

Introduction to general cosmetic toxicology

A. MACRÌ, G. SALVATORE and A. STAMMATI PAGANUZZI
Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia
Istituto Superiore di Sanità
299 vl. Regina Elena - 00161 Roma - Italy

Received July 23, 1983

Key words: cosmetic toxicology, potential toxicity, skin toxicity, chemical hazards environment and toxicity.

Synopsis

Considerable importance is currently being attached to the hazards connected with the presence of chemicals in the environment. Man himself may be exposed to these chemicals in a number of ways and circumstances, among which the use of cosmetics. This type of exposure — which chiefly concerns the skin but which may, in some particular cases, also implicate oral and inhalatory routes — is being viewed with growing interest by toxicologists, national health authorities and various international organizations. Here too, in the interests of preventive medicine and the safeguarding of public health from the effects of possibly harmful cosmetics, it is indispensable that adequate toxicology tests be performed prior to putting finished product on the market. In relation to this, various short, medium and long-term studies of topical and systemic effects on laboratory animals provide basic experimental data leading to a complex process of assessing the potential toxicity of product ingredients so that harmful usage conditions may be established and possible risk situations disclosed. The well-known limitations of *in vivo* testing, especially in relation to the significance of results and the possibility of extrapolating them to man plus the growing development of biomedical and biochemical knowledge have all encouraged the search for *in vitro* tests, that, though still in an experimental phase, already supply complementary information useful towards a better understanding of skin toxicity phenomena connected with the use of cosmetics.

Introduction

In the past, the toxicologist was only concerned with accidental or criminal poisoning. Today, however, not only man, but all living organisms are seriously endangered by the presence of a vast number of chemicals in the environ-

Riassunto

Attualmente si dà grande importanza alla valutazione dei rischi connessi con la presenza nell'ambiente delle sostanze chimiche, e l'uomo stesso può venire in contatto con esse in molteplici modi e circostanze, anche attraverso l'impiego dei cosmetici. Tale tipo di esposizione, che prevalentemente riguarda la via cutanea ma che in particolari casi può implicare anche la via orale ed inalatoria, viene considerata con interesse crescente da parte dei tossicologi, delle autorità sanitarie nazionali e vari organismi internazionali. Così anche in questo caso l'effettuazione di adeguati studi tossicologici preliminari all'immissione sul mercato dei prodotti finiti risulta indispensabile ai fini della prevenzione sanitaria e tutela della salute pubblica da eventuali danni da cosmetici. A tale riguardo tra le varie possibilità di studio, le osservazioni a breve, medio e lungo termine di effetti topici e sistemici eventualmente riscontrati sugli animali da laboratorio forniscono i dati sperimentali di base per avviare il complesso processo di valutazione tossicologica delle materie prime tendente a stabilire le condizioni di innocuità d'uso dei cosmetici o ad evidenziare probabili situazioni di rischio. Le note limitazioni della sperimentazione *in vivo*, soprattutto per quanto riguarda la significatività e la estrapolazione all'uomo dei risultati ottenuti, il crescente sviluppo delle conoscenze biomediche e biochimiche hanno favorito la ricerca di tests *in vitro* che sebbene ancora in fase sperimentale, forniscono già informazioni complementari ed utili ai fini di una migliore comprensione dei fenomeni di tossicità cutanea connessi con l'uso dei cosmetici.

Introduzione

In passato l'intervento del tossicologo era limitato agli avvelenamenti accidentali o volontari. Oggi, invece, tutti gli organismi viventi, compreso l'uomo, sono seriamente compromessi dalla

ment. About 60,000 chemicals are used daily in a variety of industrial activities and manufacturing processes, while new products are being put on the market by the hundreds every year. This great expansion of the chemical industry began after the Second World War and was at first accepted passively and then heartily by the public opinion because the new products seemed to improve living conditions. Now, after a few major accidents due to the careless and uncontrolled use of chemicals, public opinion is paying much more attention to these problems.

The study of the potentially injurious effects that substances in the environment may have on living organisms has become the "raison d'être" of experimental toxicology, which also sets out to indicate the various factors to be considered for the safe manufacturing, storage, marketing, use and disposal of chemicals and to develop efficient preventive measures.

The main routes by which man can be exposed to chemicals are: the respiratory tract (inhalation), the oral route (ingestion) and the skin (topical). Roughly speaking, this reflects the decreasing order of response to toxic chemicals, although many toxicity-influencing factors must be kept in mind during comparative investigations for predictive risk assessment; such factors are (Doull, 1980):

- a) related to the toxic agent;
- b) related to the exposure situation;
- c) inherent to the subject;
- d) environmentally related to the subject.

Investigation of the topical route toxicity is concerned with a variety of situations, such as exposure to many chemicals in Craft works, Agriculture and Industry, the environmental and accidental contamination, the use of drugs,

presenza nell'ambiente di un grandissimo numero di sostanze chimiche. Infatti, circa 60.000 prodotti chimici vengono usati ogni giorno nelle più diverse attività industriali e artigianali e ogni anno centinaia di nuove sostanze vengono immesse nel mercato. Questo enorme sviluppo della industria chimica, iniziato dopo la seconda guerra mondiale, è stato accolto dall'opinione pubblica, dapprima passivamente e poi con entusiasmo, perché i nuovi prodotti sembravano migliorare le condizioni di vita. Ora, tuttavia, dopo alcuni gravi incidenti dovuti all'uso incontrollato ed inadeguato delle sostanze chimiche, si sta facendo molta più attenzione a questi problemi.

Lo studio dei possibili effetti dannosi, che le sostanze presenti nell'ambiente possono avere sugli organismi viventi, è diventata la «raison d'être» del tossicologo sperimentale, il cui compito è anche quello di sviluppare efficienti misure preventive e di evidenziare i vari fattori che devono essere tenuti in considerazione per una ottimale produzione, conservazione, vendita, uso e utilizzazione delle sostanze stesse.

