obiettivo: prevedere la concentrazione della sostanza nel sangue e nei tessuti nel tempo. Per la sicurezza cosmetica, questi modelli possono aiutare a stimare l'esposizione interna conseguente all'applicazione cutanea.

In conclusion, SCCS will use data from PBPK models for quantitative risk assessment only if sufficient details (see below) are provided so that the calculations can be evaluated. Otherwise, the data may only be used as supporting information. In this respect, the following

STRUTTURA DI UN MODELLO PBPK

INPUT DEL MODELLO

Proprietà della sostanza
- Peso molecolare
- Lipofilia (logP)
- Solubilità
- Legame alle proteine
- Permeabilità cutanea



Parametri fisiologici
- Volumi degli organi
- Flussi sanguigni
- Composizione dei tessuti



Parametri metabolici
- Clearance
- Attività enzimatica (es. CYP, UGT, SULT)

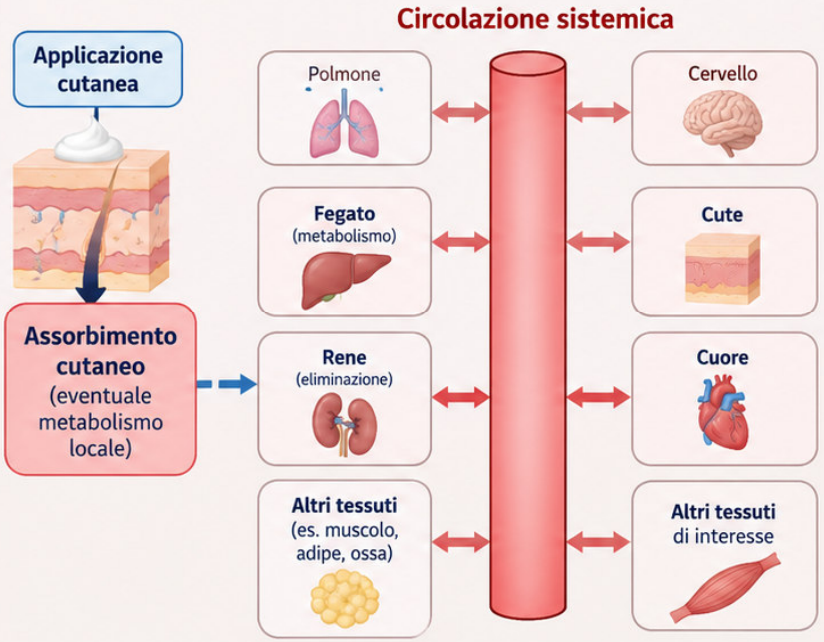


Scenario di esposizione
- Via di esposizione (es. cutanea)
- Dose
- Frequenza e durata



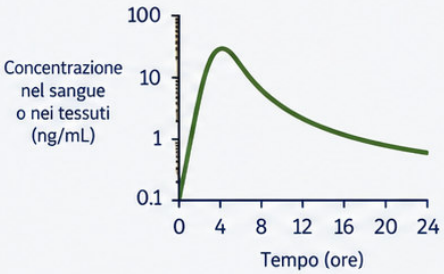
MODELLO PBPK

Rappresentazione matematica dell'organismo



OUTPUT DEL MODELLO

Concentrazione nel tempo



Parametri stimati
- Concentrazioni ematiche e tissutali
- AUC (esposizione interna)
- Emivita
- Clearance
- Frazione assorbita
- Contributo del metabolismo

I modelli PBPK integrano dati sulla sostanza, sulla fisiologia dell'organismo e sui processi di ADME per prevedere la concentrazione nel sangue e nei tessuti neıl tempo dopo l'esposizione.

Tossicologia Sistemica: Rilevanza per la valutazione della sicurezza di un prodotto cosmetico

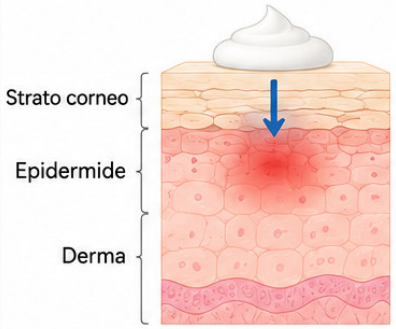
Argomenti trattati

- ✓ **Tossicologia e classificazione degli effetti tossici**
- ✓ Tossicocinetica - **Assorbimento cutaneo, percutaneo**, orale o per altre vie di somministrazione
- ✓ **Metabolismo** (Biotrasformazione): **cutaneo**, orale o per altre vie di somministrazione
- ✓ Valutazione della tossicità locale e **tossicità sistemica**
- ✓ **Tossicità sistemica**: NOAEL, LOAL, BMD, TTC (Point of Departure – POD), calcolo dell'esposizione alle sostanze (SED: Systemic Expoxure Dosage) in seguito a dosi singole/ripetute,
- ✓ **Safety Evaluation** (MOS = Margin of Safety) ed importanza del Reasoning
- ✓ **Principi di tossicologia genetica**: meccanismi ed interpretazione Risultati

TOSSICITA' DEI PRODOTTI COSMETICI: DUE LIVELLI DIVERSI

TOSSICITÀ LOCALE

Effetti nel punto di contatto

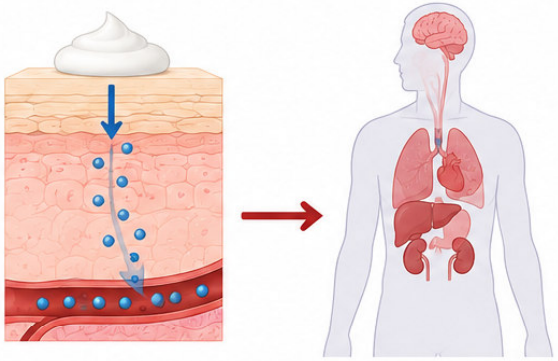


- Irritazione cutanea
- Irritazione oculare
- Sensibilizzazione cutanea
- Altri effetti locali

Le risposte si manifestano solo nella sede di applicazione

TOSSICITÀ SISTEMICA

Effetti a distanza, dopo assorbimento



- Tossicità su organi e sistemi
- Effetti sullo sviluppo e sulla riproduzione
- Cancerogenicità
- Interferenza endocrina
- Altri effetti sistemici

Le risposte si manifestano in organi e tessuti a distanza dal sito di applicazione

FOCUS DELLA LEZIONE: TOSSICITÀ SISTEMICA

Valutazione dell'esposizione interna, distribuzione nell'organismo e potenziali effetti sistemici per la salute.

Regolamento (G.U. del 30 novembre 2009. In vigore dall '11 luglio 2013)
ALLEGATO 1: Informazioni sulla sicurezza dei prodotti cosmetici- "*Cosmetic product safety report*"(CPSR)
Parte A: INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA

8. Profilo tossicologico delle sostanze

Nei casi di **assorbimento percutaneo** significativo, vanno considerati gli effetti sistemici e va valutato il **NOAEL** (*no-observed-adverse-effect level*). L'assenza di tali informazioni va debitamente motivata.
Va tenuto conto in particolare anche degli eventuali effetti sul profilo tossicologico dovuti a granulometria; impurità delle sostanze e delle materie prime utilizzate; e interazione tra sostanze.

L'eventuale applicazione del metodo "**read-across**" va debitamente documentata e motivata.
Le fonti d'informazione vanno identificate chiaramente.

Read-across: utile, ma la robustezza dipende dalla qualità della giustificazione scientifica

3-4.3.2 READ-ACROSS

Read-across methods derive the estimates of toxicity of a query (untested) substance from the existing data on other structurally or mechanistically 'similar' compounds.

A number of computational tools are available that allow the selection of closely-similar analogues for data read-across on the basis of structure-activity principles and rules

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION



of judgement.

Furthermore, the most crucial prerequisite for a reliable read-across is the appropriate selection of similar/analogous substances. Thus, for the outcome of a read-across to be reliable, the database used needs to be of high quality and sufficiently large to provide a reasonable number of the analogues belonging to the same type/class and/or the mode of

(iv) SCCS guidance:

Whilst *in silico* models and RAx methods provide a useful non-testing means for deriving estimates of toxicity of untested compounds, each model can have certain limitations that can impact the reliability of the results, especially when assessing different chemical types and toxicological endpoints. Therefore, the SCCS considers that the use of a single *in silico* model/system in this regard is not adequate and recommends the use of more than one relevant model/system to increase the reliability of the derived toxicity estimates. Wherever possible, a combination of *in chemico* (e.g. grouping and other chemical analogy approaches), *in silico* (e.g. QSAR models) and RAx methods should be applied to derive estimates of toxicity before experimental testing is considered. In the view of the SCCS, the toxicity estimates derived from *in silico* models/RAx alone will not be sufficient to support safety of a regulated cosmetic ingredient.

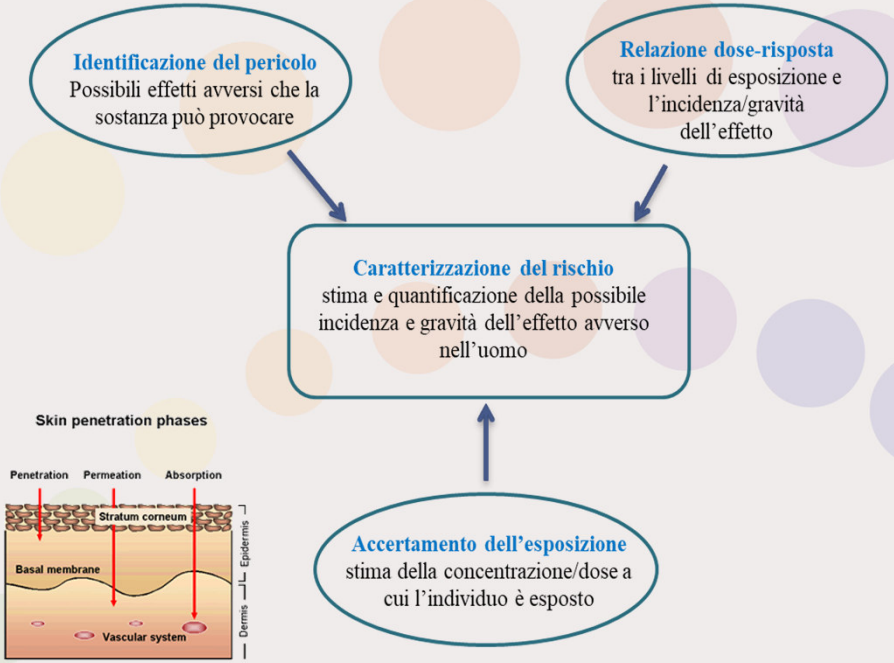
The results of *in silico* toxicity assessment are more useful for hazard assessment when they are integrated with other sources of evidence (e.g. *in vitro* results) into an overall WoE (SCCS/1578/16, EFSA, 2017a). It should also be appreciated that the use of *in silico* models and tools, and interpretation of the results, requires expert judgement, appropriate documentation and justification, and therefore cannot be accepted as the outcome of a 'black box' technology.

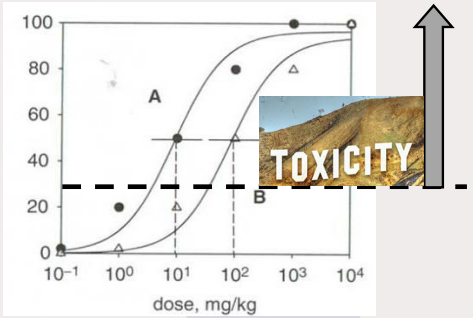
Read-across non può coprire bene endpoint complessi come tossicità cronica, carcinogenicità, tossicità riproduttiva o effetti endocrini, a meno che non ci siano dati molto forti e analogie ben documentate.

Spesso la documentazione richiesta per "giustificare" il read-across è consistente: bisogna mostrare dati, modelli, comparazioni, razionale ben definito. Se queste sono deboli, l'affidabilità cala.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI TOSSICITA' SISTEMICA (RISK ASSESSMENT)







Per valutare e **caratterizzare il rischio** associato alla presenza di sostanze nei prodotti cosmetici può essere usato il **MoS (Margin of Safety)**, o margine di sicurezza, che è espresso come rapporto tra il **PODsys dell'effetto critico** e la stima della dose sistemica di **esposizione (SED).**

TOSSICITA' SISTEMICA
SINGOLA DOSE *vs* DOSI RIPETUTE
Relazione dose-esposizione sistemica per sostanze diverse

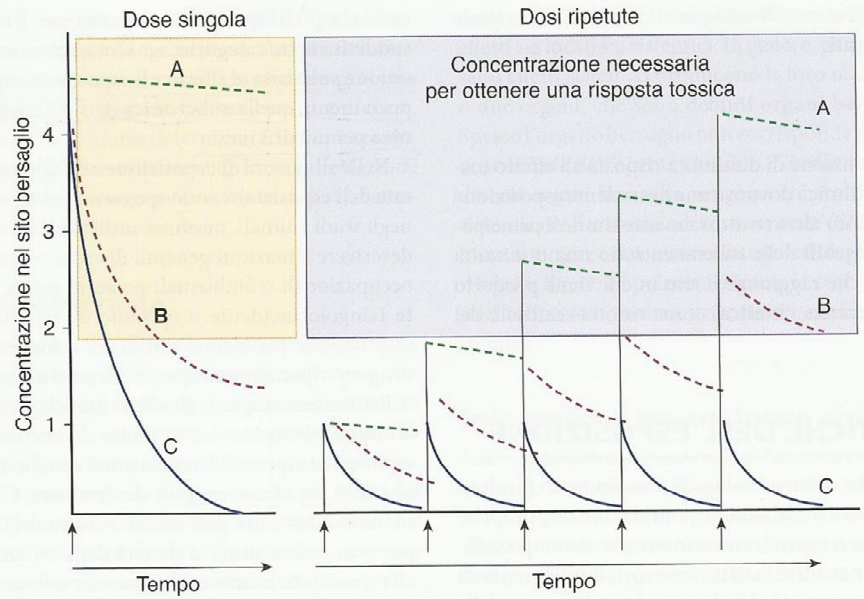


FIGURA 2-1 **Relazione tra la dose somministrata e la concentrazione al sito bersaglio in diverse condizioni di frequenza di dosaggio e velocità di eliminazione.** Linea A: sostanza con velocità di eliminazione molto lenta (es. emivita di 1 anno). Linea B: sostanza con velocità di eliminazione uguale alla frequenza di dosaggio (es. 1 giorno). Linea C: sostanza con velocità di eliminazione maggiore della frequenza di dosaggio (es. 5 ore). L'area viola rappresenta la concentrazione della sostanza nel sito bersaglio necessaria per provocare una reazione tossica.

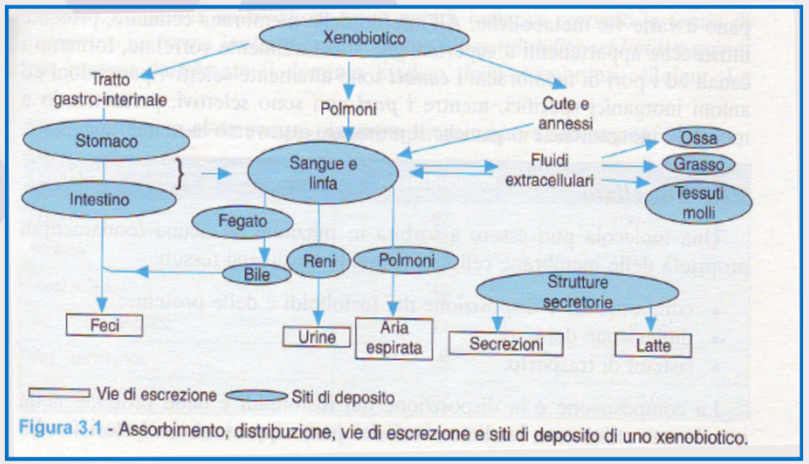


Figura 3.1 - Assorbimento, distribuzione, vie di escrezione e siti di deposito di uno xenobiotico.

Casarett & Doul – Elementi di Tossicologia – Casa Ed. Ambrosiana

Archives of Toxicology (2021) 95:1867–1897
https://doi.org/10.1007/s00204-021-03034-y

REVIEW ARTICLE

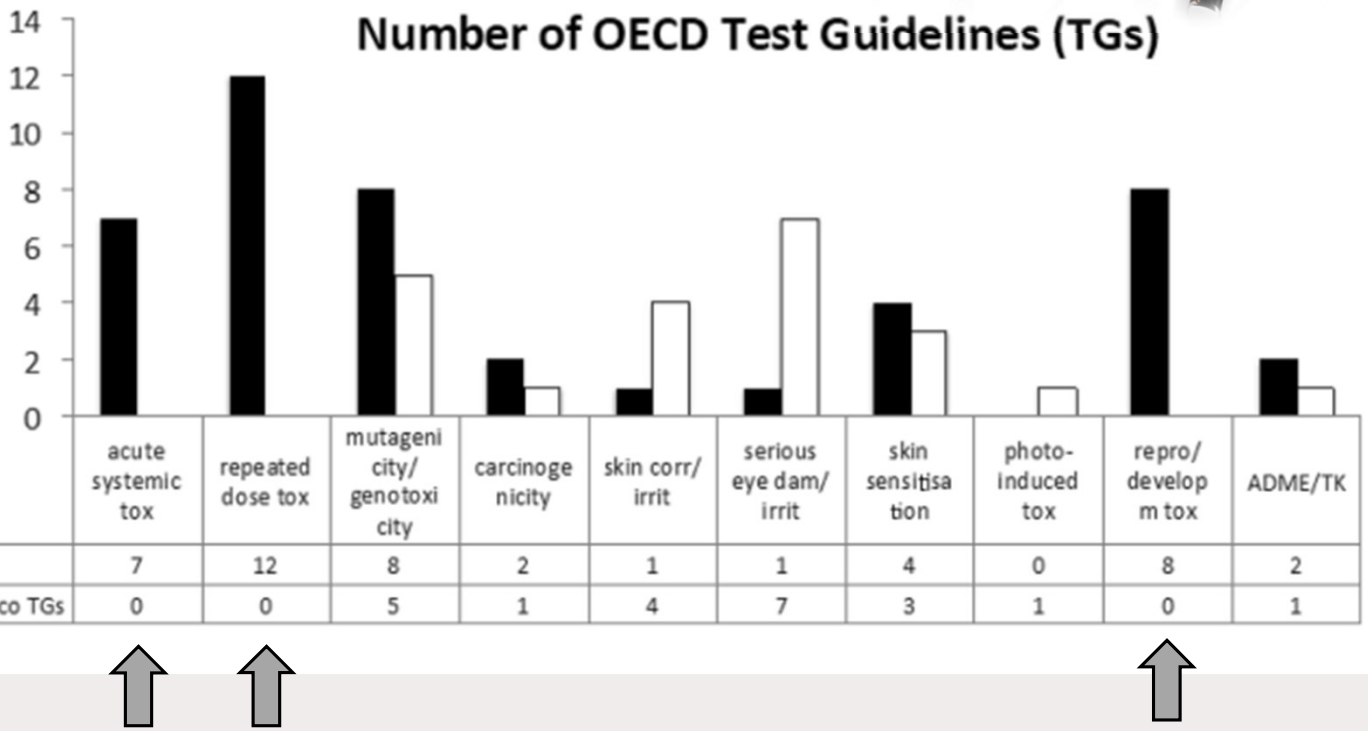
Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies

Francesca Pistollato[1] · Federica Madia[1] · Raffaella Corvi[1] · Sharon Munn[1] · Elise Grignard[1] · Alicia Paini[1] · Andrew Worth[1] · Anna Bal-Price[1] · Pilar Prieto[1] · Silvia Casati[1] · Elisabet Berggren[1] · Stephanie K Bopp[1] · Valérie Zuang[1]



Archives of Toxicology (2021) 95:1867–1897

Fig. 1 Bar graph summarising the numbers of available OECD Test Guidelines (TGs) addressing the assessment of the human health-related endpoints here described, comparing in vivo TGs (black bars) and in vitro/in chemico TGs (white bars)



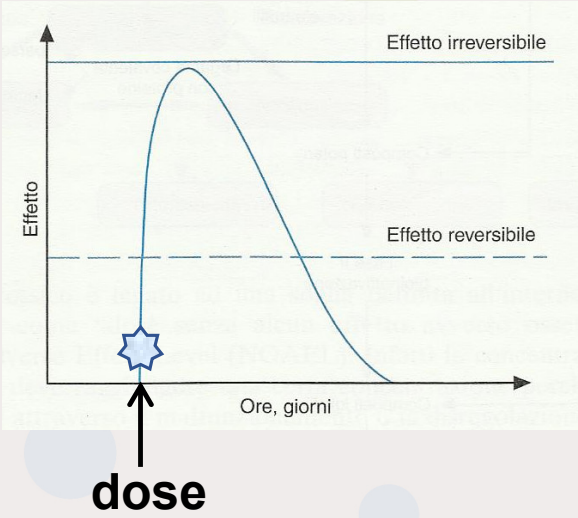
	acute systemic tox	repeated dose tox	mutagenicity/ genotoxicity	carcinogenicity	skin corr/ irrit	serious eye dam/ irrit	skin sensitisation	photo-induced tox	repro/ develop m tox	ADME/TK
■ in vivo TGs	7	12	8	2	1	1	4	0	8	2
□ In vitro/in chemico TGs	0	0	5	1	4	7	3	1	0	1

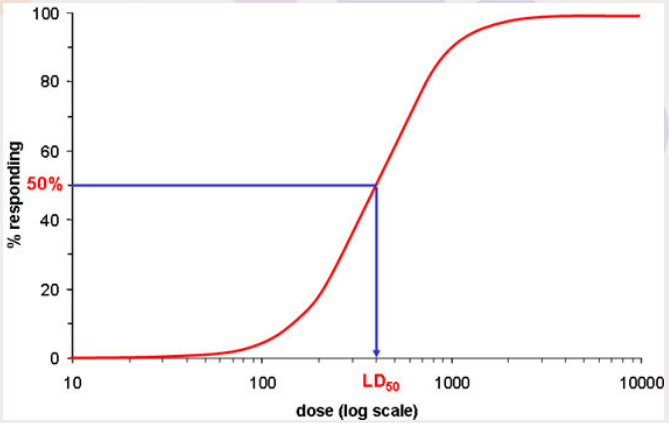
TOSSICITA' ACUTA
(1 dose o dosi multiple nelle 24h; osservazione 14 - 21 gg)

Effetti negativi sulla salute che possono derivare da **una singola esposizione (una dose singola o più dosi nelle 24h)** a una sostanza tramite la via di somministrazione.