Le principali vie attraverso cui l'uomo può essere esposto agli xenobiotici sono: la via respiratoria (inalazione), la via orale (ingestione) e la via topica (cutanea). Approssimativamente, ciò riflette l'ordine decrescente di risposta ai prodotti chimici, anche se, in studi comparativi di predittività del rischio, è necessario considerare tutti i possibili fattori che possono influenzare la loro tossicità; tali fattori sono (Doull, 1980):

- a) inerenti all'agente tossico;
- b) inerenti al tipo di esposizione;
- c) inerenti al soggetto;
- d) fattori ambientali inerenti al soggetto.

Lo studio della tossicità attraverso la via cutanea deve considerare una serie

disinfectants, household products and cosmetics. Many cutaneous reactions and adverse systemic effects may occur in response to these different situation. Undoubtedly, "cosmetics and clothing provide the longest and most intimate contact with the skin and involve a high proportion of the population..." (Drill, 1978).

The role that cosmetics have in our society is substantial and their use is widespread throughout the population. What is more, recourse to cosmetics has been increasing rapidly over the recent years. People use cosmetics for a considerable portion of their lives, starting from a relatively early age. Moreover, consumers frequently utilize various products with different functions contemporaneously and continuously.

Obviously, the purpose of cosmetics is very different from that of drugs. Drugs are used in forms and dosage which are intended to have therapeutic effects and, in a relatively short time to cure a specific pathological situation in the body. Consequently, cosmetics should not exhibit pharmacological activity that could class them as pharmaceutical preparations. Nevertheless, the pharmacological properties of a particular ingredient does not preclude its presence in cosmetics, but it is, however necessary to justify the use of such an ingredient in relation to how the cosmetic is used and to the benefit it confers to the cosmetic itself (CE, 1978). This concept agrees with the Council of Europe (1978) definition that "a cosmetic product means any substance or preparation intended for placing in contact with the various external parts of the human body (epidermis, hair system, nails, lips and external genital organs) or with the teeth and mucous membranes of the oral cavity with a view exclusively or principally to cleaning them or protect-

di situazioni, come l'esposizione ad una vasta gamma di tossici utilizzati nei processi artigianali e industriali, la contaminazione ambientale e accidentale, l'uso di farmaci, disinfectanti, prodotti per la casa e cosmetici. Molte reazioni cutanee ed effetti sistemici dannosi possono intervenire in risposta a queste diverse situazioni. Indubbiamente, «i cosmetici e gli indumenti costituiscono il più lungo ed intimo contatto con la pelle e coinvolgono una grandissima parte della popolazione ...» (Drill, 1978).

I cosmetici svolgono un ruolo importante nella nostra società. Il loro uso è molto diffuso ed è grandemente aumentato negli ultimi anni. La popolazione li utilizza per un lungo periodo della propria vita, sin dai primi anni di età e spesso con continuità contemporaneamente a vari prodotti aventi funzioni differenti.

Ovviamente la funzione dei cosmetici è molto diversa da quella dei farmaci. Questi ultimi vengono usati in forme e dosaggi che hanno effetto terapeutico, per curare specifiche situazioni patologiche dell'organismo, in un tempo relativamente breve. Conseguentemente i cosmetici non devono avere attività farmacologica, in base alla quale potrebbero essere classificati come preparazioni farmaceutiche. D'altra parte, le proprietà farmacologiche di un particolare ingrediente non ne precludono la presenza nei cosmetici, che deve essere comunque giustificata in relazione all'uso del cosmetico ed al vantaggio che esso conferisce al prodotto finito (CE, 1978). Tale concetto è in accordo con la definizione del Consiglio d'Europa, secondo la quale per prodotti cosmetici si intendono «le sostanze o le preparazioni destinate ad essere applicate sulle superfici esterne del corpo umano (epidermide, sistema pilifero e

ing them in order to keep them in good condition, change their appearance, perfume them or correct body odours". This definition, which also includes some products that are as medicaments and over-the-counter (OTC) products in some countries, plus the cosmetics mentioned in Annex I of EEC Council Directive 76/768 dated 27/7/76 (EEC, 1976), gives a fair idea of just how widespread the use of these products is and how important it is to pay much more attention to their harmfulness, especially in view of the fact that the ingredients - natural or synthetic - number several thousands. Furthermore, toxicological data on these products are not always sufficient to give a full toxicological picture. In some cases the substances used are not even well-defined chemically. Yet, from the average consumer's point of view, cosmetics are thought to be absolutely safe, an impression reinforced by the immediacy of a vast range of favourable effects and the sensation of well-being that the use induces. Sometimes these facts lead to an underestimation of a product potential toxicity risks. Events, clinical evidence from dermatology, allergology and occupational medicine specialists plus the more general present-day knowledge about the potentially toxic effects of chemicals in their respective fields of application all suggest that greater care should be taken with chemicals and that deeper investigations should be conducted to obtain greater guarantees so that they can be used safely.

The toxic effects of some cosmetics may be either short- or long-term, regardless of whether they induce topical or systemic alterations. Typically adverse reactions may entail irritation (either from exposure or as a cumulative effect), and/or phototoxicity-, hypersen-

capelli, unghie, labbra, organi genitali esterni) oppure sui denti e sulle mucose delle labbra allo scopo esclusivamente o prevalentemente di pulirli, profumarli, proteggerli per mantenerli in buono stato, modificarne l'aspetto o correggerne gli odori corporei». Questa definizione, che include anche prodotti che in alcuni Paesi sono considerati farmaci e prodotti da banco, confrontata con le categorie di cosmetici menzionate nell'allegato I della direttiva del Consiglio CEE 76/768 del 27 luglio 1976 (CEE, 1976), rende meglio di ogni altro discorso l'idea dell'estensione dell'uso di questi prodotti nella popolazione e dell'importanza di prestare maggiore attenzione all'aspetto dell'innocuità dei cosmetici, i cui ingredienti, sia naturali che sintetici, globalmente raggiungono l'ordine di grandezza di varie migliaia. Non sempre, poi, le informazioni tossicologiche su tali materiali risultano pienamente soddisfacenti a delinearne il profilo tossicologico completo, ed, in alcuni casi, i materiali impiegati non sono ben definiti dal punto di vista chimico. Si deve osservare, invece, che per il gran pubblico il cosmetico è visto come una cosa assolutamente sicura ed, inoltre, l'immediatezza della vasta gamma di effetti e di sensazioni di benessere connessi con il loro uso portano talvolta a sottovalutarne gli eventuali rischi tossicologici. La storia, le esperienze cliniche dei settori specializzati della dermatologia, allergologia e medicina del lavoro e, più in generale, le attuali conoscenze sui potenziali effetti tossici delle sostanze chimiche nei vari settori di utilizzazione delle stesse consigliano, però, una maggiore prudenza ed un approfondimento degli studi in vista di acquisire maggiori garanzie in termini di sicurezza di impiego.

Gli effetti associabili ai prodotti co-

sitivity-, or photosensitivity-induced lesions. Substantial evidence of systemic toxicity affecting particular organs or processes exists in the scientific literature but currently available epidemiological findings only seem to indicate some particular products as more harmful than others.

While immediate topical reactions can be noticed by the consumer himself (who could, there and then, identify the probable cause and so stop using that particular product), long-term systemic effects are, by their very nature, more insidious and difficult to evaluate in terms of cause and effect. From a health and toxicology point of view, the latter effect is the more worrisome.

Generally speaking, the appearance of undesirable toxic effects as a result of using cosmetics may be due to one more of the following:

- 1) presence of toxic ingredients:
 - a) introduced during manufacture;
 - b) formed by product deterioration;
- 2) abuse or improper use of the product;
- 3) idiosyncratic phenomena in the individual;
- 4) unforeseen synergisms between cosmetics and other products.

In view of the foregoing preliminary observations, it is evident that a certain urgency exists for the implementation of adequate preventive health measures in Cosmetics. This would be possible by a more careful choice of raw material ingredients, bearing in mind not only technical or functional features but the particular need for chemical and microbiological purity and the knowledge of toxicological properties.

It is virtually senseless to draw up a toxicology research program for a certain substance without considering the finished cosmetic, its normal and reasonably foreseeable handling, its

smetici possono essere di natura tossica a breve e a lungo termine, sia che si tratti di alterazioni locali o sistemiche. Le constatate reazioni avverse riguardano generalmente fenomeni irritativi, sia primari che da effetti cumulativi, lesioni da fototossicità, ipersensibilizzazione e fotosensibilizzazione. Diverse evidenze di tossicità sistemica a carico di vari organi ed apparati sono anche descritte nella letteratura scientifica, mentre le indagini epidemiologiche attualmente disponibili sembrano indicare un maggior rischio connesso con l'uso di particolari sostanze.

Mentre gli effetti locali immediati sono rilevati dallo stesso consumatore (il quale, già da solo, potrebbe essere in grado di riconoscere le cause e decidere, quindi, di interrompere l'uso di quel particolare prodotto), gli effetti a lungo termine, invece, per loro natura sono più insidiosi e più difficili da valutare in termini di causa ed effetto e, pertanto, sono più preoccupanti dal punto di vista sanitario e tossicologico. Generalmente, la comparsa di un effetto tossico indesiderato, conseguente all'uso di un cosmetico, può essere ricondotta ad uno dei seguenti motivi:

- 1) presenza di ingredienti tossici:
 - a) introdotti all'atto della formulazione;
 - b) formati a causa dell'alterazione del prodotto;
- 2) abuso od uso improprio del prodotto;
- 3) fenomeni individuali di idiosincrasia;
- 4) associazione imprevista di vari cosmetici anche con altri prodotti.

Da tali osservazioni preliminari deriva in pratica l'esigenza di attuare una adeguata prevenzione sanitaria anche nel settore cosmetico, attraverso una più attenta scelta delle materie prime, non solo per quanto riguarda le pro-

conditions of use area of skin contact and other parts of the body that might be affected, its duration of effect, application frequency and last, but not least, potential chemical alterations that might occur during cosmetic treatment. Assessment of cosmetic user safety is long complex as has been found after a series of basic observations from which it appears that product skin tolerability is not the only aspect to be considered. A cosmetic's overall effects on the organism as a result of cutaneous absorption must also be borne in mind. The fundamental consideration to be kept in mind is that the skin is not entirely impermeable to chemicals: depending on their chemical and chemico-physical properties, some substances may, or may not, penetrate through to the other side. Some areas of the skin are more susceptible to this phenomenon than others: mucous membranes and hair-covered areas are two examples. As for the lipid sebaceous layer of the skin, this is more penetrable by lipophilic than hydrophilic substances. Absorption efficiency depends on the nature of the other substances in the product and the environmental conditions of the skin itself, i.e. temperature and humidity.

Mixing various raw materials during product manufacture may alter the individual toxicity characteristics of the components taken one by one. This derives from modifications in absorption and possible substance synergisms or antagonisms.

It should be recalled that the skin is a metabolically active tissue hence contact with substances should also be studied for possible modifications in biochemistry. Knowledge of nature of metabolizing enzyme systems in the skin is recommendable in designing suitable toxicology tests.

Microbiology aspects should be con-

prietà tecnologiche e funzionali, ma anche in relazione a particolari requisiti di purezza chimica e microbiologica ed alle proprietà tossicologiche note.

È praticamente privo di significato realizzare un piano di studi tossicologici su una sostanza, senza peraltro fare considerazioni in rapporto al prodotto finito, alla sua forma cosmetica e relative modalità e condizioni d'uso normale o ragionevolmente prevedibili, all'area di contatto ed alle altre parti del corpo che potrebbero essere coinvolte, alla durata, alla frequenza di applicazione, nonché in rapporto a talune modificazioni chimiche che possono avvenire nel corso dei trattamenti cosmetici.