Originariamente, i test di tossicità acuta orale *in vivo* sono stati sviluppati per determinare il valore di LD_{50} (dose alla quale il 50% degli animali manifesta l'effetto tossico) del composto in esame. Ora è sostituito da metodi che utilizzano poche dosi [OECD TG 420 (Fixed Dose Procedure), TG 423 (Acute Toxic Class Method) e TG 425 (Up-and-Down Procedure)] – Es: da 5-50 o 50-500 mg/kg.

http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ (Organization of Economic Cooperation and Development)





THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

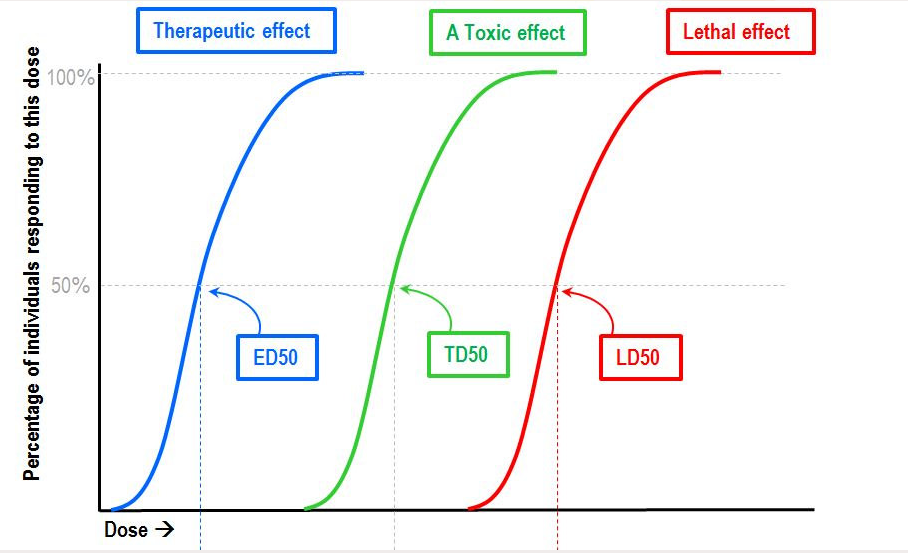
3-4.4 Acute toxicity

The term **acute toxicity** means those adverse effects occurring following oral or dermal administration of a single dose of a substance, or multiple doses given within 24 hours, or an
inhalation exposure of 4 hours (Regulation (EC) No 1272/2008).

In light of the animal testing ban for cosmetic ingredients (see section 1 and **Appendix 3**), data on acute toxicity is not mandatory for assessing the safety of cosmetic ingredients for consumer use. A WoE approach may be sufficient - such as justified conclusions from chemical grouping/read-across, (Q)SAR, *in vitro* studies, or when accessible, repeated dose toxicity studies.
Relative non-testing information sources on acute toxicity such as available approaches, (Q)SAR software packages and a list of databases from where acute toxicity data may be retrieved (ECHA 2017).
Some generic alternative approaches, mostly referring to RAx and physico-chemical properties, are presented in (OECD GD 237).

If data on acute toxicity *in vivo* are available, these data should be provided. It should be noted, however, that safety evaluation will be based on (sub)chronic toxicity studies.

TOSSICITA' ACUTA
(1 dose o dosi multiple nelle 24h; osservazione 14 - 21 gg)

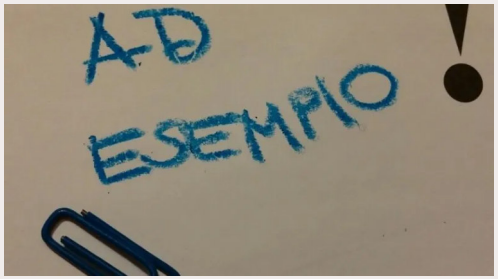


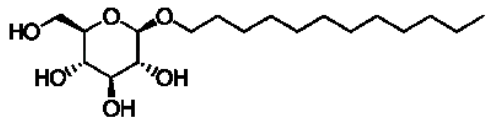
1) Valutazione quantitativa della tossicità di una sostanza.
2) Fornisce informazioni sugli organi bersaglio e sulle manifestazioni cliniche della tossicità.
3) Identifica eventuali differenze di specie e sesso.
4) Stabilisce l'eventuale reversibilità dell'effetto tossico.
5) Permette di individuare i livelli di dosi da utilizzare negli studi successivi.

I sintomi più comunemente descritti negli esperimenti di tossicità acuta sono:

- ✓ Respiratori (dispnea, apnea, cianosi, tachipnea, edema polmonare)
- ✓ Cardiovascolari (variazioni della frequenza, extrasistoli, variazioni dell'ECG, ipotensione, ipertensione, vasocostrizione o vasodilatazione cutanea)
- ✓ SNC (convulsioni, variazioni del tono muscolare, variazioni della motilità, sonno, analgesia, piloerezione, variazioni delle funzioni motorie superiori)
- ✓ Cutanei (eritema, edema, alterazioni del pelo)
- ✓ Gastroenterici (vomito, diarrea, emorragie gastro-intestinali)

Studio autoptico degli animali (esame anatomo-istopatologico degli organi

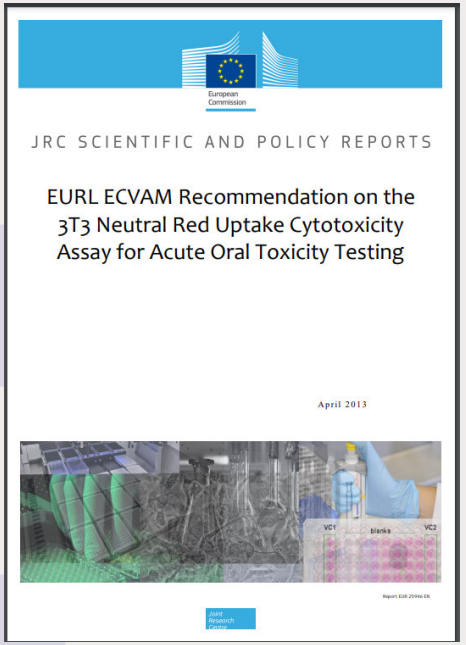


LAURYL GLUCOSIDE		Fonte del dato
DESCRIZIONE	E' un tensioattivo non ionico. Chimicamente, è un etere fra acidi grassi C12-16 e oligomeri del glucosio. Presenta ottime proprietà schiumogene e risulta estremamente delicato sulla cute. Riduce l'aggressività dei tensioattivi primari.	
STRUTTURA		
IMPUREZZE	Il fornitore non specifica impurezze con rilevanza tossicologica	
PESO MOLECOLARE	343 -	CIR IJT 32(Suppl. 3):22-48, 2013
Log P o/w	<= -0.07 (20°C)	ECHA registration dossier
Tossicità acuta - orale - cutanea - inalazione	LD50 (Orale). > 5000 mg/kg bw - ratto - OECD Guideline 401 (Acute Oral Toxicity) LD50 (Cutanea). > 2000 mg/kg bw – coniglio - OECD Guideline 402 (Acute Dermal Toxicity)	ECHA registration dossier
irritazione - corrosione cutanea	Irritante per la pelle (EU Method B.4 (Acute Toxicity: Dermal Irritation / Corrosion)	ECHA registration dossier
irritazione - corrosione oculare	Irritante per gli occhi (OECD Guideline 405 (Acute Eye Irritation / Corrosion)	ECHA registration dossier
Sensibilizzazione cutanea	Non causa sensibilizzazione.	ECHA registration dossier
CMR	Non CMR	ECHA registration dossier
Tossicocinetica	Considerato il valore di Log P o/w, si può considerare un assorbimento cutaneo del 10%	SCCS/1501/12

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

A. NAMs

- The only validated *in vitro* method existing at present for acute oral toxicity (EURL ECVAM endorsed) is the 3T3 NR (neutral red) uptake test, applicable for non-classified chemicals, based on a cut-off of LD50>2000 mg/kg bw (JRC, 2013).



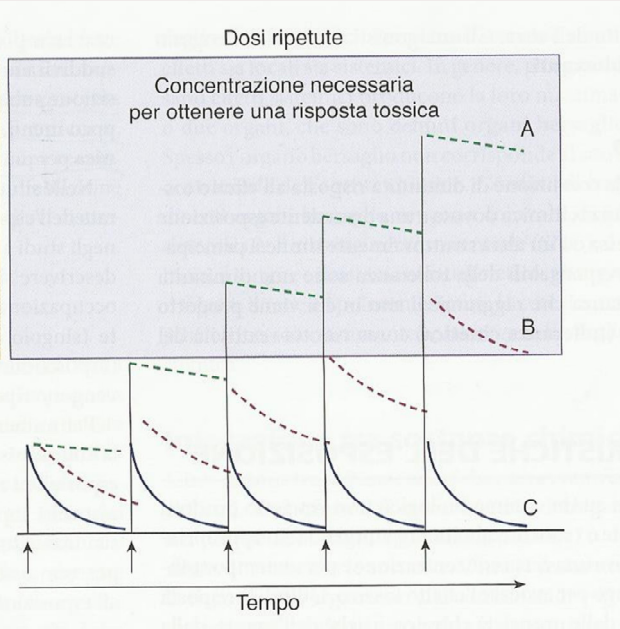
Descrizione del metodo – Test 3T3 NRU

Il test 3T3 NRU (*Neutral Red Uptake*) valuta la vitalità dei fibroblasti murini BALB/c 3T3 attraverso la loro capacità di incorporare il colorante Rosso Neutro.

Il metodo misura la **citotossicità basale** e può contribuire a identificare sostanze con bassa tossicità acuta orale (LD50 > 2000 mg/kg).

Può essere utilizzato nell'ambito di **strategie integrate di valutazione** (*weight of evidence*), contribuendo a ridurre il ricorso alla sperimentazione animale.

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE



1) IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO
Quali effetti avversi può causare la sostanza?

2) RELAZIONE DOSE-RISPOSTA
Come varia l'incidenza e la gravità degli effetti con la dose?

3) VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE
A quali livelli di esposizione è prevista la popolazione?

CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO
Integrazione di pericolo, dose-risposta ed esposizione

Qual è la relazione tra dose ed incidenza/gravità degli effetti avversi?
Al crescere della dose può aumentare l'incidenza e la gravità degli effetti.

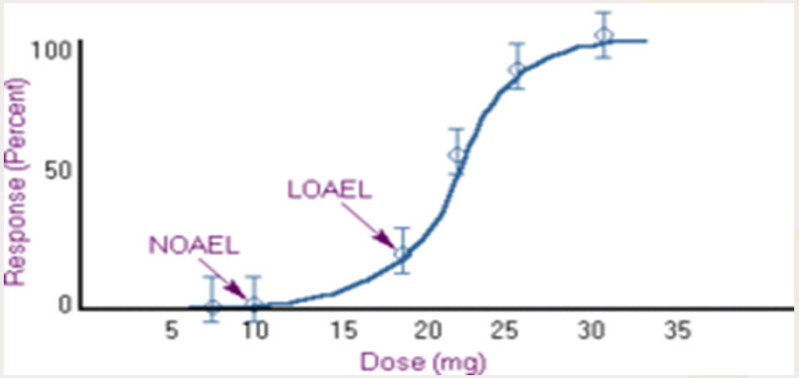
Qual è la dose necessaria per causare un effetto avverso?
La dose alla quale si osservano effetti dipende dal tipo di effetto e dalla popolazione considerata.

NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)
È la dose o il livello di esposizione più elevato, in uno studio specifico, alla quale non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

Il NOAEL può essere ricavato da:
- studio di tossicità subcronica orale a 90 giorni
- studi di tossicità riproduttiva
  (es. tossicità materna, effetti sullo sviluppo, prevalentemente teratogenicità)

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE

Repeated dose toxicity comprises the adverse general toxicological effects (excluding reproductive, genotoxic and carcinogenic effects) occurring as a result of repeated daily dosing with, or exposure to, a substance for a specific part of the expected lifespan of the test species.



NOAEL = No Observed Adverse Effect Level

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level

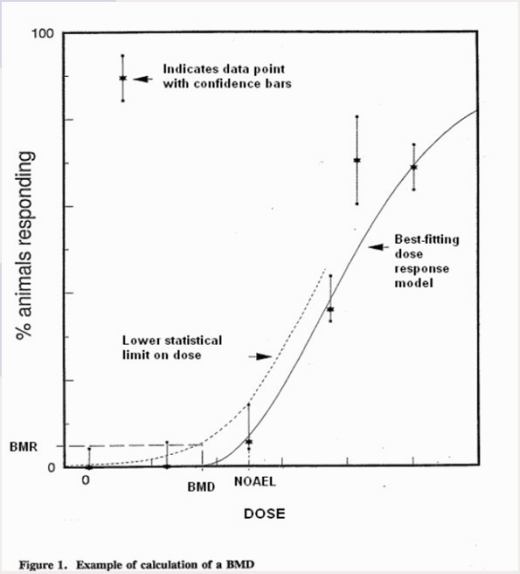


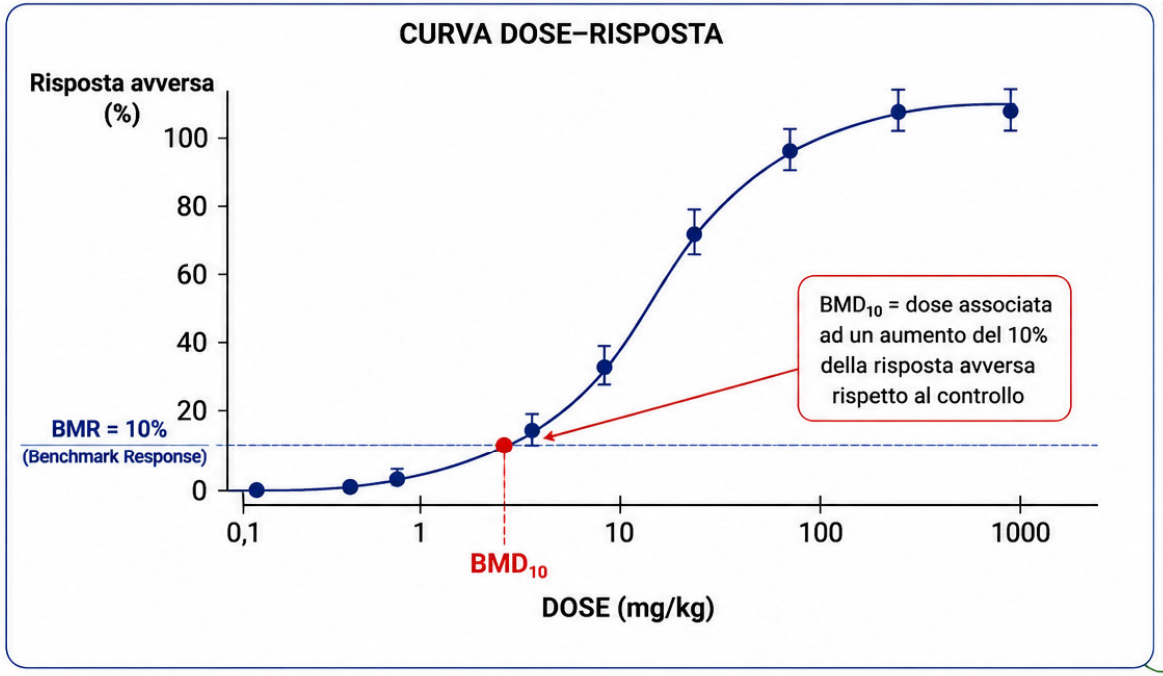
Figure 1. Example of calculation of a BMD

Si utilizzano almeno tre dosi della sostanza

BMDL = limite inferiore dell'intervallo di confidenza della BMD

Quando sono disponibili dati dose-risposta adeguati, la BMDL può essere preferita al NOAEL come Point of Departure (POD).

BENCHMARK DOSE (BMD): IL CONCETTO



BMR
Benchmark Response (es. 10% di aumento della risposta avversa)

BMD
Dose associata al BMR sulla curva dose–risposta

BMDL
Limite inferiore dell'intervallo di confidenza (uso regolatorio)
Utilizzato nel Risk Assessment

NOAEL



- Dose più alta senza effetto osservato
- **DIPENDE DALLE DOSI TESTATE**
- Può sovrastimare o sottostimare il rischio

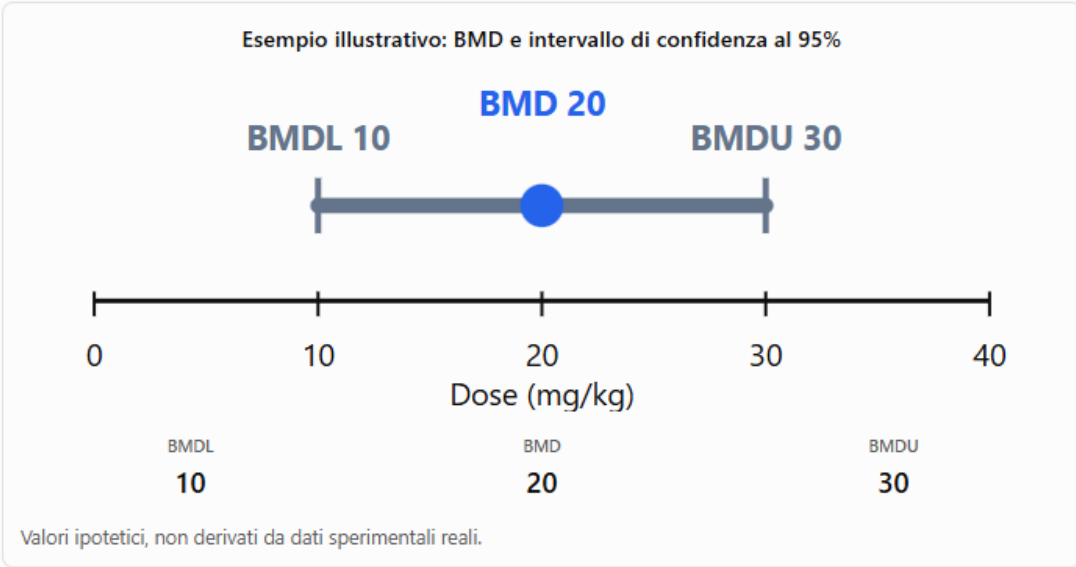
BMD



- Utilizza **TUTTA** la curva dose–risposta
- **STIMA** in modo statistico l'effetto anche a dosi non testate
- Più robusta e meno dipendente dallo studio

La BMD è una stima della dose che produce un piccolo, ma definito, aumento dell'effetto avverso.
Nel Risk Assessment si utilizza generalmente il BMDL come Point of Departure (POD).

Che cos'è l'intervallo di confidenza?
Quando stimiamo un valore utilizzando dati sperimentali, non possiamo considerarlo assolutamente esatto.
Se ripetessimo lo studio, potremmo ottenere un risultato leggermente diverso.
L'intervallo di confidenza serve a esprimere l'incertezza associata alla nostra stima.



Il modello stima una BMD di 20 mg/kg, ma questa stima presenta un'incertezza. L'intervallo di confidenza al 95%, in questo esempio, va da 10 a 30 mg/kg.
Tecnicamente, il 95% si riferisce alla capacità della procedura statistica di produrre intervalli che comprendono il vero valore in ripetizioni ipotetiche dello studio, non alla probabilità che il valore vero sia contenuto in questo specifico intervallo.

VANTAGGI DELLA BENCHMARK DOSE (BMD) RISPETTO AL NOAEL

BMD = Benchmark Dose; BMDL = Benchmark Dose Lower Confidence Limit; BMR = Benchmark Response.

	NOAEL	BMD / BMDL
Definizione	Massima dose sperimentale alla quale non si osservano effetti avversi	Dose stimata mediante modellizzazione della relazione dose-risposta, associata a un livello prefissato di risposta (BMR)
Dipendenza dal disegno sperimentale	Elevata: dipende dalle dosi selezionate e dalla potenza statistica dello studio	Minore dipendenza dalla scelta delle singole dosi, ma sensibile alla qualità e distribuzione dei dati
Utilizzo dei dati	Si basa sull'identificazione di una dose sperimentale senza effetti avversi osservati	Utilizza l'intera relazione dose-risposta
Stima dell'incertezza	Non fornisce direttamente un intervallo di confidenza	La BMDL rappresenta il limite inferiore di confidenza della BMD
Riproducibilità	Può variare sensibilmente con il disegno sperimentale	Generalmente più robusta, se il modello è adeguato
Impiego nella valutazione del rischio	Tradizionalmente utilizzato come punto di partenza	Approccio preferibile quando sono disponibili dati adeguati per la modellizzazione

La BMD consente una valutazione più completa della relazione dose-risposta e una quantificazione dell'incertezza, superando alcuni limiti del NOAEL.

LOAEL

BMDL

NOAEL



POD_{SYS}

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE

- ✓ **A breve termine**: 14-28 giorni [se utilizzata per il calcolo del MoS (Margin Of Safety) si applica un ulteriore fattore di sicurezza pari a 3].
- ✓ **Prolungata (sub-cronica)** (10-25 % della vita dell'animale, subcronica): 90 giorni (nel ratto e nel topo) - 1 anno (nel cane).
- ✓ **Cronica** (es. cancerogenesi) (> 50% della vita): 2 anni nel ratto; 18 mesi nel topo.

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION

A. NAMs

No validated alternative method is available yet for determining the repeated dose toxicity of a substance, which poses a problem for new compounds as this assay usually provides the PoD of the compound under investigation (necessary for MoS calculation).

B. In vivo

The following ***in vivo* repeated dose toxicity studies** with OECD guidelines are available:

1)

- Sub-acute oral toxicity (28 days) (EC B.7, OECD 407)
- Sub-acute dermal toxicity study (28 days) (EC B.9, OECD 410)
- Sub-acute inhalation toxicity study (28 days) (EC B.8, OECD 412)

2)

- Sub-chronic oral toxicity study: repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents (EC B.26, OECD 408)
- Sub-chronic oral toxicity study: repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents (EC B.27, OECD 409)
- Sub-chronic dermal toxicity study: repeated dose 90-day dermal toxicity study using rodent species (EC B.28, OECD 411)
- Sub-chronic inhalation toxicity study: repeated dose 90-day inhalation toxicity study using rodent species (EC B.29, OECD 413)

3)

- Chronic toxicity studies (primarily rodents) (EC B.30, OECD 452)
- Combined chronic toxicity/carcinogenicity studies (primarily rodents) (EC B.33,OECD 453)

In the case of the development of cosmetic ingredients that will be in contact with human skin and *mucosae* repeatedly, the SCCS is convinced that evaluation of the systemic toxicity is a key element in safety assessment.

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE

INITIAL CONSIDERATIONS

3. In the assessment and evaluation of the toxic characteristics of a chemical, the determination of sub-chronic oral toxicity using repeated doses may be carried out after initial information on toxicity has been obtained from acute or repeated dose 28-day toxicity tests. The 90- day study provides information on the possible health hazards likely to arise from repeated exposure over a prolonged period of time covering post-weaning maturation and growth into adulthood of the test animals. The study will provide information on the major toxic effects, indicate target organs and the possibility of accumulation of test chemical, and can provide an estimate of a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of exposure which can be used in selecting dose levels for chronic studies and for establishing safety criteria for human exposure. Alternatively, this study yields dose related response data that may be used to estimate point of departure for hazard assessment using appropriate modelling methods (e.g., benchmark dose analysis).

90 DAY STUDY

CHRONIC STUDY

PRINCIPLE OF THE TEST

13. The test chemical is administered daily in graduated doses to several groups of experimental animals, normally for a period of 12 months, although longer or shorter durations may also be chosen depending on regulatory requirements (see paragraph 33). This duration is chosen to be sufficiently long to allow any effects of cumulative toxicity to become manifest, without the confounding effects of geriatric changes. Deviations from exposure duration of 12 months should be justified, particularly in the case of shorter durations. The test chemical is normally administered by the oral route although testing by the inhalation or dermal route may also be appropriate. The study design may also include one or more interim kills, e.g. at 3 and 6 months, and additional groups of animals may be included to accommodate this (see paragraph 19). During the period of administration the animals are observed closely for signs of toxicity. Animals which die or are killed during the test are necropsied and, at the conclusion of the test, surviving animals are killed and necropsied.

Spesso non abbiamo i dati di biodisponibilità (assorbimento) transcutanea ma da somministrazione orale

For some cosmetic ingredients, dermal repeated dose toxicity studies are submitted. These studies, if of good quality, are taken into consideration by the SCCS as it is the most commonly used application route for cosmetics. In practice, however, oral route studies are often used for the MoS calculation to consider (worst case) systemic exposure. Oral repeated dose toxicity studies can be either subacute (28 days), subchronic (90 days) or chronic (taking 85% of lifetime).

L'assenza di studi per via cutanea viene ovviata considerando studi per via orale su roditori o cane, che sono considerati adeguati poiché l'esposizione orale è un «***worst case***» rispetto alla somministrazione per via cutanea.

THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12TH REVISION



ELSEVIER

Food and Chemical Toxicology 42 (2004) 517–543

www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Review

Toxicity and human health risk of hair dyes

Gerhard J. Nohynek[a,*], Rolf Fautz[b], Florence Benech-Kieffer[c], Herve Toutain[a]

[a]L'Oreal Research and Development, Worldwide Safety Department, 25-29, quai Aulagnier, 92600 Asnières, France
[b]KPSS—Kao Professional Salon Services GmbH, Pfungstädter Strasse 92–100, 64297 Darmstadt, Germany
[c]L'Oreal Recherche, Cutaneous Bioavailability and Metabolism, 1, avenue E. Schuller, 93600 Aulnay sur bois, France

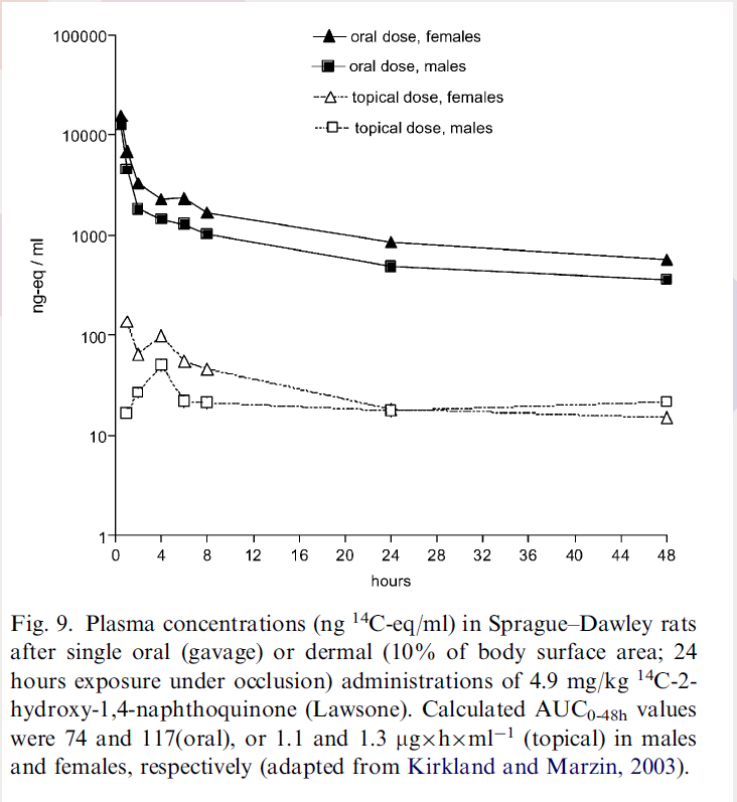


Fig. 9. Plasma concentrations (ng ^{14}C-eq/ml) in Sprague–Dawley rats after single oral (gavage) or dermal (10% of body surface area; 24 hours exposure under occlusion) administrations of 4.9 mg/kg ^{14}C-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Lawsone). Calculated $AUC_{0\text{-}48h}$ values were 74 and 117(oral), or 1.1 and 1.3 $\mu g \times h \times ml^{-1}$ (topical) in males and females, respectively (adapted from Kirkland and Marzin, 2003).

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE (REASONING – EFFETTO CRITICO)

In repeated dose toxicity studies, the target(s) organ(s) and critical endpoint(s) may be identified. The critical endpoint is defined as the first (in terms of dose level) adverse effect associated with the substance. This effect should be biologically relevant for human health and also in the context of cosmetic exposure. For example, local effects on the gastrointestinal tract, sometimes observed with irritants after oral exposure, are not considered relevant by the SCCS to be used for the MoS calculation. A BMD, NOAEL or LOAEL (PoD) is then derived for each study. If the dose regimen of a study was limited to 5 days treatment per week, the derived PoD will be corrected by a factor of 5/7. In analogy, a correction will also be done for longer use periods. A key study (the more relevant one in terms of duration of exposure, quality of the study, levels of the BMD/NOAEL/LOAEL...) is then selected by the SCCS to be used for the safety evaluation (see Section 3-5.1).

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE (REASONING)

- ✓ Per l'identificazione dei valori di riferimento per gli effetti con soglia si parte dalla derivazione di un PODsys, **dopo aver identificato l'effetto critico** nella specie più appropriata e più sensibile per la durata e attraverso la via di esposizione più simili alle reali condizioni d'uso.

L'effetto critico può essere tale perché:

- ✓ è presente alle dosi più basse.
- ✓ è più rilevante per l'uomo dal punto di vista tossicologico
- ✓ proviene dallo studio più appropriato e di migliore qualità per l'estrapolazione all'uomo
- ✓ Dose-dipendenza dell'effetto; Presenza di effetti correlati alle dosi più alte (i.e. aumento delle transaminasi epatiche -vs ipertrofia epatocellulare o necrosi); Coerenza del quadro generale; Presenza degli effetti in un numero elevato di animali per gruppo; Presenza in entrambi i sessi

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE (REASONING)

- ✓ Quando sono disponibili più studi in diverse specie animali (**diversi PODsys**), il POD utilizzato sarà quello più basso (N.B. se rilevante nel contesto di uso del prodotto);

- ✓ Se sono disponibili dati metabolici e tossicocinetici, la specie più simile all'uomo relativamente agli effetti tossici deve essere preferite a quelle più sensibili;

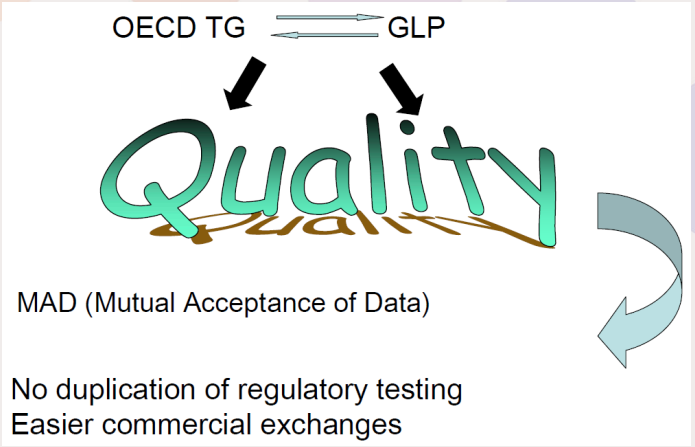
- ✓ Se alcuni studi sono qualitativamente superiori ad altri e/o differiscono tra di loro relativamente la durata (es. lungo vs breve termine), ai fini della scelta del POD bisogna dare maggior peso agli studi con maggior durata e affidabilità.

Gli studi inclusi nel PIF dovrebbero essere condotti in accordo con **specifiche Test Guidelines OECD** in centri di ricerca certificati per le **GLP (Good Laboratory Practice)/BPL (Buona Pratica di Laboratorio)**.

Gli studi inclusi nei Dossier devono essere condotti secondo quanto descritte nelle specifiche **OECD** Test Guidelines in centri di ricerca certificati per le **GLP (Good Laboratory Practice)**

Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico

https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm



THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION
11TH REVISION

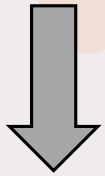
According to the Cosmetics Regulation, the experimental studies have to be carried out in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP)laid down in Council Directive 87/18/EEC. All possible deviations from this set of rules should be explained and scientifically justified (SCCNFP/0633/02).

INCI-Name: Heptyl Undecylenate

	Result	Test type	Test description	Source
NOAEL (90 Days)	100	animal	OECD 408 with undec-10-enoic acid (ECHA: OECD 408 with heptanol NOAEL = 1000 mg/kg bw/d)	TD0483
Skin Irritation	not irritating	clinically	HRIPT on 51 volunteers	TD0394
Eye Irritation	not irritating	animal	no adv. effects of alkyl esters in this molecular weight range known	TD0011
Sensitization	non-sensitizing	clinically	OECD 422C (DPRA) + HRIPT on 51 volunteers	TD0394
Dermal Absorption	100	in silico	worst case	
Genotoxicity	non-mutagenic	in vitro	OECD 471 with heptanol and undec-10-enoic acid	TD0482
Carcinogenicity	non-carcinogenic	in silico	no adv. effects due to chemical structure to be expected	
Reproductive toxicity	non-toxic to reproduction	animal	OECD 421 with Undec-10-enoic acid, NOAEL > 450 mg/kg bw/d, OECD 422 with Heptanol, NOAEL > 1000 mg/kg bw/d	TD0482
Teratogenicity	non-teratogenic	animal	OECD 421 with Undec-10-enoic acid, NOAEL > 450 mg/kg bw/d, OECD 422 with Heptanol, NOAEL > 1000 mg/kg bw/d	TD0483
Phototoxicity	non-phototoxic	in silico	no absorption in the relevant UV range	
Photosensitization	non-sensitizing	in silico	no absorption in the relevant UV range	
Molecular weight	282.46			
log POW	7.5		calculated	TD0011
CIR-Data	Heptyl Undecylenate is used up to 26 % in cosmetic products, its use is assessed as safe by the CIR.			TD0011
Special Considerations	Heptyl Undecylenate is the ester of heptanol (C7) with undec-10-enoic acid (C11), which are formed under physiological conditions. The lowest values of the individual substances were therefore used to assess systemic toxicity.			

FATTORI DI INCERTEZZA (UF – UNCERTAINTY FACTORS)

I fattori di incertezza vengono applicati per tenere conto delle possibili differenze tra le condizioni sperimentali degli studi tossicologici e le condizioni reali di esposizione umana, quando non sono disponibili informazioni specifiche sulla sostanza.
Consentono quindi di effettuare un'**estrapolazione cautelativa** dai dati sperimentali agli scenari di esposizione quotidiana.



Non eliminano le differenze tra condizioni sperimentali e realtà quotidiana, ma **tengono conto dell'incertezza** associata all'estrapolazione.

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE - (REASONING)

3-4.8.1 THE USE OF UNCERTAINTY FACTORS (UFs) FOR EXTRAPOLATION FOR STUDY DURATION

This type of UF is used to take account of probable differences between the experimental setting from which the PoD is taken and the human real life situation (use scenario) in case substance-specific information is lacking.

The 90-day oral toxicity test in rodents was, historically speaking, the most commonly used repeated dose toxicity test for cosmetic ingredients. Based on the exposure and the short lifetime of cosmetic products (regularly changing ingredients and concentrations), the 90-day test provides a good indication of the target organs and the type of systemic toxicity.
In case only a 28-day study is available, the SCCS recommends applying a factor to take uncertainty into consideration to extrapolate from subacute (28 days) to subchronic (90 days) toxicity. Different values are being proposed and the choice is made on a case-by-case basis taking the strengths and weaknesses of the available studies into consideration. The SCCS commonly uses for such extrapolation a conservative **UF of 3.** Recently, Escher *et al.* (2020) provided data showing that in such a case a factor of 1.5 would be sufficient.

the use of additional UFs needs to be carefully considered. Indeed, many authors warn that a composite UF may lead to over conservatism (Simon *et al.*, 2016; Escher *et al.*, 2020). In particular, in the case of aggregate exposure, using a deterministic exposure assessment multiplication of single UFs may lead to possibly overly conservative estimates (EFSA, 2012a).

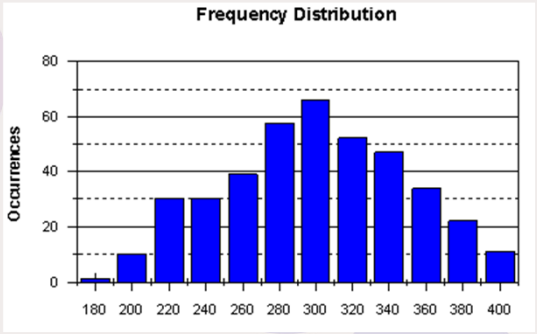
US EPA Uncertainty Factor (UF) for Risk Assessment	
UF1	Account for the variation in sensitivity among the members of the human population
UF2	Account for the uncertainty when extrapolating from animal data to humans
UF3	Account for the uncertainty when extrapolating from sub-chronic NOAELs to chronic NOAELs
UF4	Account for the uncertainty when using LOAEL instead of NOAEL/BMD as POD
MF	Account for additional uncertainty factors such as data quality, confidence in data set.