Il processo di valutazione della sicurezza dell'uso dei prodotti cosmetici è lungo e complesso e deriva da un insieme di osservazioni di base dalle quali emerge che la tollerabilità di un prodotto per la cute non è l'unico aspetto da considerare, mentre si deve tenere presente anche l'effetto generale sull'organismo conseguente all'assorbimento cutaneo.

Infatti, la considerazione di fondo da fare è che la cute non è completamente invalicabile alle sostanze chimiche, le quali in funzione delle loro proprietà chimiche e chimico-fisiche, possono più o meno attraversarla. Alcune zone della cute sono maggiormente interessate a questo fenomeno, come, ad esempio, le mucose e le aree ricoperte da sistemi piliferi.

Lo strato lipidico e sebaceo della pelle può essere attraversato più facilmente dalle sostanze lipofile che da quelle idrofile ed il grado di assorbimento è influenzato dalla natura del veicolo presente nel prodotto e da altre condizioni, come l'umidità o la temperatura della pelle.

L'associazione di più materie prime

sidered in relation to raw material and finished product microbiological and the microbial flora normally to be found in the skin and its surroundings. Microbiology studies should most certainly examine the interactions that might occur between microorganism *in situ* and substances applied.

Hence, cosmetology toxicity studies should be conducted along two lines: one aimed at observing potential topical effects, the other at studying the possibilities that systemic effects might occur. Absence of topical reactions can not automatically be considered as sufficient proof of product harmlessness. The significance of absorption studies also aimed at quantitating bioavailable doses, and more generally, of determining chemobiokinetics (distribution, accumulation, metabolism, and excretion), should be evident.

For these reasons many international organizations agree that, prior to marketing, suitable studies should be performed not only on product ingredients but on the finished product as well. Just how much toxicity testing should be performed depends on contact duration and frequency and the particular circumstances for individual cosmetic use. Hence, some test may have a wide range of applications whereas others may be necessary if a raw material to be used in a particular formulation is easily absorbed through the skin or mucosa, possibly ingested, inhaled or put in contact with the eyes. So, as may be seen, from the above, the matter is not a simple one. No representative example can be drawn up unless a whole series of data are available on the separate raw materials (their chemical nature, structural formula, manufacturing process, chemical and chemico-physical properties (purity, nature of impurities, stability, analytical methods, etc.), on

nella formulazione di un prodotto può modificare, poi, la tossicità presentata individualmente da ciascun ingrediente; ciò in conseguenza del cambiamento del grado di assorbimento ed anche per eventuali interazioni sinergiche o di antagonismo tra le sostanze.

È da tenere presente, inoltre, che la cute è un tessuto metabolicamente attivo, per cui il contatto con le sostanze dovrebbe essere studiato anche in funzione di possibili modificazioni biochimiche. La conoscenza della natura del complesso degli enzimi metabolizzanti presenti nella pelle dovrebbe essere di aiuto nella scelta dei tests tossicologici idonei.

Considerazioni di ordine microbiologico, dovrebbero, poi, essere fatte sia in termini di purezza microbiologica delle materie prime e del prodotto finito che di flora microbica normalmente presente sulla cute e suoi annessi e, comunque, in relazione alle possibili interazioni che possono verificarsi tra i microorganismi e le sostanze applicate.

Lo studio della tossicità in cosmetologia si dovrebbe realizzare, quindi, su due linee, l'una volta alla osservazione di eventuali effetti topici, e l'altra che prende in considerazione la possibilità dell'instaurarsi di effetti sistemici. Infatti, l'assenza di un effetto topico di per sé non può essere mai considerata prova sufficiente di innocuità del prodotto. È evidente, pertanto, il significato che assumono gli studi sull'assorbimento, volti anche a quantizzare la dose biodisponibile in tal senso, e più in generale quelli di chemiobiocinetica (distribuzione, accumulo, metabolismo, esenzione).

Per queste ragioni molti organismi internazionali raccomandano che vengano effettuati gli studi adeguati, non solo sui singoli ingredienti, ma anche sul prodotto finito, prima che questo ven-

the finished products (composition, cosmetic form, details on usage etc.) and any preliminary on toxicity testing.

Generally speaking, most of the toxicity tests normally used in accordance with international trends (Guidelines from the European Council and the EEC Scientific Committee for Cosmetology) entail:

- dermal and mucous membrane irritation
- eye irritation
- sensitization
- phototoxicity and photosensitization
- absorption and pharmacokinetics
- acute (oral, dermal, inhalation) toxicity
- oral, dermal and inhalation toxicity at 28 days or 90 days
- mutagenicity
- chronic toxicity and carcinogenicity
- teratology and reproduction.

The specialized literature gives ample description of the operational details of individual tests and OECD (1981) has recently published "Guidelines for Testing of Chemicals" in which the methods to determine the chemical, chemico-physical and toxicological properties of chemicals are described. The following is a series of particular comments on individual toxicological tests.

Skin irritation test is widespread and used to establish whether an ingredient is suitable for use in cosmetics. The same test is applied to the finished product to ensure that irritation does not occur as a result of all ingredients being present at the same time.

Essentially, the irritation potential of a chemical agent on shorn skin of lab. animals (albino rabbit, etc.), is determined by the extent of erythema and oedema. Irritation is indicated on the basis of a conventional score system. Suitably combined, individual test scores express the degree of primary ir-

ga messo sul mercato. Spesso è il caso particolare che determina l'estensione da dare alla sperimentazione tossicologica, in rapporto alla durata e alla frequenza del contatto ed a particolari circostanze di uso del cosmetico in esame.

Così, alcuni saggi sono di applicabilità generale, mentre altri possono rendersi necessari se la materia prima destinata a far parte di una data formulazione è suscettibile di essere assorbita attraverso l'epidermide o le mucose, od anche occasionalmente risultare ingerita, inalata o venire a contatto con gli occhi.

La questione come si vede non è semplice, e non può essere esemplificata a priori, se non si dispone di tutta una serie di informazioni relative alle singole materie prime (natura chimica, formula di struttura, eventuale metodo di preparazione, proprietà chimiche e chimico-fisiche, grado di purezza e natura delle impurezze, stabilità, metodi analitici), ai prodotti finiti (composizione, forma cosmetica, particolarità dell'uso), ma anche ad eventuali dati preliminari sulla tossicità.

In linea di massima l'insieme dei saggi tossicologici usualmente impiegati secondo gli orientamenti internazionali, tra cui le linee guida del Consiglio d'Europa e del Comitato Scientifico di Cosmetologia della CEE, comprende:

- irritazione cutanea e delle mucose
- irritazione oculare
- sensibilizzazione
- fototossicità e fotosensibilizzazione
- assorbimento e farmacocinetica
- tossicità acuta (orale, dermale, inalatoria)
- tossicità orale, dermale e inalatoria a 28 o 90 giorni
- mutagenesi
- tossicità cronica e cancerogenesi
- teratogenesi e riproduzione.

ritation on a scale from 0 to 8, i.e. from no irritation to severe irritation. Major criticism of this method has been raised because it entails a personal interpretation by the observer who must judge to what extent erythema and oedema appear and because of the various sensitivities of the different animal species used in testing and because they react to the same product differently than man does. This makes result extrapolation problematic. In connection with this point, it should be remembered that the self-protective capacity of animals is normally ensured by its furry coat and that, compared to human skin, animal skin is correspondingly thinner. This, as well as structural differences, should give an idea of what qualitative and quantitative differences may occur when observing the reaction to some chemicals in man and animals. However, more often than not, irritation tests in rabbits tend to produce false responses rather than false no-responses. Other comments refer to the difficulty of keeping topical applications in a well-defined area, response variation as a function of the particular operational set-ups adopted, and the difficulty of evaluating reversibility after 72 hours of observation in some cases.

Also for the sensitization test on guinea pigs, final results are expressed according to a scoring pattern which indicates various degrees of erythema and/or oedema observed. The test is somewhat limited because it cannot be used for those substances that produce primary irritation. Furthermore, possibility allergic effects may not necessarily occur at the same place that the test substance was applied to the skin. Another point to be noted is that, because sensitization reactions are regulated by an immunological mechanism, they are closely linked with individual genetic

La letteratura specializzata descrive ampiamente i dettagli operativi dei singoli saggi ed anche l'OCSE (1981) ha di recente pubblicato le «Guidelines for testing of chemicals» in cui sono descritti i metodi di determinazione delle varie proprietà chimiche, chimico-fisiche e tossicologiche delle sostanze chimiche. Osservazioni particolari sui singoli saggi sono fatte nel seguito.

I saggi di irritazione cutanea sul coniglio sono di applicazione generale e indicativi per stabilire se un ingrediente è adatto per l'uso in un cosmetico, mentre lo stesso test eseguito sul prodotto finito serve per assicurarsi che l'irritazione non si verifichi per la presenza contemporanea dei vari ingredienti. In sostanza il potere irritante provocato da un agente chimico sulla cute rasata di animali da laboratorio (coniglio albino, etc.) si valuta in termini eritemici ed edematosi attraverso una scala di punteggi convenzionali, i quali opportunamente combinati tra loro determinano l'indice di irritazione primaria, variante da zero ad otto, e cioè da un potere irritante nullo ad un grado di irritazione molto severo. Critiche di maggior rilievo a questo metodo sono state sollevate in relazione alla soggettività dell'osservatore nell'apprezzare il grado di eritema e di edema, e alle variazioni di sensibilità delle diverse specie animali e dell'uomo per uno stesso prodotto, il che rende più difficile l'estrapolazione dei risultati. In tal senso occorre, inoltre, considerare che la capacità protettiva negli animali è normalmente assicurata dal manto pilifero e che l'epidermide in confronto a quella umana è corrispondentemente più sottile. Questa ed altre differenze strutturali dovrebbero rendere conto di divergenze qualitative e quantitative nelle reazioni parallelamente osservate nell'uomo e nell'ani-

factors. No-effect results obtained with treated animals do not, therefore, necessarily rule out the possibility of allergic reactions in man.

Eye irritation in the rabbit is assessed by observing alterations such as corneal opacity, corneal ulceration, inflammation of the iris, corneal vessel hyperemia, conjunctiva oedema and hyperemia. Depending on the seriousness of the lesions produced, points are scored which, when added up, determine an irritation score.

Phototoxicity and photosensitization are assessed in particular cases, i.e. when the product to be used is utilized in direct sunlight, as occurs for tanning products. Traditional skin tests (primary irritation, sensitization, phototoxicity and photosensitization) do not, as stated above, constitute a comprehensive battery for the investigation of toxicity, especially when the products being tested give no-effect or only slight-effect results. Hence, acute, subacute and chronic toxicity tests, designed in accordance with *in vivo* toxicity testing criteria and, therefore, entailing the clinical and anatomo-hysto-pathological examination of lab animals for signs of skin absorption, are particularly significant.

Acute dermal toxicity acts as an early indication of the extent of absorption and the advisability of extending studies to systemic toxicity, providing preliminary data on the doses to be used for short-term and long-term tests that may be needed. It is here that chemiobiokinetics and metabolism studies are particularly useful for those cosmetics that do not envisage removal immediately after application. Besides entailing the determination of LD_{50} , observations on acute toxicity, also include description of the death causes and the toxic effects found in surviving animals.

male nel caso di alcune classi di sostanze. Più spesso, però, i tests di irritazione sul coniglio tendono maggiormente verso falsi positivi che verso falsi negativi. Altre osservazioni, poi, riguardano la difficoltà di mantenere la dose in un'area ben definita, la variabilità della risposta in funzione di particolari accorgimenti operativi adottati, la difficoltà di valutare in alcuni casi il grado di reversibilità dopo 72 ore di osservazione.