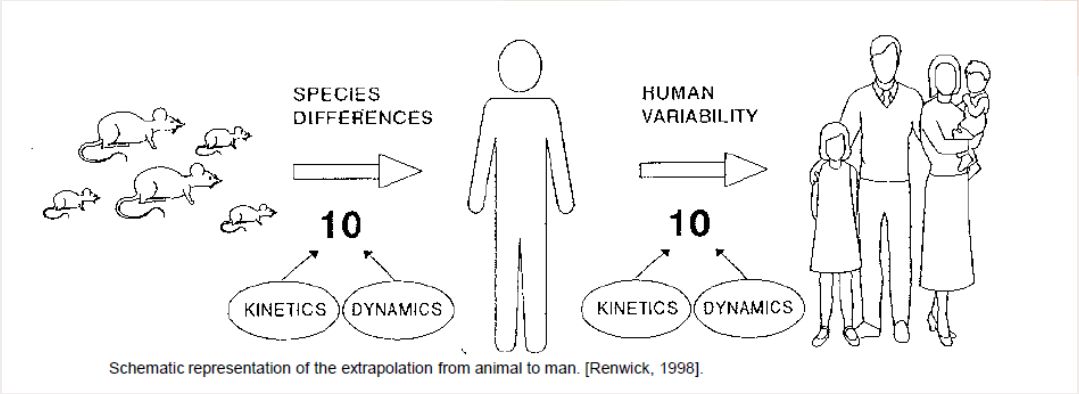
When the PoD is based on a LOAEL, often an additional assessment factor of 3 is added in the calculation of the MoS. However, a higher assessment factor of up to 10 may be decided on a case-by-case basis, taking into account the dose spacing in the performed repeated dose toxicity test, the shape and slope of the dose-response curve (and in some cases the extent and severity of the effect(s) seen when LOAEL values are used). In some cases, the study cannot be used for safety assessment.

DOSE GIORNALIERA AMMISSIBILE (ADI) E NOAEL

La caratterizzazione del rischio viene calcolata tramite:

$$ADI = \frac{\text{NOAEL/BMDL}}{\text{Fattore di sicurezza}}$$





Schematic representation of the extrapolation from animal to man. [Renwick, 1998].

Fattore	Significato
10 – Differenze interspecifiche	Tiene conto delle differenze tossicocinetiche e tossicodinamiche **tra animale e uomo**
10 – Variabilità intraspecifica	Tiene conto delle **differenze di sensibilità tra individui della popolazione umana**
100 – Fattore complessivo	Prodotto dei due fattori, in assenza di dati specifici che giustifichino valori diversi

TOSSICITÀ DA DOSI RIPETUTE (REASONING)

3-5.1.2 THE PODSYS VALUE

If the absorption by the oral route is 100%, then the external and internal doses of the oral route are the same. If the absorption by the oral route is less than 100%, which is often the case, the procedure may underestimate the risk of the exposure of the non-oral route.

It is considered that not more than 50% of an orally administered dose is systemically available. Thus, in the absence of data, **50% of the administered dose is used** as the default oral absorption value for a cosmetic ingredient and the PoDsys is derived from the PoD by dividing with a factor 2. If there is information to suggest **poor oral bioavailability, a default value of 10% oral absorption could be considered**. However, whenever oral absorption data are available, these should be used, also when using other dose descriptors. Also, any other available kinetic data should be considered.

For chemicals with a high first-pass metabolism in the gut or liver, the situation is even more complex and, in addition, the target organ for toxicity has to be taken into consideration and route-to-route extrapolation may not be adequate.

In the case of **oral to inhalation extrapolation, a default factor of 2**[9] is also proposed (default absorption oral route: 50%; inhalation 100%; ECHA, 2012a).

Il POD ottenuto da uno studio orale è espresso in termini di dose somministrata, non necessariamente di dose assorbita.

Esempio numerico

Supponiamo che uno studio orale nel ratto abbia individuato:

- NOAEL=100 mg/kg/die

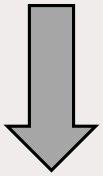
Se assumiamo un assorbimento orale del 50%:

- PoDsys =100 x 0.5 = 50 mg/kg/die

Se invece l'assorbimento orale documentato fosse del 20%:

- PoDsys =100 x 0,2 = 20 mg/kg/die

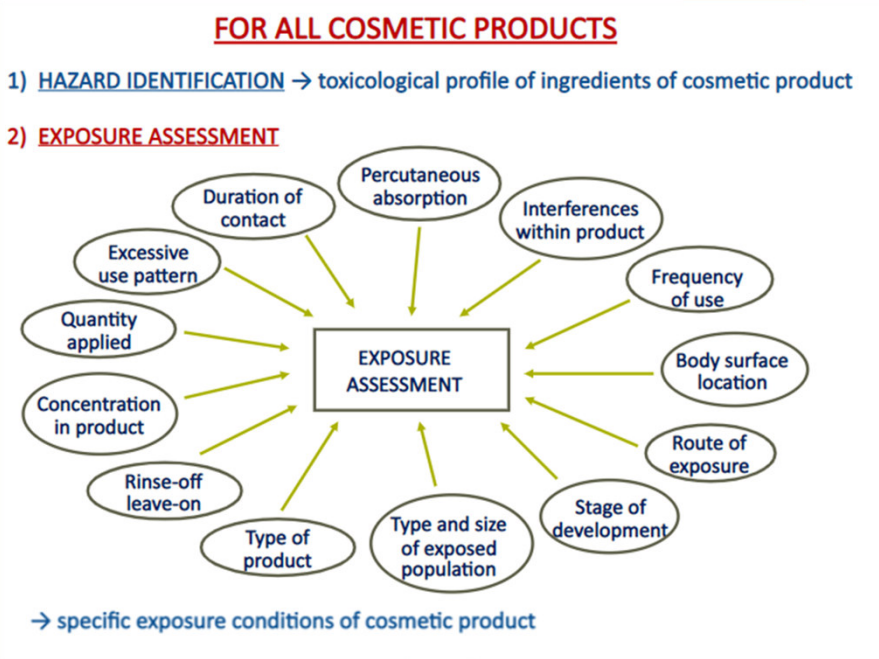
Questo mostra perché non possiamo sempre confrontare direttamente una dose somministrata per via orale con una dose sistemica assorbita attraverso la pelle.



SED

ESPOSIZIONE ALLE SOSTANZE: SED

Systemic Exposure Dosage (mg/kg bw/day)



La stima **dell'esposizione sistemica** a un ingrediente cosmetico è funzione della quantità applicata alla pelle, della concentrazione dell'ingrediente nel prodotto, della durata del contatto con la pelle e del **grado di assorbimento percutaneo**.

L'esposizione sistemica ad un ingrediente cosmetico può essere così stimata:

ESPOSIZIONE ESTERNA



$E_{dermal\ x} = C_x \times q_x \times f_{ret\ x}$ **(2)**

$E_{dermal\ x}$ (mg/day):	external exposure available for dermal uptake from product category $_x$
x:	product category
C_x (mg/g):	concentration/ fraction of a substance in a product category$_x$
q_x (g/day):	amount of product category that is applied/received per day
$f_{ret\ x}$:	retention factor specific to product category $_x$

In cases where the amount per day q_x is not given or if more detailed probabilistic assessments should be performed, the amount per day can be calculated from the frequency of application (**Table 4**) and the amount per application. In **Appendix 7** (**Table A.7**) a literature review can be found listing studies which provide detailed external exposure values to different cosmetic products. These are given for specific countries. Furthermore, the external daily exposure per product category can be used to derive a

Table 4: Mean exposed skin surface area per product category (Bremmer *et al.*, 2006a; Bremmer *et al.*, 2006b) and frequency of application per product category

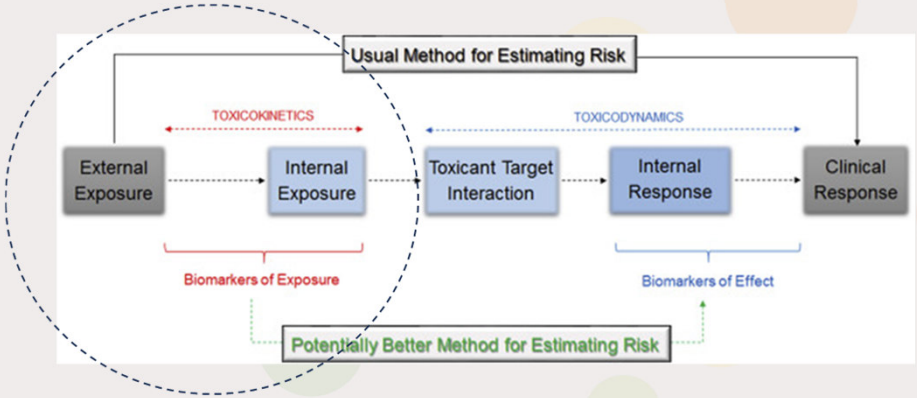
Product type	Surface area for application SSA (cm^2)	Body areas	Frequency of application
Bathing, showering			
Shower gel	17500	total body area	1.43/day
Hand wash soap	860	area hands	10/day[3]
Bath oil, salts, etc.	16340	area body- area hands	1/day
Hair care			
Shampoo	1440	area hands+ ½ area head	1/day
Hair conditioner	1440	area hands+ ½ area head	0.28/day
Hair styling products	1010	½ area hands+ ½ area head	1.14/day
Semi-permanent hair dyes (and lotions)	580	½ area head	1/week (20min.)
Oxidative/ permanent hair dyes	580	½ area head	1/month (30min.)
Skin care			
Body lotion	15670	area body-area head (female)	2.28/day
Face cream	565	½ area head (female)	2.14/day
(+applied on neck)	320[1]		
(+ applied on back of neck)	80[2]		
Hand cream	860	area hands	2/day
Make-up			
Liquid foundation	565	½ area head (female)	1/day
Make-up remover	565	½ area head (female)	1/day
Eye shadow	24		2/day
Mascara	1.6		2/day
Eyeliner	3.2		2/day
Lipstick, lip salve	4.8[3]		2/day
Deodorant/antiperspirant			
Deodorant spray[4] and non- spray[5]	200	both axillae	2/day
Fragrances			
Eau de toilette spray	200	total body area	1/day
Perfume spray	100	area hands	1/day
Men's cosmetics			
Shaving cream	305	¼ area hand (male)	1/day
Aftershave	305	¼ area hand (male)	1/day
Sun care cosmetics			
Sunscreen lotion/ cream	17500	total body area	2/day

1 If the *in vitro* dermal absorption assay was not performed under in-use conditions, an additional correction factor can be introduced.
2 Besides these European values, it should be noted that the US EPA also published default values for Skin Surface Areas (SSAs) of relevant parts of the human body (US EPA, 1997).
3 Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency: Survey of liquid hand soaps, including health and environmental assessments.
4 Daily exposure value not calculated due to the low frequency of exposure
5 Steiling *et al.*, 2014: 'ethanol-based' are product categories containing ethanol as the principal ingredient.

INCI	% nel PF (1)	Numero di applicazioni giornaliere (2)	g applicati quotidianamente (2)	Assorbimento % (3)	Esposizione giornaliera calcolata (g/die)
Aqua	98	1	5	100	4,9
Lauryl Glucoside	0,4	1	5	10	0,002
Cetearyl Isononanoate	0,4	1	5	100	0,02
Ceteareth-20	0,4	1	5	100	0,02
Cetearyl Alcohol	0,4	1	5	100	0,02
Glyceryl Stearate	0,4	1	5	100	0,02
Glycerin	0,4	1	5	100	0,02
Ceteareth-12	0,4	1	5	100	0,02
Cetyl Palmitate	0,4	1	5	100	0,02
PEG-7 glyceryl cocoate	0,4	1	5	100	0,02
Cocamidopropyl betain	0,24	1	5	100	0,012
Parfum	0,15	1	5	100	0,0075
Propylene glycol	0,08	1	5	10	0,0004
Camelia Sinensis	0,08	1	5	100	0,004

Esposizione alle sostanze: SED

Systemic Exposure Dosage (mg/kg bw/day)



$$SED = \frac{DA_a \times 10^{-3} \times SSA \times f}{bw}$$

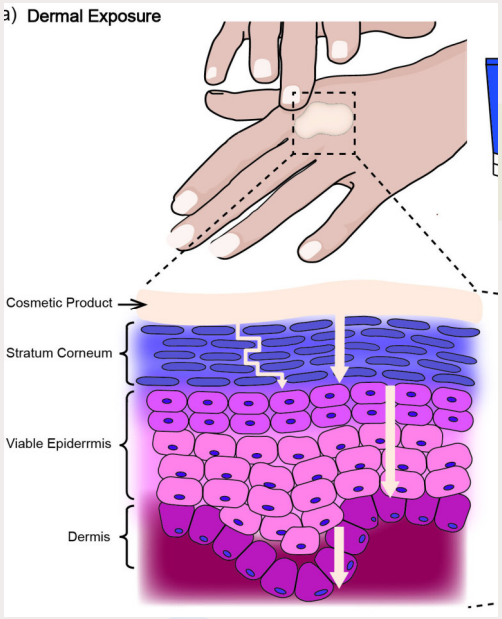
Where:

SED (mg/kg bw/d)	Systemic Exposure Dose
DAa (µg /cm^2)	Dermal Absorption as amount per surface, resulting from an assay under in-use mimicking conditions
SSA (cm^2)	Skin Surface Area expected to be treated with the finished cosmetic product (see **Table 3** in Section 3-3.4.2 for SSA values per product type)
f (day^{-1})	Frequency of application of the finished product (f ≥1)
bw (kg bw)	human body weight (default value: 60 kg)

ESPOSIZIONE ALLE SOSTANZE: SED

Systemic Exposure Dosage (mg/kg bw/day)

ESPOSIZIONE INTERNA



$$SED = E_{product} \times \frac{C}{100} \times \frac{DA_p}{100} \qquad (5)$$

Where:

SED (mg/kg bw/day)	Systemic Exposure Dose
$E_{product}$ (mg/kg bw/day)	Estimated daily exposure to a cosmetic product per kg body weight, based upon the amount applied and the frequency of application (for calculated relative daily exposure levels for different cosmetic product types, **Tables 3A** and **3B**, Section 3-3.4.2).
C (%)	Concentration of the substance under study in the finished cosmetic product on the application site
DA_p (%)	Dermal Absorption expressed as a percentage of the test dose assumed to be applied in real-life conditions

A.6. Exposure ot the cosmetic product

Parameter	Definition
Produt-type:	Face cream
Target group (age):	20 - 80 Years
Average weight of target group (kg):	60 kg
Application Area:	Face
Relative daily exposure, $E_{product\text{-}rel}$ (mg/kg bw/day)	24.140
Exposure route:	Dermal
Type of exposure:	Leave on
Retention factor R:	1.000
Appliaction Area A (cm^2):	565.000
Daily applied quantity (g/day) = G:	1.540
Frequence of application/day F:	2.140

The parameters listed in the table are taken from the Notes of Guidance (SCCS) in the current version (if available). The calculated daily relative application quantity ($E_{product\text{-}rel}$) is used as the basis for the exposure consideration of the individual components.

Esposizione alle sostanze: MoS

$$MoS = POD_{sys}/SED$$

$$MoS > 100$$

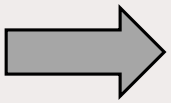
CETEARYL ALCOHOL		Fonte del dato
DESCRIZIONE	Si intende una miscela di Cetyl Alcohol e Stearyl Alcohol, alcoli grassi costituiti rispettivamente da 16 e 18 atomi di carbonio, completamente saturi e con catena lineare. Si presenta come un solido bianco in granuli o scaglie dalla consistenza cerosa, insolubile in acqua e solubile in alcol. Poiché questi alcoli grassi presentano una testa polare costituita dall'ossidrile e una lunga catena alifatica sono dotati di proprietà emulsionanti.	
IMPUREZZE	Il fornitore non specifica impurezze con rilevanza tossicologica	
SED mg/Kg bw/die	0,333333333	Vedi tabella III
Livello di sicurezza - MOS	La sicurezza di Cetearyl Alcohol è statao valutata dalla Cosmetic Ingredient Review (CIR). Il gruppo di esperti del CIR ha valutato i dati scientifici e ha concluso che questo alcol grasso (e altri alcoli alifatici a catena lunga della stessa famiglia) sono sicuri per l'uso come ingredienti cosmetici I dati tossicologici per i cinque a catena lunga alcoli alifatici inclusi nella relazione non hanno rilevato alcuna tossicità significativa. Ad esempio, alcool cetilico non è risultato mutageno. Formulazioni contenenti questi alcoli grassi non sono irritanti dermiche o sensibilizzanti. Così, il gruppo di esperti CIR ha ritenuto ragionevole supporre che gli alcoli grassi recensiti hanno attività biologica equivalente e risultano sicuri per uso cosmetico. Inoltre la Food and Drug Administration (FDA) comprende questi alcoli grassi sintetici, tra cui l'alcool cetilico, nell'elenco degli additivi alimentari autorizzati come additivi alimentari multiuso diretti ed indiretti (coadiuvanti della produzione).	JACT 7(3):359-413, 1988 IJT 27(Suppl. 1):77-142, 2008

CETEARETH – 12 - 20	Fonte del dato

INCI	% INCI	NOAEL [mg/kg bw/d]	Dermal absorption [%]	SED [mg/kg bw/d]	MOS
Aqua	60.574		100		*
Squalane	7	> 1000	100	1.6898	
Aloe Barbadensis Leaf Juice	5	> 100000	100	1.207	
Caprylic/Capric Triglyceride	4	> 1000	10	0.09656	
Ethylhexyl Stearate	4	> 800	10	0.09656	
Glycerin	3.764	> 2200	100	0.908654	
Betaine	3	> 2500	1	0.007242	
Cetearyl Alcohol	3	750	100	0.7242	
Heptyl Undecylenate	3	100	100	0.7242	
Cetearyl Glucoside	2	> 1000	100	0.4828	
Cetyl Alcohol	1.5	> 4257	100	0.3621	
Pentaerythrityl Distearate	1	483	10	0.02414	
Phenoxyethanol	0.9				
Tocopherol	0.21	167	51.2	0.025966	
Sodium Stearoyl Glutamate	0.2	1200	10	0.004828	
Xanthan Gum	0.2	> 1000	1	0.000483	
Citric Acid	0.17	> 241	100	0.041038	
Parfum	0.15				
Salix Alba Bark Extract	0.1	26,2	100	0.02414	
Ethylhexylglycerin	0.09991	50	55	0.013265	
Helianthus Annuus Seed Oil	0.09	5200	50	0.010863	
Hamamelis Virginiana Leaf Extract	0.0375	> 100	100	0.009053	

B.1. Conclusions of the evaluation

The cosmetic product Sample-Cream, Bulk-Art.: 45000 [Fw-Art.: FW-001 (100ml), FW-002 (50ml)] is harmless to health under consideration of the general toxicological profile of the ingredients, their chemical structure and the degree of exposure, observing the warnings and conditions of use under normal reasonably foreseeable use. This product is clearly identifiable as a cosmetic product. Misuse as food is not to be expected due to the packaging design, the appearance and the smell.



For raw materials for which no NOAEL is deposited in the literature and thus no MoS calculation is possible, toxicological harmlessness has been proven on the basis of other well-founded literature references. No indications could be found for any of the raw materials used that would suggest a health risk with large-scale topical application.