Anche per il test di sensibilizzazione sulla cavia, il risultato finale viene espresso secondo punteggi convenzionali applicati ai vari gradi di eritema ed edema osservati. Il test è limitativo in quanto non applicabile a quelle sostanze che producono irritazione primaria e, comunque, un eventuale effetto allergico può non verificarsi nel punto di applicazione della sostanza in esame. Inoltre, le reazioni di sensibilizzazione, risultando da un meccanismo immunologico, sono strettamente legate a fattori genetici individuali, per cui dai risultati negativi eventualmente ottenibili negli animali trattati non si può mai escludere la possibilità che reazioni allergiche possano verificarsi nell'uomo.

L'attività irritante sull'occhio del coniglio, poi, si valuta attraverso le osservazioni di alterazioni quali l'opacità della cornea, la presenza di ulcerazioni corneali, la infiammazione dell'iride, l'iperemia dei vasi corneali, l'edema e la iperemia della congiuntiva. A seconda della gravità delle lesioni prodotte, si applicano convenzionalmente dei punteggi che, combinati tra loro, determinano una scala di indici di irritazione.

La fototossicità e la fotosensibilizzazione viene valutata in particolari casi, cioè quando all'utilizzazione del prodotto si accompagna la contemporanea

Purpose of the 28-90 day cutaneous tests and those that last longer is to determine the lowest dose to induce a toxic response and the highest dose at which no effect is noticed after repeated exposure to doses that are obviously lower than those used in acute toxicity tests. When no data on absorption is available, short-term tests are required and, as described above, include a description of the functional and/or morphological alterations in the animal. Similar comments may also be made for acute, 28 and 90 day studies for oral and inhalatory intake when ingestion or inhalation may occur with product use.

Chronic toxicity and carcinogenicity tests are performed when repeated exposure and prolonged absorption of the test substance are foreseen to the extent that some long-term systemic effects might occur. Dose levels for these tests are lower than those used for short-term studies. These investigations are required whenever the test substance exhibits structural similarities with other substances that are known or suspected to be carcinogenic, or when the substance has already produced some effects in mutagenesis studies.

In view of the significant evidence that most mutagenic substances may also be potential carcinogens, the latter of these tests should be run on every raw material. The following are some of the tests generally used: a) *in vitro* tests: the Ames test (with or without microsomal activation), unscheduled DNA synthesis, covalent bonding with DNA proteins, transformation of cells *in vitro*, sister chromatid exchanges; b) *in vivo* tests: micronucleus test and sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster*.

When assessing substances, it is also necessary to pay particular attention to any data that might exist on reproduct-

esposizione alla luce solare, come avviene ad esempio nel caso dei prodotti per l'abbronzatura.

I saggi cutanei tradizionali (irritazione primaria, sensibilizzazione, fototossicità e fotosensibilizzazione), non costituiscono, come già rilevato, uno studio completo di tossicità cutanea, soprattutto nel caso di sostanze che ai tests sopracitati forniscono risposta negativa o debolmente negativa. Particolare rilevanza assumono, pertanto, gli studi acuti, subacuti e cronici impostati secondo i criteri della sperimentazione tossicologica *in vivo* e comprendenti, quindi, le osservazioni cliniche ed anatomicopatologiche degli animali da laboratorio, in relazione all'assorbimento cutaneo.

La tossicità acuta per via cutanea fornisce la prima indicazione sull'entità dell'assorbimento e sull'opportunità di estendere gli studi di tossicità sistemica, dando le informazioni preliminari sulla scelta delle dosi per i saggi a breve e lungo termine eventualmente da svolgere. A tale riguardo gli studi di chemiobiocinetica e di metabolismo sono di particolare utilità soprattutto per quei prodotti il cui uso non prevede la rimozione subito dopo l'applicazione. Le osservazioni sulla tossicità acuta, oltre che la determinazione della DL₅₀, comprendono anche la descrizione delle cause di mortalità e degli effetti tossici riscontrati negli animali sopravvissuti.

Lo scopo dei tests a 28-90 giorni e di quelli a lungo termine per via cutanea è di determinare la dose più bassa che induce una risposta tossica e la dose più alta nella quale l'effetto non è osservato, a seguito di ripetute esposizioni a livelli di dose naturalmente inferiori a quelli utilizzati nei saggi di tossicità acuta. In mancanza di dati sull'assorbimento i tests a breve termi-

ion, teratogenesis, neurotoxicity, hormone activity, immunosuppression and behavioral effects.

As may be seen from the foregoing, tests are conducted on lab animals even though it cannot be stated with absolute certainty that the effects observed in animals will most certainly occur in man nor must a particular experimental model set up, which is acceptable for animals, necessarily be ideal to represent a risk situation for man. However, for the sake of safety, substances found harmful for animals should not be used on man, especially where carcinogenesis is concerned.

Lastly, it is to be pointed out that, owing to some limitations in *in vivo* toxicological testing, that sometimes also implicate ethical considerations, especially when it comes to eye irritation tests, efforts are being made world-wide to introduce alternative, *in vitro* methods in animal experimentation. This is, however, also for the known shortcomings inherent in animal tests, such as: a) differences between the reactions of various animal species to the same chemicals (Elias, 1978); b) differences between man and test animal both in xenobiotic metabolism rates (Quinn et al., 1958; Hucker, 1970) and in metabolism pathways (Weisburger et al., 1964); c) high number of animals to be employed in every test and long time required for some tests; d) questionable significance of some tests, such as the LD₅₀-test (Zbinden and Flury-Roversi, 1981). Moreover, in recent years there has been a growth in the concern for useless pain inflicted on animals, not only among scientists, but also among general population.