In **assenza di un NOAEL**, la sicurezza di un ingrediente cosmetico può essere valutata mediante un approccio basato sul **peso complessivo delle evidenze scientifiche** (Weight of Evidence), purché i dati disponibili siano adeguati a caratterizzare il rischio nelle condizioni d'uso previste (e le conclusioni **scientificamente giustificate**).

non poter calcolare il MoS non significa poter rinunciare alla valutazione del rischio sistemico.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562
www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients ☆,☆☆

R. Kroes [a], A.G. Renwick [b,*], V. Feron [c], C.L. Galli [d], M. Gibney [e], H. Greim [f], R.H. Guy [g], J.C. Lhuguenot [h], J.J.M. van de Sandt [i]

[a] Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, c/o Seminariehof 38, NL- 3768 EE Soest, The Netherlands
[b] School of Medicine, University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Bassett Crescent East, Southampton SO16 7PX, UK
[c] Business Unit Toxicology and Applied Pharmacology, TNO Quality of Life, P.O. Box 360, NL 3700 AJ Zeist, The Netherlands
[d] Laboratory of Toxicology, University of Milan, Via Balzaretti 9, Milan 20133, Italy
[e] UCD Institute of Food and Health, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland
[f] Technical University of Munich, Hohenbachernstrasse 15-17, D-85354 Freising-Weihenstephan, Germany
[g] University of Bath, Department of Pharmacy and Pharmacology, Claverton Down, Bath BA2 7AY, UK
[h] ENSBANA, Université de Bourgogne, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France
[i] TNO Quality of Life, Utrechtseweg 48, 3704 HE Zeist, The Netherlands

Table 3
Classification of chemicals (on the basis of their physicochemical properties) in terms of their potential to be absorbed across the skin

J_{max} (μg/cm²/h)	MW (Da)	log P	Category
$J_{max} = 0$	Non-reactive chemicals > 1000 Da	Any	Negligible
$J_{max} < 0.1$	> 300	< −1 or > 5	Low
$0.1 < J_{max} < 1.0$	~ 200–300	> 2.0, 2.5	Medium low
$1.0 < J_{max} < 10$	~ 150–250	~ 1.0–2.0	Medium high
$10 < J_{max} < 100$	~60–200	~ 0.5–3.5	High
$J_{max} > 100$	<150	−0.5–2.0	High

J_{max}, maximum flux; MW, molecular weight; log P, log of the octanol:water partition coefficient.

Table 4
Proposed default adjustment factors for the % dose absorbed of cosmetic ingredients across the skin

J_{max} (μg/cm²/h)	Default% dose absorbed per 24 h
Non-reactive chemicals with MW > 1000	Negligible
$J_{max} < 0.1$	10
$0.1 < J_{max} < 10$	40
$J_{max} > 10$	80

J_{max}, maximum flux.

REASONING

Assorbimento transcutaneo: in assenza di dati in vivo/in vitro disponibili si considera 100%. Se PM > 500 Da e Log Po/w < -1 oppure > 4 l'assorbimento può essere stimato 10%. –

ii. When there is sufficient evidence that the dermal absorption of a cosmetic ingredient is very low, systemic exposure may be negligible and the calculation of a MoS may not be justified or applicable (see Sections 3-6.11 and 3-5.2). See also for example UV filter HAA299 SCCS/1533/14.

iii. The SCCS will decide upon the relevance of MoS calculations on a case-by-case basis, taking into account the general toxicological profile of the substance under consideration, its toxicokinetic properties and its intended use.

Dermal absorption
dati sperimentali affidabili
↓
utilizzare il valore misurato
dati insufficienti/incerti
↓
applicare un approccio conservativo
assenza di informazioni adeguate
↓
worst-case assumption

USO SALTUARIO

Additional considerations:

i. Some cosmetic substances are not used on a daily basis, although their NOAEL values have been obtained in studies after daily administration of the substances. Combining these NOAEL values with daily exposures therefore results in a clear overestimation of the risk. The comparison of a NOAEL resulting from a daily exposure study with the SED of a certain cosmetic ingredient is therefore accepted as a conservative estimate, even if it is only applied *e.g.* once per week or once per month. However, the daily amount for product categories with low frequencies of application may not be adjusted by the frequency (*i.e.* not divided by 30, if applied once per month), as justified by: "*The actual daily dose is independent of the exposure frequency. This means that if, for a certain scenario, worker or consumer exposure is only for a number of days per year, the exposure value is the actual dose on the exposure days, and not the daily dose averaged out (and thus divided!) over the whole year*" (ECHA, 2012a). This reasoning, however, may be changed for example in the case of hair dyes (*e.g.* oxidative hair dyes only once applied per month) and a MoS slightly below 100. One could consider a substance as being safe due to the occasional use and the built-in conservatism of assessment but only after expert judgement.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562
www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients ☆,☆☆

R. Kroes [a], A.G. Renwick [b,*], V. Feron [c], C.L. Galli [d], M. Gibney [e], H. Greim [f], R.H. Guy [g], J.C. Lhuguenot [h], J.J.M. van de Sandt [i]

The concept that "safe levels of exposure" for humans can be identified for individual chemicals with known toxicological profiles is well accepted in risk assessment. The Threshold of Toxicological Concern (TTC) concept is a pragmatic approach to establish such an exposure level for chemicals for which toxicity data are not available, and is based on chemical structure and the toxicity data of structurally related chemicals.

The application of the TTC approach provides a method to assess the potential risk to human health related to exposure to a chemical using

- already available data (including chemical structure plus any in vitro, *in vivo* and/or *in silico* information),
- information on potential exposure, and
- the predicted *in vivo* toxicity based on (chronic) toxicity data of compounds that have similar chemical structures.

ELSEVIER

Toxicology Letters 127 (2002) 43–46

Toxicology Letters

www.elsevier.com/locate/toxlet

Review article

Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment

Robert Kroes [a,*], Gunhild Kozianowski [b]

[a] IRAS, Utrecht University, P.O. Box 80176, NL-3508 TD Utrecht, The Netherlands
[b] Südzucker, Postfach 1127, D-67261 Gründstadt, Germany

TTC
Threshold of Toxicological Concern
soglia di allarme tossicologico

classes of chemicals (Class I, II and III) identified using the Cramer et al. (1978) decision tree. This decision tree divides chemicals into the three classes based on structural properties suggestive of varying inherent risks of toxicity.

(i) Class I substances have simple structures, are efficiently metabolised and are of low potential toxicity.
(ii) Class II substances are less clearly innocuous than those of Class I, but do not have a positive indication of toxicity or of the lack of knowledge, which are characteristic of Class III substances.
(iii) Class III substances contain structural features that permit no strong initial presumptions of safety, or that may even suggest significant toxicity.

Table 1
Fifth percentile NOELs and human exposure thresholds for each structural class (Munro et al., 1996)

Structural class	No. of chemicals	Fifth percentile NOEL (μg/kg/day)	Human exposure threshold (μg/person/day)
I	137	2993	1800
II	28	906	540
III	447	17	90

Il TTC è un approccio di valutazione del rischio che permette di individuare **soglie generiche di esposizione umana** al di sotto delle quali la probabilità di effetti tossici è considerata molto bassa.

È particolarmente utile quando **non sono disponibili dati tossicologici sufficienti** per una valutazione quantitativa specifica della sostanza.

Si basa su:

- Struttura chimica della sostanza.
- Dati tossicologici di ampie raccolte di sostanze.
- Classificazione strutturale (classi di Cramer).
- Stima dell'esposizione umana.

Principio: se l'esposizione stimata è inferiore al TTC appropriato e la sostanza rientra nel dominio di applicabilità, il rischio sistemico può essere considerato di **bassa preoccupazione tossicologica.**

Arch Toxicol (2015) 89:941–948
DOI 10.1007/s00204-014-1287-6

REGULATORY TOXICOLOGY

Internal threshold of toxicological concern values: enabling route-to-route extrapolation

Falko Partosch · Hans Mielke · Ralf Stahlmann · Burkhard Kleuser · Susan Barlow · Ursula Gundert-Remy

Applicando un AF di 25 (eliminando il fattore TK) sono stati derivati i valori di TTC interna.

Cramer class I: internal TTC values are 6.9 µg/kg bw/d (90 % confidence interval: 3.8–11.5 mg/kg bw/d);

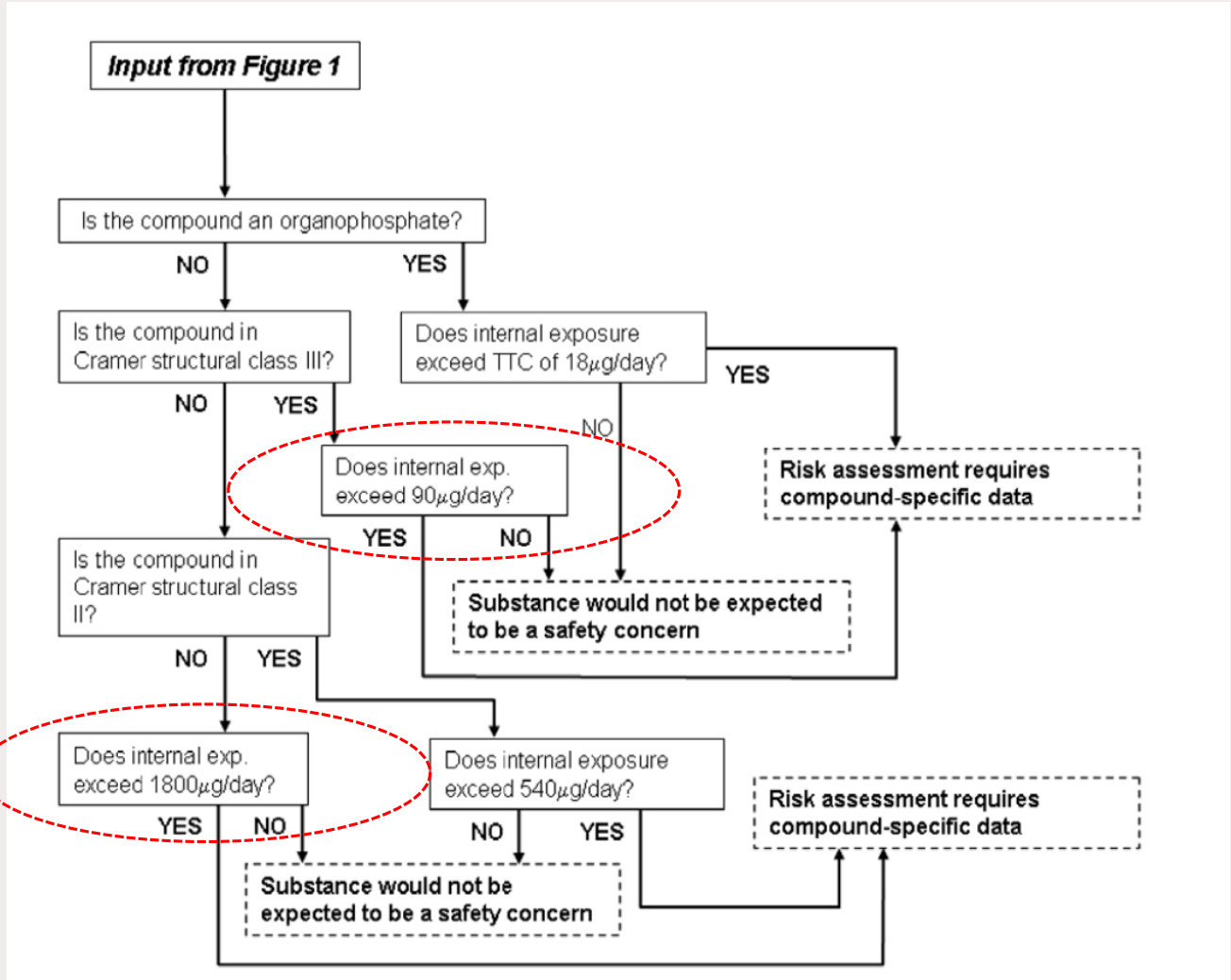
Cramer class II/III: 0.1 µg/kg bw/d (90 % confidence interval: 0.08–0.14 µg/kg bw/d).

3-5.2.3 iTTC APPROACH

For cosmetic ingredients, any risk assessment as well as the TTC approach should ideally be based on internal doses (Partosch *et al.*, 2014). Therefore, when the TTC approach is applied for cosmetic ingredients, an adjusted internal TTC value has to be defined considering both dermal and oral absorption. As such, several attempts have been made to arrive at an iTTC by adjusting the external NOAEL (in mg/kg bw/day) values of substances by *in silico* estimates of oral bioavailabilty (Partosch *et al.*, 2015, Reilly *et al.*, 2019). However, the estimates were still based on external dose and not an internal exposure metric such as plasma concentration.

Within the framework of a multi-stakeholder project, further work is currently ongoing towards the development of a set of robust iTTC values that could be utilised in human safety assessment (Rogiers *et al.*, 2020). It is, however, clear that developing an iTTC database is complex and more research is required beyond current attempts where NOAELs were only adjusted for by applying *in silico* tools (Ellison *et al.*, 2019; Ellison *et al.*, 2020). While work is ongoing to develop robust iTTC thresholds, an interim conservative iTTC of 1 µM plasma concentration for chemicals in consumer products has been proposed that is supported by the published experience of the pharmaceutical industry, a literature review of non-drug chemical/receptor interactions, and analysis of ToxCast™ data. This is, however, with the additional exclusion to the original TTC exclusion criteria of the estrogen and androgen receptors as targets of concern for low-dose exposures. An overview of where we are today and what is possible in the near future is given by Ellison *et al.* (2021).

- Il TTC non sostituisce automaticamente una valutazione tossicologica specifica se sono disponibili dati adeguati.
- Non è applicabile indistintamente a tutte le sostanze: esistono esclusioni e condizioni specifiche, tra cui considerazioni particolari per sostanze con potenziale genotossico e alcune categorie chimiche.
- Il confronto con la soglia deve utilizzare una stima dell'esposizione appropriata, considerando la via di esposizione e, quando pertinente, la biodisponibilità.



Partosh et al, Arch. Toxicol.;89:941-8, 2015

IN SILICO METHODS

The SCCS has published a Memorandum on the use of *in silico* methods for assessment of chemical hazard (SCCS/1578/16). The memorandum has identified a number of limitations and barriers in regard to the use of *in silico* models/systems in regulatory risk assessment of chemicals. These include the fact that regulatory risk assessors use data mainly from 'validated' methods for risk assessment, they also consider that virtually none of the currently available *in silico* models/systems carries an authoritative 'validation' tag. Other limitations of *in silico* methods include the inability of most of the free-access models/systems to make precise estimates of the toxicity of different stereo isomers of chemical substances, inorganic substances, and some other types of materials (*e.g.* nanomaterials). However, despite the limitations in regard to official validation of *in silico* methods, some of the currently available high-quality models and tools can provide additional supporting evidence that can be used as part of the WoE risk assessment of cosmetic ingredients. The outcome of *in silico* assessment can also provide useful insights to help identify a toxicological hazard that can further guide the planning of more focused further (*in vitro*) testing. Indeed, the more advanced QSAR models provide not only the predicted value, but also reasoning about the potential toxic mechanism and the identity of similar substances to be used for RAx.

3-4.1 New Approach Methodology (NAM) and Next-Generation Risk Assessment (NGRA)

3-4.1.1 DEFINITIONS

Whereas the terminology of "Alternative Test Methods (ATMs)" does not cover all available tools *e.g.*, *in silico* methodology, the more general term, NAM, has been introduced. As for cosmetics and their ingredients, testing and marketing bans apply with respect to animal use and there is an obligation to only use validated replacement alternatives, which is why.the need for validated non-animal alternative methods for chemical hazard assessment is much greater in Europe for compliance with the Cosmetics Regulation than for other regulatory frameworks. NAMs may include *in vitro, ex vivo, in chemico and in silico* methods, grouping, RAx, as well as combinations thereof. Therefore, before any testing is carried out for safety evaluation, all information on the substance under consideration should be gathered from different available means.

A set of criteria, universal across initiatives, to evaluate NAMs fit-for-purpose was developed by a multi-stakeholder group and may support greater consistency across different initiatives (Parish *et al.*, 2020).

NAM ≠ necessariamente metodo regolatoriamente validato!

La 13ª revisione sta lavorando sui criteri con cui NAM non formalmente validati possano essere considerati *scientifically valid*.

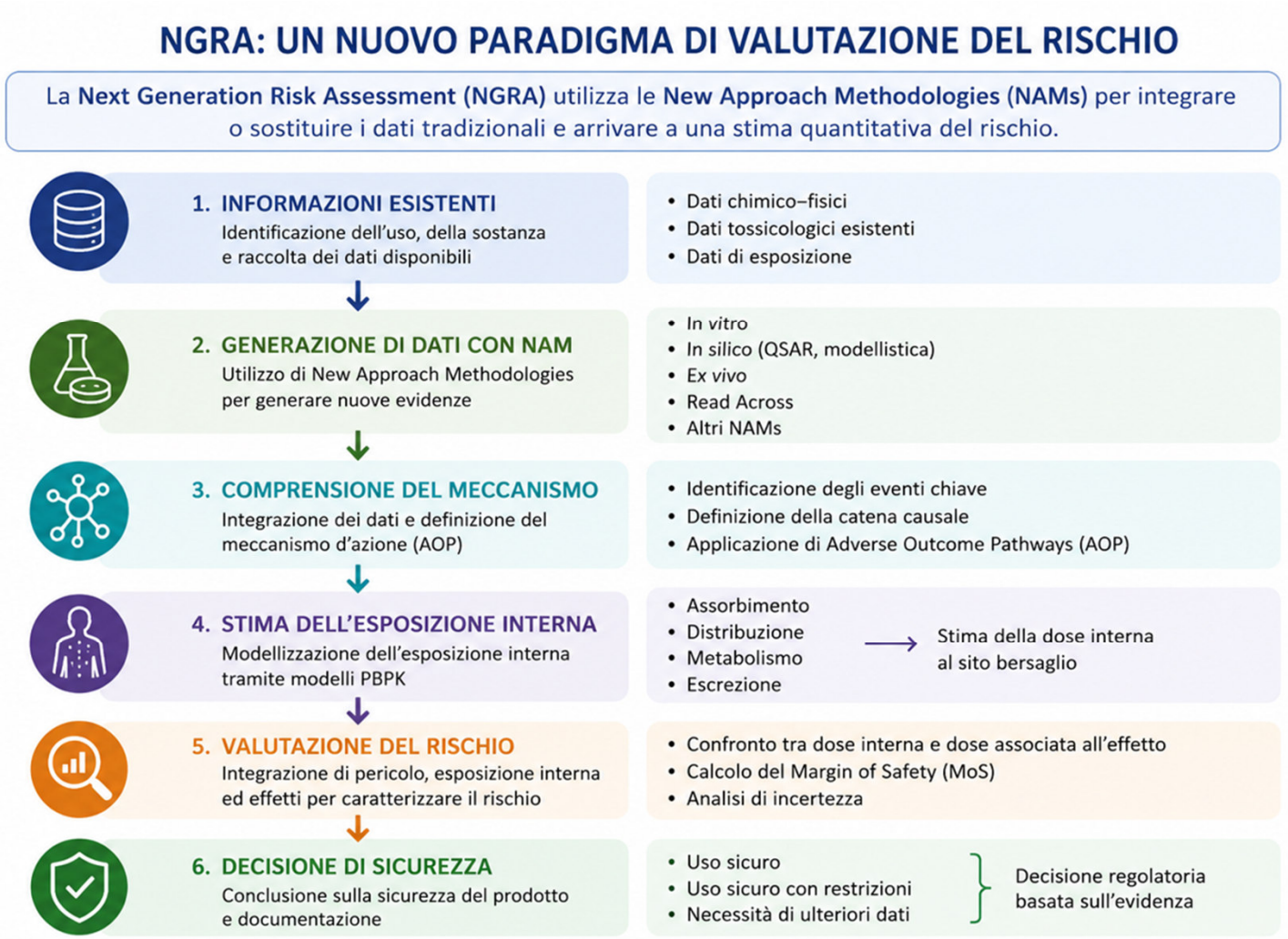
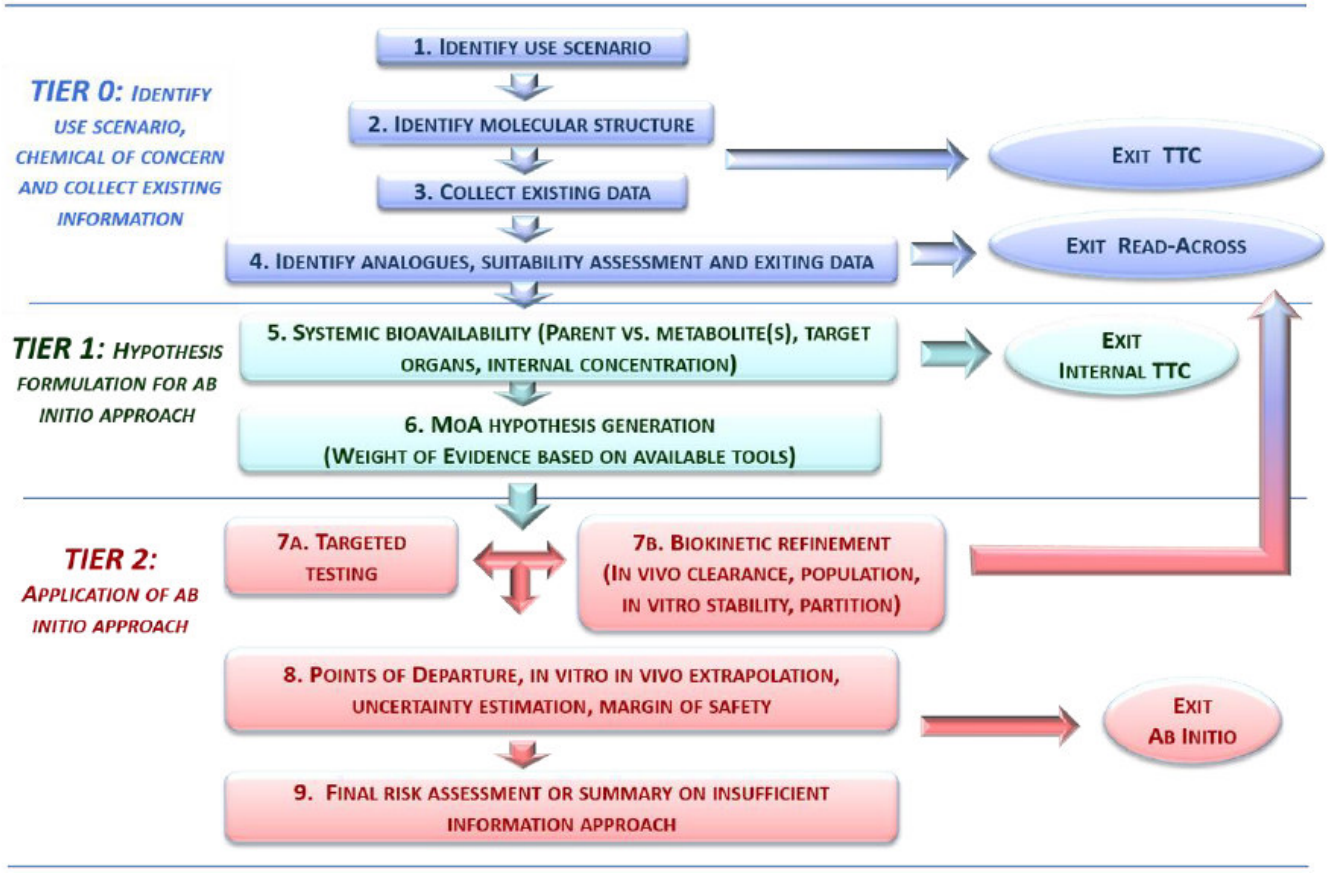


Figure 6. Framework of the New Generation Risk Assessment (NGRA) (adopted from Berggren *et al.*,2017 and Dent *et al.*, 2018). TTC: Threshold of Toxicological Concern; MoA: Mode of Action. Copyright from Elsevier, first published in Computational Toxicology, 4, 2017.



Tossicologia Sistemica: Rilevanza per la valutazione della sicurezza di un prodotto cosmetico

Argomenti trattati

- ✓ **Tossicologia e classificazione degli effetti tossici**
- ✓ Tossicocinetica - **Assorbimento cutaneo, percutaneo**, orale o per altre vie di somministrazione
- ✓ **Metabolismo** (Biotrasformazione): **cutaneo**, orale o per altre vie di somministrazione
- ✓ Valutazione della tossicità locale e **tossicità sistemica**
- ✓ **Tossicità sistemica**: NOAEL, LOAL, BMD, TTC (Point of Departure – POD), calcolo dell'esposizione alle sostanze (SED: Systemic Expoxure Dosage) in seguito a dosi singole/ripetute,
- ✓ **Safety Evaluation** (MOS = Margin of Safety) ed importanza del Reasoning
- ✓ **Principi di tossicologia genetica**: meccanismi ed interpretazione dei risultati



TOSSICOLOGIA GENETICA
GENOTOSSICITA'

Capacità di alcuni agenti chimici di danneggiare l'informazione genetica ed indurre alterazioni nelle componenti genetiche (danno al DNA):

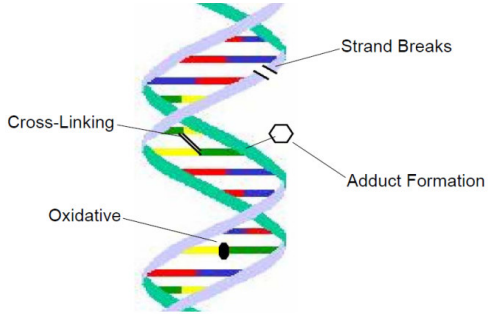
- ✓ **Sospensione** della sintesi del prodotto genico
- ✓ **Diminuzione/aumento** della sua attività
- ✓ **Perdita delle sue capacità funzionali**
- ✓ **Nessuna conseguenza**

Studia l'effetto di agenti chimici o fisici sul materiale genetico (DNA) e sui processi genetici di cellule viventi

GENOTOSSICITÀ E MUTAGENICITÀ

Genotossicità: capacità di un agente chimico o fisico di provocare danni al DNA o alterazioni dei cromosomi e dei processi che ne garantiscono l'integrità.

Mutagenicità: capacità di indurre alterazioni permanenti e trasmissibili alle cellule figlie nel materiale genetico.
La sostanza chimica produce un danno al DNA, legandolo chimicamente (formazione di addotti) o tramite altri meccanismi.
Metaboliti (epossidi) o by-products (radicali liberi) del metabolismo ossidativo possono generare addotti.



Concetto fondamentale:
Tutte le sostanze mutagene sono genotossiche, ma non tutti gli agenti genotossici provocano necessariamente mutazioni permanenti.

Il danno genetico può essere riparato, determinare morte cellulare oppure persistere e contribuire allo sviluppo di patologie, inclusi alcuni tumori.

TOSSICOLOGIA GENETICA

Non necessariamente associata a mutagenicità.

morte cellulare, neoplasia, difetti congeniti, malattie ereditarie

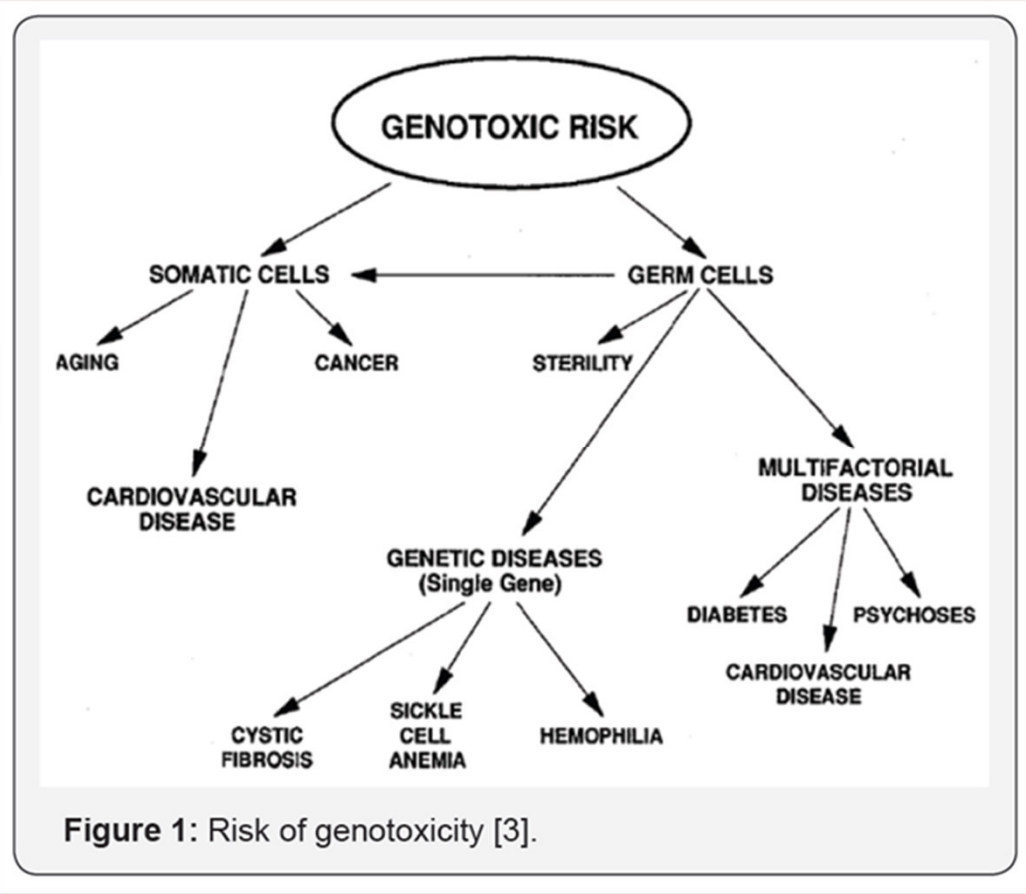


Figure 1: Risk of genotoxicity [3].

PRINCIPALI TIPI DI ALTERAZIONE GENETICA

Tipo di effetto	Alterazione	Esempio
Mutagenesi genica	Modifiche della sequenza del DNA	Sostituzioni, inserzioni o delezioni di nucleotidi
Clastogenesi	Alterazioni strutturali dei cromosomi	Frammentazioni, delezioni, riarrangiamenti
Aneugenesi	Alterazioni del numero dei cromosomi	Perdita o acquisizione di cromosomi

genotossicità e cancerogenicità non sono sinonimi: un agente genotossico può contribuire alla cancerogenesi, ma non tutti gli agenti genotossici sono necessariamente cancerogeni e non tutti i cancerogeni agiscono attraverso meccanismi genotossici.

MECCANISMI DELLA GENOTOSSICITÀ

Genotossicità primaria

- **Diretta:** interazione diretta della sostanza con il DNA.
- **Indiretta:** danno genetico attraverso intermedi reattivi, stress ossidativo o interferenza con i processi cellulari che mantengono l'integrità del genoma.

Genotossicità secondaria

- Danno genetico conseguente ad altri effetti tossici, ad esempio infiammazione persistente e stress ossidativo associato all'attivazione delle cellule immunitarie.

Rilevanza tossicologica

Per **alcuni meccanismi indiretti o secondari** può essere possibile **identificare una soglia di effetto**, purché supportata da evidenze meccanicistiche adeguate.

3-4.10.2 MECHANISMS

There are several mechanisms that lead to genotoxicity. In general, DNA damage can arise through either primary or secondary mechanisms (Schins *et al.*, 2007, Magdolenova *et al.*, 2014, Evans *et al.*, 2017). Primary genotoxicity can be either direct, where there is a direct interaction of genotoxic agent with DNA, or indirect, where the genotoxic effect is exerted via intermediate molecules (such as free radicals, as in oxidative stress). Secondary genotoxicity is driven by oxidative stress arising from inflammation caused by activation/recruitment of immune cells such as macrophages or neutrophils. Where the evidence suggests indirect mechanism (oxidative stress), or secondary mechanisms (e.g. inflammation and oxidative stress caused by overexpression of the immune cells) - a threshold may be derived from the toxicological data for use in safety assessment.

Based on recommendations of international groups of scientific experts (Dearfield *et al.*, 2011), and in accord with EFSA (EFSA, 2011a) and the UK Committee on Mutagenicity (COM, 2011), the evaluation of the potential for mutagenicity of a cosmetic substance should include information on 1) mutagenicity at the gene level, 2) chromosome breakage and/or rearrangements (clastogenicity), and 3) numerical chromosome aberrations (aneuploidy). For this task, genotoxicity tests, which measure irreversible mutation endpoints (gene or chromosome mutations) should be used. Genotoxicity Indicator tests, which measure DNA damage without taking into account the consequences of this primary damage, can contribute to the weight of evidence approach but should not be used as stand-alone tests. Finally, before undertaking any testing, a thorough review should be carried out of all available data on the substance under assessment.

CANCEROGENESI: DAL DANNO GENETICO AL TUMORE

La **cancerogenesi** è un processo multifasico attraverso il quale una cellula normale può trasformarsi progressivamente in una cellula tumorale.

1. INIZIAZIONE
- Comparsa di alterazioni genetiche permanenti.
- Può essere indotta da agenti cancerogeni genotossici.

2. PROMOZIONE
- Espansione delle cellule precedentemente iniziate.
- Favorita da stimoli proliferativi e alterazioni dei meccanismi di controllo cellulare.

3. PROGRESSIONE
- Accumulo di ulteriori alterazioni genetiche ed epigenetiche.
- Acquisizione di caratteristiche maligne, come invasività e potenziale metastatico.

Concetto fondamentale: non tutti gli agenti cancerogeni sono genotossici; alcuni favoriscono lo sviluppo tumorale attraverso meccanismi non genotossici.

VALUTAZIONE DELLA GENOTOSSICITÀ DEGLI INGREDIENTI COSMETICI

La valutazione deve considerare tre principali categorie di effetti:

- Mutazioni geniche
- Alterazioni strutturali dei cromosomi (clastogenicità)
- Alterazioni numeriche dei cromosomi (aneugenicità)

La valutazione integra le evidenze disponibili, inclusi test in vitro appropriati, informazioni sulla struttura chimica e dati meccanicistici.

I test che rilevano soltanto danni iniziali al DNA non dimostrano necessariamente la presenza di mutazioni permanenti.

Obiettivo: identificare e caratterizzare il potenziale genotossico dell'ingrediente attraverso un approccio basato sul peso complessivo delle evidenze (*Weight of Evidence*).

VALUTAZIONE IN VITRO DELLA GENOTOSSICITÀ

La batteria di base raccomandata dal SCCS comprende due test complementari:

Test di Ames – OECD TG 471
- Identifica mutazioni geniche nei batteri.

Test del micronucleo – OECD TG 487
- Identifica danni cromosomici strutturali (clastogenicità).
- Identifica alterazioni del numero dei cromosomi (aneugenicità).

I due test valutano differenti meccanismi di genotossicità.
Risultati positivi, dubbi o discordanti richiedono ulteriori approfondimenti nell'ambito di una valutazione integrata delle evidenze (*weight of evidence*).

In vitro tests	Endpoints	OECD
Bacterial reverse mutation test (Ames test)	Gene mutations	TG471
Mammalian cell gene mutation test / Mouse Lymphoma Assay (MLA)	Gene mutations	TG490
Mammalian chromosomal aberration test	Structural aberrations	TG473
Mammalian cell micronucleus test	Structural and numerical aberrations	TG487

In line with this, the SCCS recommends two tests for the base level testing of cosmetic substances, represented by the following test systems:

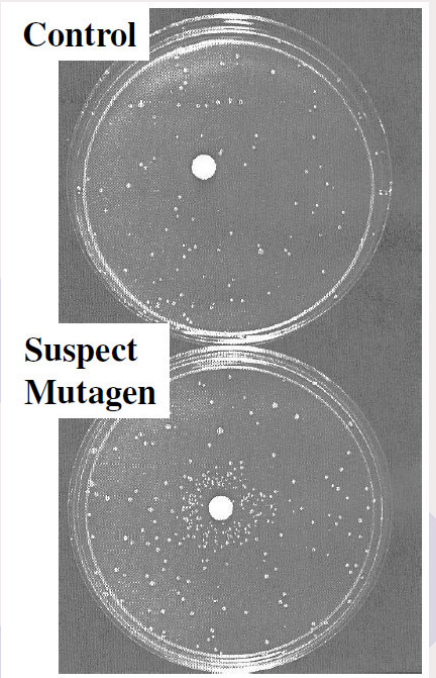
- Bacterial Reverse Mutation Test (OECD 471) as a test covering gene mutations
- *In vitro* Micronucleus Test (OECD 487) as a test for both structural (clastogenicity) and numerical (aneugenicity) chromosome aberrations.

Principio: identificazione di sostanze capaci di indurre mutazioni geniche.

- Si utilizzano ceppi batterici (es. *Salmonella typhimurium*) con mutazioni che impediscono la sintesi di uno specifico amminoacido (es. istidina).
- Una mutazione che ripristina la funzione consente la crescita su terreno selettivo.
- Un aumento delle colonie revertenti rispetto al controllo indica un possibile effetto mutageno.

Il test viene eseguito:

- Senza attivazione metabolica → mutageni ad azione diretta.
- Con frazione S9 → anche mutageni che richiedono attivazione metabolica.



Cells should be exposed to the test substance both in the presence and absence of an appropriate metabolic activation system. The most commonly used system is a cofactor supplemented S9-fraction prepared from the livers of rodents (usually rat) treated with enzyme-inducing agents such as Aroclor 1254 or a combination of phenobarbital and β-naphthoflavone. The choice and concentration of a metabolic activation system may depend on the class of chemical being tested. In some cases, it may be appropriate to utilise more than one activation system. For azo dyes and diazo compounds in the gene mutation test in bacteria, the use of a reductive metabolic activation system is recommended (SCCS/1532/14).