The use of cell culture systems in toxicology studies is widespread and supported by the literature (Paganuzzi Stamatii et al., 1981). As in the case of

ne sono sempre richiesti e includono, come detto, la descrizione delle modificazioni funzionali e morfologiche sull'animale.

Analoghe osservazioni si possono fare per gli studi acuti e quelli a 28 e 90 giorni per via orale ed inalatoria quando nell'uso del prodotto può verificarsi l'ingestione o l'inalazione.

La tossicità cronica e la cancerogenesi si eseguono nei casi in cui esistono evidenze di continue esposizioni e prolungati assorbimenti della sostanza in esame tali da far prevedere possibili effetti sistemici a lungo termine. I livelli di dose impiegati sono inferiori a quelli utilizzati negli studi a breve termine. Tali studi sono sempre richiesti nei casi di analogie strutturali della sostanza in esame con noti cancerogeni o sospetti tali, e quando la sostanza ha fornito risultati positivi ai tests di mutagenesi. Questi ultimi saggi dovrebbero essere sempre eseguiti su ogni materia prima in considerazione delle significative evidenze del fatto che le sostanze mutagene possono essere potenziali cancerogeni. Tra i tests usualmente impiegati si citano, ad esempio: a) tests *in vitro*: test di Ames, con o senza attivazione microsomiale, sintesi non programmata del DNA, legame covalente alle proteine del DNA, trasformazione di cellule *in vitro*, scambi tra cromatidi fratelli; b) test *in vivo*: test del micronucleo, mutazioni letali recessive legate al sesso in *Drosophila melanogaster*. In sede di valutazione delle sostanze è necessario, inoltre, prestare particolare attenzione ad eventuali dati relativi alla riproduzione, teratogenesi, neurotossicità, attività ormonale, immunosoppressione ed effetti sul comportamento.

Come si è visto, nei tests menzionati l'animale da laboratorio è il modello sperimentale adottato, pur non poten-

animal models these systems also suffer from some limitations, inherent both in their very nature and to the lack of standardized techniques. A few of such problems are: a) possibility of carrying out mainly short-term studies of acute toxicity; b) difficulties in studying substances with mediated effects; c) problems due to differences in test compound solubilities; d) possibilities of test compounds reacting with medium components; e) gap in *in vivo* extrapolation.

However, these systems do offer some advantages that should be exploited in toxicology investigations. The first such advantage is the possibility of using human cells in culture, hence bypassing, at least in part, problems of extrapolating results to man. Moreover, *in vitro* tests enable the early effects at a cellular level to be observed and reversibility studies to be performed. Beside this, such tests are relatively accessible, simplified systems by which it is possible to determine dose-effect and time concentration relationships.

There are few *in vitro* studies directly related to local cutaneous toxicity, but they do seem to be very promising. Among these few tests an alternative Draize test for eye irritancy, set-up by Douglas and Spilman (1982), deserves to be mentioned. In this system, corneal endothelial cells were used to test substances with severe, moderate or no effect as irritants. Test results were seen to be related to *in vivo* observations. Moreover, in the United States the "John Hopkins Center for Alternatives to Animal testing", whose purpose is that providing data on toxicity mechanisms, has recently sponsored several research projects in this field. The following are just a few of the most significant examples: "Irritancy testing with stratified epidermal cell culture",

do affermare con certezza che gli effetti eventualmente evidenziati sull'animale sicuramente possano verificarsi nell'uomo, mentre lo stesso modello sperimentale potrebbe non essere idoneo a rappresentare una situazione di rischio nell'uomo. Motivi di prudenza, tuttavia, consigliano di non usare quelle sostanze risultate nocive per l'animale soprattutto per quanto attiene la cancerogenesi.

Si fa rilevare, infine, che, per talune limitazioni delle sperimentazioni tossicologiche *in vivo*, che, tra l'altro in alcuni casi coinvolgono anche aspetti etici, particolarmente per quanto riguarda il test di irritazione oculare, si stanno facendo molti sforzi in tutto il mondo per mettere a punto sistemi *in vitro*, alternativi alla sperimentazione animale. Tali limitazioni sono, ad esempio: a) differenze di reazione delle varie specie animali alle stesse sostanze chimiche (Elias, 1978); b) differenze tra uomo e animali da laboratorio, sia per quanto riguarda la velocità (Quinn et al., 1958; Hucker, 1970), che il modo in cui gli xenobiotici vengono metabolizzati (Weisburger et al., 1964); c) elevato numero di animali utilizzato nei vari tests e lungo tempo richiesto per alcuni di essi; d) discutibile utilità di alcuni tests, come ad esempio quello della DL_{50} (Zbinden e Flury-Roversi, 1981). Inoltre sempre più, negli ultimi anni, è aumentato l'interesse, non solo da parte del mondo scientifico, ma anche di tutta l'opinione pubblica, contro le spesso inutili sofferenze inflitte agli animali. L'uso delle colture cellulari nelle indagini tossicologiche è molto diffuso e riportato in letteratura (Paganuzzi Stamatì et al., 1981). Come nel caso dei modelli animali, anche questi sistemi presentano alcuni limiti inerenti sia alla loro stessa natura, che alla mancanza di tecniche standardizzate. Alcuni di

"An *in vitro* alternative to the Draize test", "Detection of potential inflammatory agents by analysis of the distribution of hydrolytic enzymes in cultured fibroblasts", "Cultured human endothelial cells: markers for chemical irritants", "An *in vitro* test for irritancy of chemicals using human leucocytes". As several fibroblast lines derived from human skin are available and because there is the possibility of setting up primary cultures of keratinocytes, that retain *in vitro* most of the functions they have *in vivo* (Green, 1979), it would seem possible to extend cell culture systems to cutaneous toxicity problems in the future.

It is highly likely that systems such as these may contribute to improving our understanding of certain toxic phenomena because they provide useful data for the study of skin biochemistry. Some of the several functions of such a highly specialized tissue as is skin (melanogenesis, keratinization, sebum production, sweating, cell regeneration, energy production, etc.) are probably actually modified after use of a cosmetic.