Mutat Res Gen Tox En 838 (2019) 22–27

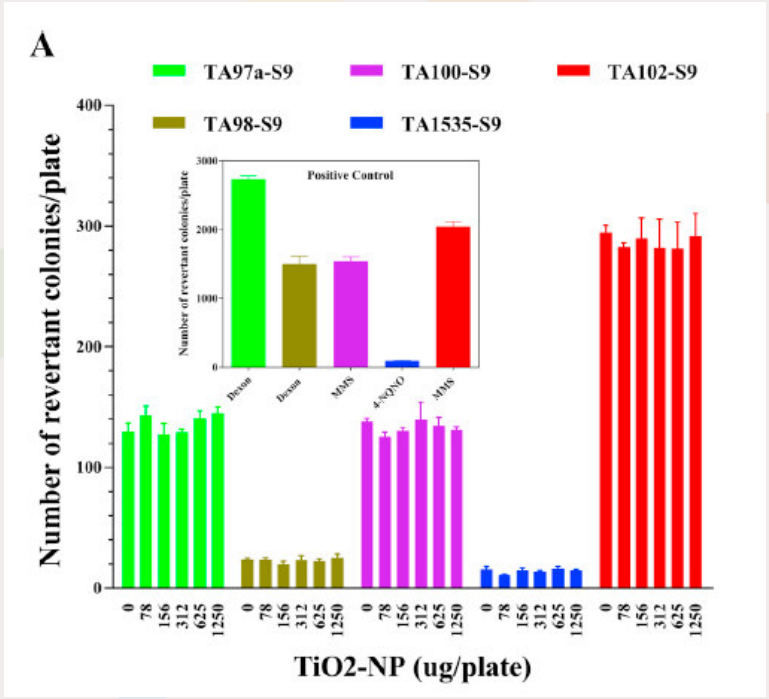
Contents lists available at ScienceDirect

Mutat Res Gen Tox En

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox

Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test

Xiuming Du[a,1], Shunxiang Gao[b,c,d,1], Liling Hong[a,1], Xin Zheng[e,*], Qingyun Zhou[a,*], Jihong Wu[b,c,d,**]



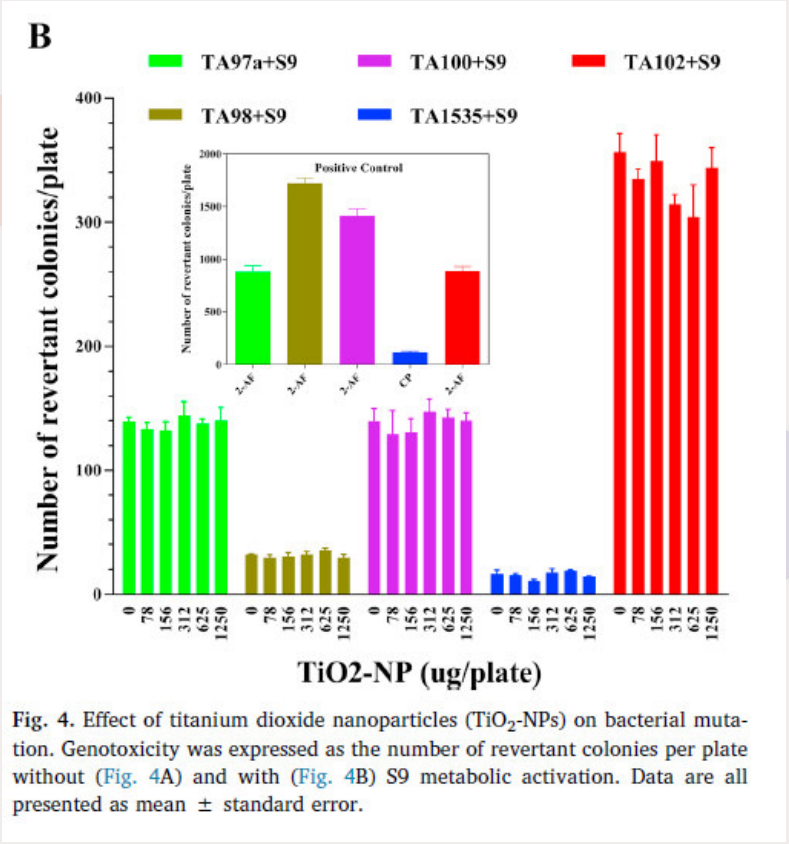


Fig. 4. Effect of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) on bacterial mutation. Genotoxicity was expressed as the number of revertant colonies per plate without (Fig. 4A) and with (Fig. 4B) S9 metabolic activation. Data are all presented as mean ± standard error.

TEST DEL MICRONUCLEO IN VITRO (OECD TG 487)

Principio: individuazione di alterazioni cromosomiche nelle cellule di mammifero.

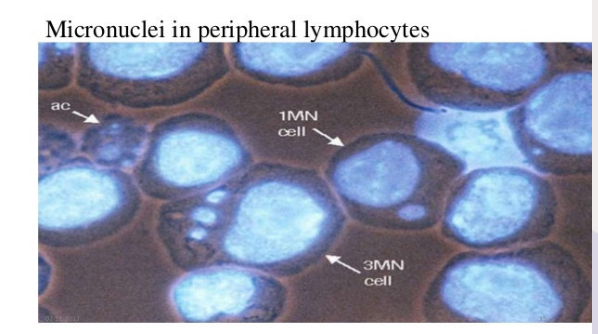
Durante la divisione cellulare, frammenti cromosomici o interi cromosomi possono non essere incorporati nei nuclei delle cellule figlie.

Si formano così piccoli nuclei accessori, chiamati **micronuclei**, visibili al microscopio.

Il test permette di identificare:

- **Clastogenicità** → rotture e alterazioni strutturali dei cromosomi.
- **Aneugenicità** → perdita o errata segregazione di interi cromosomi.

Un aumento della frequenza dei micronuclei indica un possibile effetto genotossico.



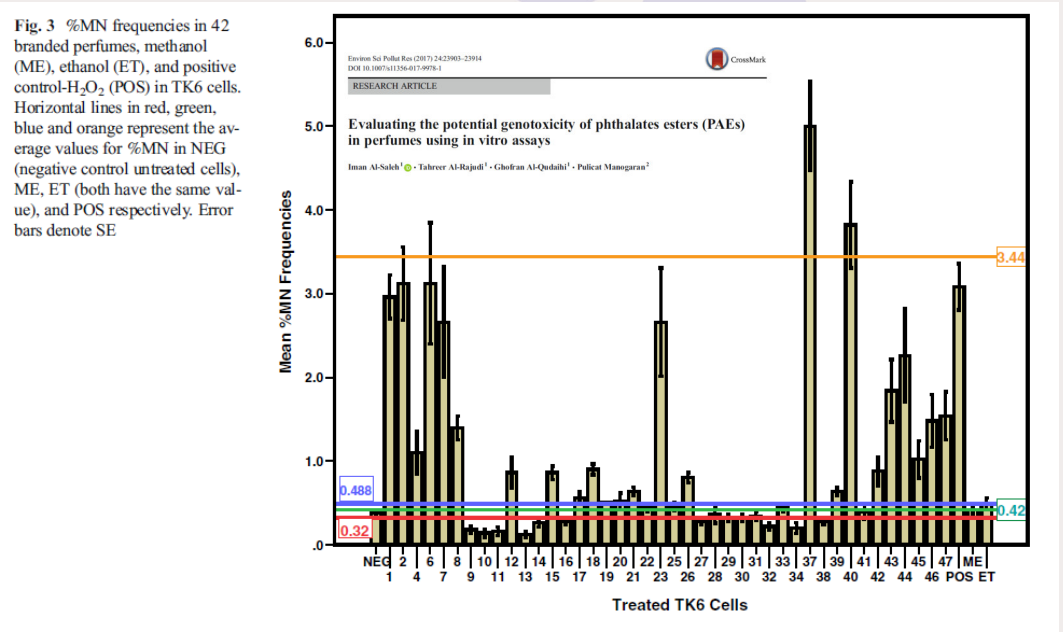


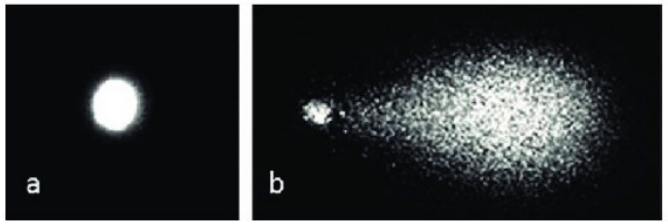
Fig. 3 %MN frequencies in 42 branded perfumes, methanol (ME), ethanol (ET), and positive control-H_2O_2 (POS) in TK6 cells. Horizontal lines in red, green, blue and orange represent the average values for %MN in NEG (negative control untreated cells), ME, ET (both have the same value), and POS respectively. Error bars denote SE

EFSA concluded that target tissue exposure in *in vivo* studies should be demonstrated, particularly in the bone marrow (*e.g.*, Mammalian Erythrocyte Micronucleus assay). Toxicity to the bone marrow in itself provides sufficient evidence to allow concluding on the validity of a negative outcome of a study. All other direct or indirect evidences of target tissue exposure should be assessed within a weight-of-evidence approach.

Animal studies on mutagenicity or genotoxicity are acceptable when data are already available from tests that have been carried out before the animal testing ban or when generated for compliance with other legislative (non-cosmetic) frameworks (see Section 1).

3d skin comet test - genotoxicity





Figure

Caption

Figure 8: 3D Skin Comet Assay: Detection of fragmented DNA in keratinocytes after incubation of the Phenion ® Full-Thickness Skin Model with a genotoxic chemical. DNA was stained with CYBR Gold. a) nucleus from a keratinocyte of an untreated control tissue, no DNA fragmentation visible; b) highly fragmented DNA after exposure to ... Read more

From a 3-test battery to a 2-test battery

Evaluation of several databases has demonstrated that an increase in the number of *in vitro* tests performed results in an increase of the number of 'unexpected positives' while the number of 'unexpected negatives' decreases (Kirkland *et al.*, 2005). The sensitivities of the 2- and 3-test batteries seem quite comparable (Kirkland *et al.*, 2011). Moreover, the combination of the bacterial reverse mutation test and the *in vitro* micronucleus test allowed the detection of all relevant genotoxic carcinogens and *in vivo* genotoxicants for which data existed in the databases used (Kirkland *et al.*, 2011). Consequently, EFSA and COM (2011) recommended the use of these 2 tests as a first step in genotoxicity testing. According to the

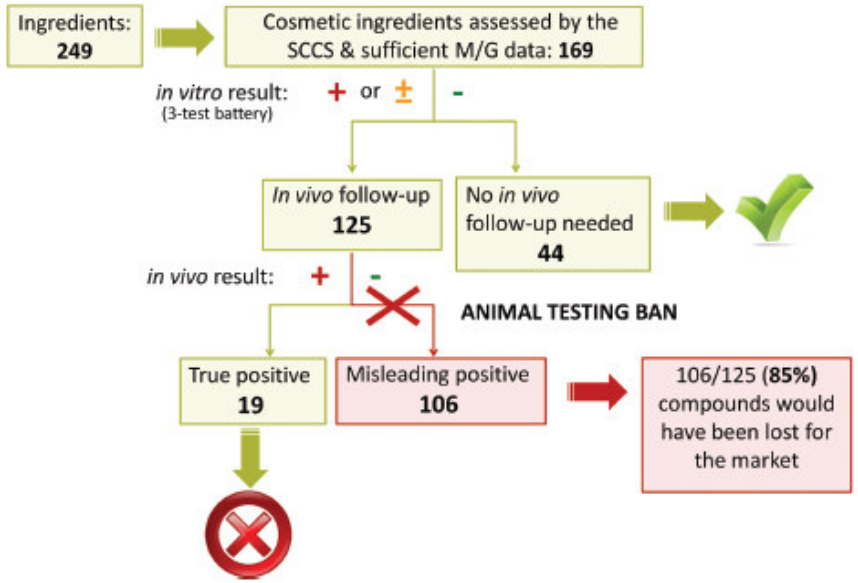


Fig. 1. General overview of the data available in the CosDB and categorisation of ingredients with sufficient M/G data. +, positive result; ±, equivocal result; –, negative result.

LIMITI DEI TEST DI GENOTOSSICITÀ IN VITRO

I test *in vitro* sono ampiamente utilizzati nella valutazione della genotossicità, ma non riproducono completamente la complessità dell'organismo umano.

Principali limitazioni:

- **Metabolismo:** le cellule utilizzate possono non riprodurre adeguatamente l'attivazione o la detossificazione delle sostanze nell'uomo.
- **Tossicocinetica:** non vengono riprodotti completamente assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione.
- **Specificità:** alcuni risultati positivi possono non essere rilevanti nelle condizioni reali di esposizione.
- **Modelli cellulari:** le cellule utilizzate possono non rappresentare adeguatamente i tessuti bersaglio.
- **Esposizione ripetuta:** gli effetti a lungo termine possono essere difficili da simulare.

Conclusione: nessun singolo test *in vitro* è sufficiente, in ogni situazione, a caratterizzare completamente il potenziale genotossico di una sostanza. È necessario integrare più test e altre evidenze scientifiche.

GENOTOSSICITÀ: DAI TEST ALLA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA

Batteria iniziale: test di Ames + test del micronucleo in vitro.

Risultati negativi: contribuiscono a escludere un potenziale genotossico, considerando adeguatezza e limiti dei test.
Risultati positivi o dubbi: richiedono ulteriori approfondimenti.

Metodi complementari:

- Modelli tridimensionali di epidermide umana.
- Comet assay per valutare il danno al DNA.
- Altri metodi *in vitro* e *in silico*, secondo il caso.

Obiettivo: integrare tutte le evidenze disponibili per valutare la sicurezza dell'ingrediente cosmetico senza ricorrere a nuovi test animali vietati dalla normativa cosmetica europea.

(v) Outcome of *in vitro* tests

If the results from both tests (Bacterial Reverse Mutation Test (OECD TG 471) and the *In vitro* Micronucleus Test (OECD TG 487) are clearly negative in adequately performed tests, it is very likely that the substance has no mutagenic potential. Likewise, if the results from one or both tests are clearly positive, it is very likely that the substance has genotoxic/mutagenic potential. In both cases further testing is not necessary.
A general scheme of mutagenicity testing for cosmetic ingredients is presented in **Figure 9.**

Different and potentially contradicting results may be available from the same test when performed with non-standardised protocols and carried out by different laboratories. In such cases, expert judgement should be used to evaluate and interpret the data. Further tests may be necessary to reach an overall conclusion.

CANCEROGENI GENOTOSSICI E NON GENOTOSSICI

Un **agente cancerogeno** è un agente capace di provocare tumori o aumentarne l'incidenza.
La cancerogenicità non implica necessariamente genotossicità e la genotossicità non implica necessariamente cancerogenicità.

Cancerogeni genotossici	**Cancerogeni non genotossici (epigenetico)**
Agiscono attraverso meccanismi che coinvolgono danni al materiale genetico e mutazioni	Favoriscono la cancerogenesi senza un meccanismo genotossico diretto
Possono indurre alterazioni genetiche permanenti	Possono agire attraverso proliferazione cellulare, alterazioni ormonali, infiammazione cronica o meccanismi epigenetici
Per i cancerogeni direttamente mutageni si adotta generalmente un approccio cautelativo **senza soglia**	Per molti meccanismi è possibile identificare una **soglia di effetto**

CANCEROGENESI: DAL DANNO GENETICO AL TUMORE

La **cancerogenesi** è un processo multifasico attraverso il quale una cellula normale può trasformarsi progressivamente in una cellula tumorale.

1. INIZIAZIONE
- Comparsa di alterazioni genetiche permanenti.
- Può essere indotta da agenti cancerogeni genotossici.

2. PROMOZIONE
- Espansione delle cellule precedentemente iniziate.
- Favorita da stimoli proliferativi e alterazioni dei meccanismi di controllo cellulare.

3. PROGRESSIONE
- Accumulo di ulteriori alterazioni genetiche ed epigenetiche.
- Acquisizione di caratteristiche maligne, come invasività e potenziale metastatico.

Mutagenesi e cancerogenesi

Differenza Chiave: Epigenetico vs. Genotossico

Caratteristica	Cancerogeno Genotossico (Iniziante)	Cancerogeno Epigenetico (Promotore)
Meccanismo d'Azione	**Danno diretto al DNA** (es. mutazioni, rotture, addotti).	**Modifica dell'espressione genica** (non muta il DNA).
Requisito di Dose	Spesso agisce anche a **basse dosi** (non ha una soglia di sicurezza chiara).	Richiede tipicamente **alte dosi** e **esposizione prolungata** per essere efficace.
Reversibilità	Il danno al DNA (mutazione) è **irreversibile**.	Gli effetti epigenetici sono teoricamente **reversibili**.
Ruolo nella Cancerogenesi	Agisce come **iniziatore** del cancro.	Agisce come **promotore** o **cocancerogeno**.

CANCEROGENI GENOTOSSICI: DOSE E RISCHIO

- I cancerogeni direttamente mutageni possono indurre alterazioni permanenti del DNA.
- Per questi meccanismi si adotta generalmente un **modello senza soglia**.
- All'aumentare dell'esposizione aumenta, in generale, la **probabilità di sviluppare un tumore**.
- La cancerogenesi può manifestarsi dopo un lungo periodo di latenza.
- La valutazione quantitativa del rischio può utilizzare approcci quali **Margin of Exposure (MoE)** e stime del rischio cancerogeno.

Assenza di una soglia identificabile non significa che tutte le dosi comportino lo stesso rischio.

At present validated alternative *in vitro* methods as OECD test guidelines to determine the carcinogenic potential of substances are not available. However, there are new *in vitro* approaches which may be helpful in an overall WoE approach to indicate potential genotoxic as well as non-genotoxic carcinogenic (NGC) substances.

TOSSICITA' A LUNGO TERMINE
E/O CANCEROGENESI

Topo: 18 mesi

Ratto: 24 mesi

For genotoxic substances, *in vitro* mutagenicity tests are well developed. Due to the relation between mutations and cancer, these genotoxicity tests can also be seen as a pre-screening for carcinogenicity. A positive result in one of the *in vitro* mutagenicity/ genotoxicity testing battery may be indicative for considering a substance as a putative carcinogen. This indication may be further supported by a positive result in Cell Transformation Assays (CTAs, Guidance documents No 214 and No 231).

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE CANCEROGENO

La valutazione si basa sull'integrazione delle evidenze disponibili (**Weight of Evidence, WoE**).

Principali strumenti:

- Test di genotossicità *in vitro* (Ames, micronucleo).
- Modelli *in silico* e identificazione di *structural alerts*.
- Test di trasformazione cellulare (*Cell Transformation Assays*, CTA).
- Informazioni sul meccanismo d'azione e dati tossicologici disponibili.

Limite importante: nessun singolo test *in vitro* permette di escludere o confermare in modo definitivo il potenziale cancerogeno di una sostanza.
La valutazione deve considerare anche metabolismo, esposizione e rilevanza biologica dei risultati.

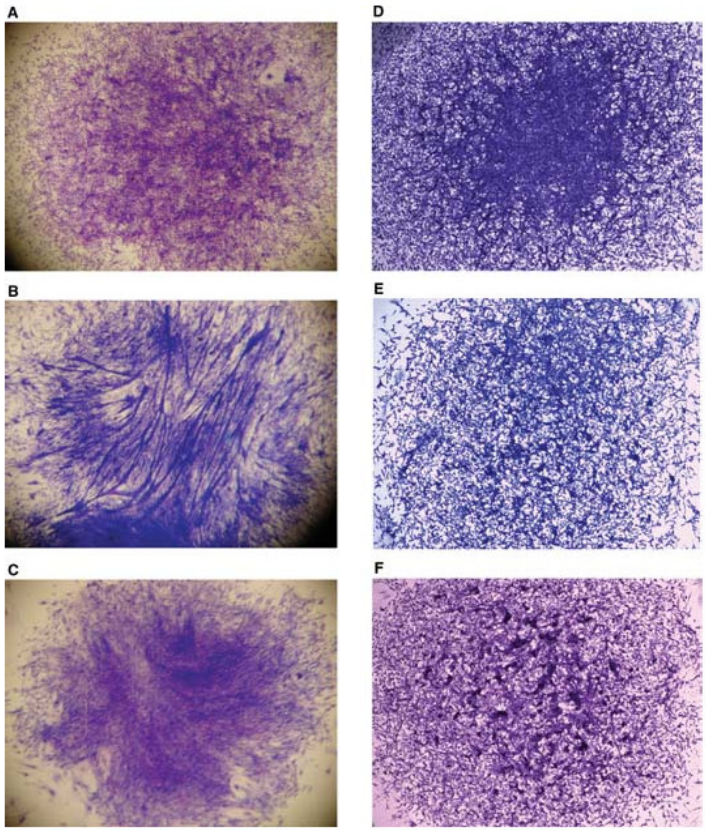
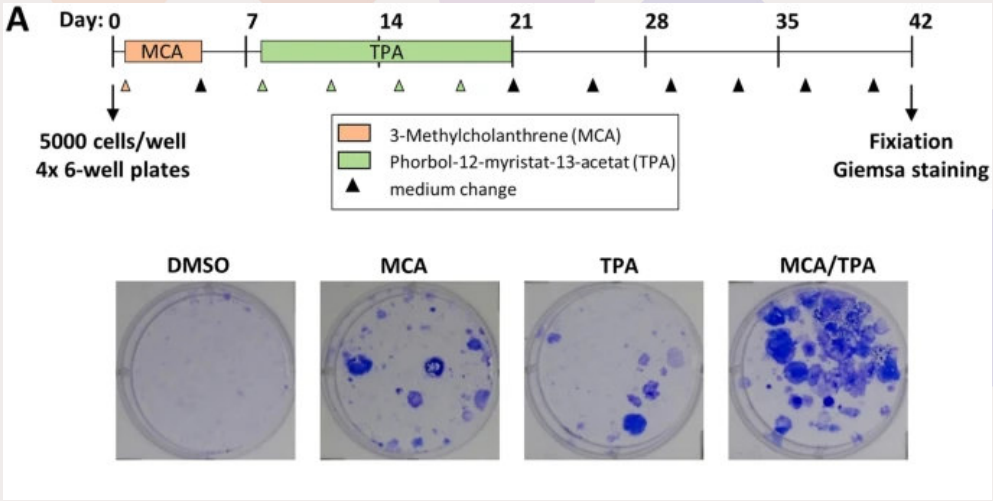


Figure 1. Examples of normal and transformed SHE cells. Plates A, B, C show normal colonies of cells organized in monolayers with no criss-crossing. Plates D, E, F show morphologically transformed colonies comprising stacked cells that are randomly oriented, three-dimensional and criss-crossed throughout; basophilic staining is usually darker. Magnification ×125 [60]

Cell transformation assay



Standard two-stage BALB-CTA.

(**A**) In the standard protocol of the BALB/c-3T3-cell transformation assay cells are treated with MCA as tumor initiator (day 1–4) and TPA as tumor promotor (day 8–21). After 42 days cells were fixed with methanol and malignant foci are stained with Giemsa (blue colored). (**B**) Other chemicals than

Non-genotoxic carcinogens

In case of non-genotoxic carcinogens, where a threshold mode of action for induction of tumours has been identified, the safety assessment is performed as for other toxicological endpoints with a threshold dose descriptor and by calculation of a MoS.

Genotoxic carcinogens

Both the Scientific Committees ((SCs) SCHER/SCCP/SCENIHR, 2009) and the REACH guidance documents (ECHA, 2012a and 2015) provide guidance on the safety assessment of genotoxic and carcinogenic substances. Whenever sufficient information is available, an appropriate dose descriptor, T25 or BMDL10, should be identified. The T25 (expressed as mg/kg bw/d) is defined as the dose which will give tumours at a specific tissue site in 25% of the animals after correction for spontaneous incidence and within the standard life time of the species (Dybing *et al.*, 1997). The determination of BMDL10 (expressed as mg/kg bw/d) uses mathematical curve fitting techniques to calculate the lower 95% confidence level at a 10% benchmark response (EFSA, 2005, 2009). Both T25 and BMDL10 can be used as starting points to determine an additional Lifetime Cancer Risk (LCR) or to calculate a Margin of Exposure (MoE), which represents the ratio between a dose descriptor and the estimated human exposure dose.

Per la valutazione del rischio cancerogeno si possono utilizzare $BMDL_{10}$ o T25, ma oggi, quando i dati lo consentono, è generalmente preferibile la $BMDL_{10}$.

Parametro	Significato	Utilizzo
$BMDL_{10}$	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza della dose associata a un incremento del 10% della risposta tumorale (benchmark response)	Preferibile quando sono disponibili dati dose-risposta adeguati alla modellizzazione
T25	Dose associata a un'incidenza tumorale aggiuntiva del 25%, corretta per l'incidenza spontanea	Alternativa quando non è possibile ottenere una BMDL affidabile

CANCEROGENICITÀ: VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Cancerogeni non genotossici con meccanismo a soglia
Quando il meccanismo e i dati lo consentono, si può identificare un punto di partenza tossicologico e calcolare il **Margin of Safety (MoS)**.

Cancerogeni genotossici direttamente mutageni
Quando non è possibile stabilire una soglia di sicurezza, può essere utilizzato il **Margin of Exposure (MoE)**:

MoE = $BMDL_{10}$ / Esposizione umana stimata

- $BMDL_{10}$: limite inferiore di confidenza della dose associata a una risposta aggiuntiva del 10%.
- Un MoE più elevato indica una maggiore distanza tra esposizione e punto di partenza tossicologico.

Il MoE è uno strumento di caratterizzazione e prioritizzazione del rischio, non una dimostrazione automatica di sicurezza.

Per i cancerogeni genotossici, il valore di riferimento più frequentemente utilizzato è:
MoE ≥ 10.000, quando il calcolo si basa su una $BMDL_{10}$ derivata da studi di cancerogenicità negli animali.

Questo valore, adottato nell'approccio EFSA, indica generalmente una situazione di bassa preoccupazione per la salute pubblica (*low concern*), ma non equivale a una soglia di sicurezza né a un rischio nullo.

Ad esempio, se $BMDL_{10}$ = 10 mg/kg/die ed esposizione = 0,0005 mg/kg/die:

$$MoE = \frac{10}{0,0005} = \boxed{20.000}$$

MoE	Interpretazione generale
≥ 10.000	Generalmente bassa preoccupazione, nel contesto indicato
< 10.000	Maggiore preoccupazione; richiede approfondimento e valutazione del contesto

APPENDIX 12: LIFETIME CANCER RISK (LCR) APPROACH

The "T25 method" (Sanner *et al.*, 2001) is used as a simple method for quantitative risk assessment of carcinogens in the REACH Regulation. It should be noted that in six cases where high quality epidemiology and animal carcinogenicity studies were available, quantitative risk characterisation based on epidemiological data and data based on animal studies using the T25 method differed by factors of less than three (Sanner and Dybing, 2005).

Determination of the LCR is carried out in different steps. After having decided what animal data set to use and type of tumour to consider, the dose descriptor T25 is determined, which is described in detail (ECHA, 2012a; Dybing *et al.*, 1997).

The animal dose descriptor (T25) is converted to the human dose descriptor (HT25), based on comparative metabolic rates (Sanner *et al.*, 2001):

$$HT25 = \frac{T25}{(\text{body weight}_{human}/\text{body weight}_{animal})^{0.25}}$$

Based on the daily lifetime SED, the LCR is calculated by linear extrapolation by use of the following formula:

$$LCR = \frac{SED}{HT25/0.25}$$

Subsequently, a statement is generated describing whether the actual risk may be higher or lower than the risk calculated for a specific scenario. The procedure and the following elements are reported and discussed in detail (Sanner *et al.*, 2001; ECHA, 2012a).

CALCOLO DEL: LIFETIME CANCER RISK

Nella caratterizzazione quantitativa del rischio cancerogeno possono essere utilizzati il MoE e il **Lifetime Cancer Risk**. Valori di LCR inferiori a 10^{-5} o 10^{-6} sono stati proposti come riferimenti di tollerabilità in differenti contesti regolatori. Il SCCS sottolinea tuttavia che stabilire quale livello di rischio sia accettabile è una decisione di gestione del rischio e non una conclusione esclusivamente tossicologica.

Appendix 12. Some countries and international organisations have considered that the LCR in the general population of less than 10^{-5} is considered tolerable (SCCS/1486/12). Under REACH, the "indicative tolerable cancer risk level" for the general population is 10^{-6} (ECHA 2012a). It should be noted that the tolerable LCR is a risk management issue and outside the scope of the mandate of the SCCS.

MoE ≥ 25.000 con T25.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2533–2562
www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients ☆,☆☆

R. Kroes [a], A.G. Renwick [b,*], V. Feron [c], C.L. Galli [d], M. Gibney [e], H. Greim [f], R.H. Guy [g], J.C. Lhuguenot [h], J.J.M. van de Sandt [i]

In silico: structural alerts

The decision tree approach starts with the identification and evaluation of possible structural alerts for genotoxicity and high potency carcinogenicity. This step excludes substances with structural alerts for high potency genotoxicity (aflatoxin-like compounds, *N*-nitroso-compounds, azoxy-compounds) from consideration and applies a generic highly conservative threshold for all other structural alerts of 0.15 μg/person/day (0.0025 μg/kg bw/day) (Fig. 1) [see Kroes et al. (2004) for the derivation of this value]. The decision tree considers substances lacking structural alerts for genotoxicity in a sequence of steps related to their structure and the estimates of intake. Analysis of neurotoxicity data showed that the cumulative distributions of no observed adverse effect levels (NOAELs) for organophosphates was lower than that for other neurotoxins. A TTC of 18 μg/person/day was proposed for organic phosphates.

Safety Assessment

To confirm the requirements of the European Cosmetic Regulation EU 1223/2009 according to Chapter III, Article 10 in the currently valid version for the following products

Sample-Cream

Bulk-Art.: 45000

Fp-Art.: FW-001 (100ml), FW-002 (50ml)

Genotoxicity	non-mutagenic	in vitro	OECD 471	TD0010
Carcinogenicity	non-carcinogenic	in silico	no adv. effects due to chemical structure to be expected	

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE MUTAGENO E CANCEROGENO

Approccio integrato basato su meccanismo d'azione, dati disponibili ed esposizione

MUTAGENICITÀ / GENOTOSSICITÀ

Valutazione basata su un approccio integrato (IATA)

Obiettivo: identificare il potenziale di indurre danni genetici (diretti o indiretti) che possano portare a cancerogenicità e/o effetti sulla riproduzione.

STRATEGIA DI VALUTAZIONE (SCCS)

1 Raccolta e valutazione di tutte le informazioni disponibili

- struttura chimica e alert
- dati *in vitro*, *in vivo* (se disponibili)
- dati su sostanze analoghe (read-across)
- dati di esposizione

2 Approccio sequenziale (IATA)

- batteria di test *in vitro* validati e complementari
- integrazione dei risultati (Weight of Evidence)

3 Considerazione del meccanismo d'azione (MoA)

- diretto (interazione con il DNA)
- indiretto (es. stress ossidativo, infiammazione)

4 Confronto con i criteri regolatori

- linee guida SCCS (12ª rev.)
- OECD test guidelines
- altri documenti di riferimento

Un risultato positivo in un test in vitro validato e adeguatamente interpretato è sufficiente per considerare la sostanza genotossica, a meno che non esista una chiara e solida evidenza contraria.

Evidenza di genotossicità?

(Weight of Evidence)

SÌ → SOSTANZA GENOTOSSICA

Non è possibile stabilire una soglia di sicurezza per effetti genotossici.

Approccio precauzionale

- Non si procede alla valutazione della cancerogenicità con approccio sogliato.
- Valutare la possibilità di esposizione trascurabile (es. TTC per sostanze genotossiche).
- Se l'esposizione non è trascurabile, la sostanza non è considerata sicura per l'uso nei cosmetici.

NO → SOSTANZA NON GENOTOSSICA

È possibile escludere un meccanismo genotossico rilevante alle condizioni d'uso previste.

Si procede alla valutazione della cancerogenicità con approccio sogliato

La valutazione si basa su:

- dati di tossicità a lungo termine (se disponibili)
- evidenza da sostanze analoghe
- meccanismo d'azione
- considerazioni di esposizione (es. MoS)

CANCEROGENESI

Valutazione basata sul meccanismo d'azione (MoA)

Obiettivo: valutare il potenziale di indurre tumori in seguito a esposizione prolungata, tenendo conto del meccanismo d'azione.

MECCANISMO GENOTOSSICO

Danno diretto o indiretto al DNA rilevante a basse dosi.

Senza soglia

Approccio non sogliato

- Linearized Cancer Risk (LCR)
- Valutazione solo se l'esposizione non è trascurabile

MECCANISMO NON GENOTOSSICO

Meccanismi non genotossici (es. alterazioni epigenetiche, recettore-mediati, proliferazione cellulare, immunomodulazione).

Con soglia

Approccio sogliato

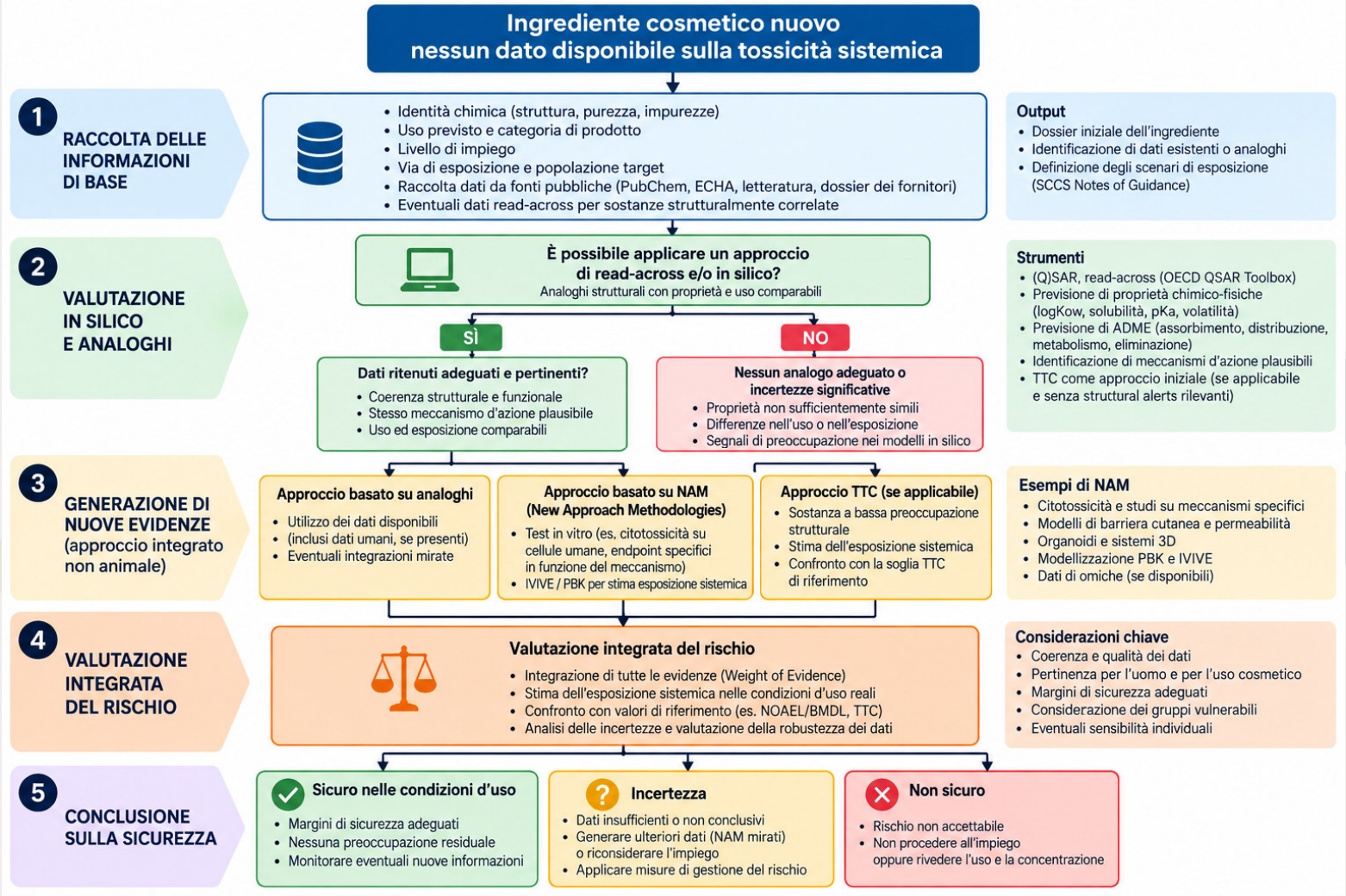
- Identificazione di un Point of Departure (NOAEL, BMDL)
- Applicazione di fattori di incertezza
- Calcolo del MoS

FATTORI DA CONSIDERARE

Qualità dei dati | Meccanismo d'azione | Rilevanza per l'uomo | Esposizione prevista | Incertezze e Weight of Evidence

MESSAGGI CHIAVE

- La valutazione di mutagenicità/genotossicità è un passaggio chiave nella sicurezza dei cosmetici.
- Una sostanza genotossica è di norma considerata non sicura per l'uso nei cosmetici, salvo esposizione trascurabile (es. TTC per sostanze genotossiche).
- Per sostanze non genotossiche, la valutazione della cancerogenicità si basa su un approccio sogliato, utilizzando un POD (NOAEL/BMDL) e il MoS.
- L'intero processo si basa su un approccio integrato (IATA) che considera tutte le evidenze disponibili e il meccanismo d'azione.


Ingrediente cosmetico nuovo
nessun dato disponibile sulla tossicità sistemica
1
RACCOLTA DELLE INFORMAZIONI DI BASE
• Identità chimica (struttura, purezza, impurezze)
• Uso previsto e categoria di prodotto
• Livello di impiego
• Via di esposizione e popolazione target
• Raccolta dati da fonti pubbliche (PubChem, ECHA, letteratura, dossier dei fornitori)
• Eventuali dati read-across per sostanze strutturalmente correlate
Output
• Dossier iniziale dell'ingrediente
• Identificazione di dati esistenti o analoghi
• Definizione degli scenari di esposizione (SCCS Notes of Guidance)
2
VALUTAZIONE IN SILICO E ANALOGHI
È possibile applicare un approccio di read-across e/o in silico?
Analoghi strutturali con proprietà e uso comparabili
SÌ
NO
Dati ritenuti adeguati e pertinenti?
• Coerenza strutturale e funzionale
• Stesso meccanismo d'azione plausibile
• Uso ed esposizione comparabili
Nessun analogo adeguato o incertezze significative
• Proprietà non sufficientemente simili
• Differenze nell'uso o nell'esposizione
• Segnali di preoccupazione nei modelli in silico
Strumenti
• (Q)SAR, read-across (OECD QSAR Toolbox)
• Previsione di proprietà chimico-fisiche (logKow, solubilità, pKa, volatilità)
• Previsione di ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo, eliminazione)
• Identificazione di meccanismi d'azione plausibili
• TTC come approccio iniziale (se applicabile e senza structural alerts rilevanti)
3
GENERAZIONE DI NUOVE EVIDENZE (approccio integrato non animale)
Approccio basato su analoghi
• Utilizzo dei dati disponibili
• (inclusi dati umani, se presenti)
• Eventuali integrazioni mirate
Approccio basato su NAM (New Approach Methodologies)
• Test in vitro (es. citotossicità su cellule umane, endpoint specifici in funzione del meccanismo)
• IVIVE / PBK per stima esposizione sistemica
Approccio TTC (se applicabile)
• Sostanza a bassa preoccupazione strutturale
• Stima dell'esposizione sistemica
• Confronto con la soglia TTC di riferimento
Esempi di NAM
• Citotossicità e studi su meccanismi specifici
• Modelli di barriera cutanea e permeabilità
• Organoidi e sistemi 3D
• Modellizzazione PBK e IVIVE
• Dati di omiche (se disponibili)
4
VALUTAZIONE INTEGRATA DEL RISCHIO
Valutazione integrata del rischio
• Integrazione di tutte le evidenze (Weight of Evidence)
• Stima dell'esposizione sistemica nelle condizioni d'uso reali
• Confronto con valori di riferimento (es. NOAEL/BMDL, TTC)
• Analisi delle incertezze e valutazione della robustezza dei dati
Considerazioni chiave
• Coerenza e qualità dei dati
• Pertinenza per l'uomo e per l'uso cosmetico
• Margini di sicurezza adeguati
• Considerazione dei gruppi vulnerabili
• Eventuali sensibilità individuali
5
CONCLUSIONE SULLA SICUREZZA
Sicuro nelle condizioni d'uso
• Margini di sicurezza adeguati
• Nessuna preoccupazione residuale
• Monitorare eventuali nuove informazioni
Incertezza
• Dati insufficienti o non conclusivi
• Generare ulteriori dati (NAM mirati) o riconsiderare l'impiego
• Applicare misure di gestione del rischio
Non sicuro
• Rischio non accettabile
• Non procedere all'impiego oppure rivedere l'uso e la concentrazione