In conclusion, the above-mentioned toxicological tests are the minimum required to assure that the products are not harmful to animals before they are put on the market. However, because of the well-known difficulty in extrapolating animal data to man, it is highly recommendable to check finished product safety, both in users and occupationally exposed people, from the outset of marketing. Moreover, when cosmetics are marketed on a full scale, epidemiological studies should be performed to reveal the true incidence of possibly adverse reactions.

questi problemi sono: a) possibilità di eseguire principalmente studi a breve termine di tossicità acuta; b) difficoltà di studiare sostanze con effetti mediati; c) problemi dovuti alla diversa solubilità dei prodotti in esame; d) possibilità da parte della sostanza in esame di reagire con i componenti del mezzo di coltura; e) difficoltà di estrapolare i risultati ottenuti alla situazione *in vivo*. Tuttavia, questi sistemi offrono alcuni vantaggi che dovrebbero essere utilizzati al massimo nelle ricerche tossicologiche. Il più importante di essi è la possibilità di usare cellule umane in coltura, superando così, almeno in parte, il problema della estrapolazione dei risultati all'uomo. Inoltre, i tests *in vitro* consentono di individuare il danno a livello cellulare, sin dal suo insorgere e di osservare la possibile reversibilità dell'effetto stesso. D'altra parte tali sistemi sono relativamente semplici ed accessibili e permettono di determinare le relazioni tra dose ed effetto e tra tempo e concentrazione.

I pochi studi *in vitro* che riguardano la tossicità cutanea locale, sembrano molto promettenti. Tra questi merita di essere ricordato il test di Draize alternativo, per l'irritazione oculare, messo a punto da Douglas e Spilman (1982). In questo sistema, forti e moderati irritanti e non irritanti sono stati saggiati su cellule endoteliali di cornea e i risultati hanno mostrato una buona correlazione con quelli osservati *in vivo*. Inoltre, negli Stati Uniti il «Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing», il cui scopo è quello di fornire dati sui meccanismi di tossicità, ha recentemente sponsorizzato molti progetti di ricerca in questo campo. Alcuni degli esempi più significativi sono i seguenti: «Test di irritazione con cellule epidermiche stratificate in coltura», «Un'alternativa *in vitro* al test di Draiz-



ze», «Individuazione di potenziali agenti infiammatori mediante l'analisi della distribuzione degli enzimi idrolitici dei fibroblasti in coltura», «Cellule endoteliali umane in coltura: bersagli per gli irritanti chimici», «Leucociti umani per studiare *in vitro* l'irritazione da parte di sostanze chimiche».

Poiché sono disponibili parecchie linee di fibroblasti derivate da pelle umana e data la possibilità di mettere a punto colture primarie di cheratinociti, che conservano *in vitro* la maggior parte delle funzioni che svolgono *in vivo* (Green, 1979), sembrerebbe possibile estendere in futuro l'applicazione delle colture cellulari allo studio dei problemi di tossicità cutanea. È molto probabile che tali sistemi possano contribuire a migliorare la comprensione di certi fenomeni tossici, poiché essi forniscono dati utili per lo studio della biochimica della pelle. Infatti, alcune delle numerose funzioni di tale tessuto altamente specializzato (melanogenesi, cheratinizzazione, produzione di sebo e di sudore, rigenerazione cellulare, produzione di energia, ecc.) sono probabilmente modificate in seguito all'uso di un cosmetico.

In conclusione, i tests tossicologici già citati sono necessari per assicurare che i prodotti non siano dannosi agli animali, prima che vengano messi in commercio. Tuttavia, a causa della ben nota difficoltà di estrapolare all'uomo i dati ottenuti sugli animali, è altamente raccomandabile controllare la sicurezza dei prodotti finiti, sia sugli utilizzatori, che sul personale professionalmente esposto, sin dal primo momento in cui vengono lanciati sul mercato. Inoltre, nel momento in cui essi vengono venduti a pieno ritmo dovrebbero essere eseguiti studi epidemiologici per individuare la reale incidenza delle reazioni indesiderate.

REFERENCES

- 1 **Commission of the European Communities:** Official Gazette of 27/9/76, n° L 262, p. 169, Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.
- 2 **Council of Europe (1978):** *Cosmetic products and their ingredients*, Strasbourg.
- 3 **Douglas, W.H.J. and Spilman, S.D. (1982):** In vitro ocular irritancy testing (*in press*).
- 4 **Doull, J. (1980):** «Factors Influencing Toxicology», in: «*Toxicology: The Basic Science of Poisons*», Doull, J., Klaasen, C.D., Amdur, M.O. (eds.), Macmillan Publishing Co., Inc. (New York), second ed., pp. 70-83.
- 5 **Drill, V.A. (1978):** «Consideration of cutaneous and percutaneous toxicology». Presented at the 11th Annual Symposium Canadian Association for Research in Toxicology, Montreal, Quebec, December, 7, 8.
- 6 **Elias, P.S. (1978):** «General guidelines for the toxicological evaluation of chemical substances», Commission, Doc. n° V/F/1/78/26, April, Luxembourg.
- 7 **Green, H. (1979):** «The keratinocyte as differentiated cell type». *The Harvey Lectures*, series 74, pp. 101-139.
- 8 **Hucker, H.B. (1970):** «Species differences in drug metabolism». *Ann. Rev. Pharmacol.*, 10, 99.
- 9 **Organisation for Economic Co-operation and Development (1981):** «OECD Guidelines for Testing of Chemicals».
- 10 **Paganuzzi Stammati, A., Silano, V. and Zucco, F. (1981):** «Toxicology investigations with cell culture systems». *Toxicology*, 20, 91.
- 11 **Quinn, G.P., Axelrod, J. and Brodie, B.B. (1958):** «Species, strain and sex differences in metabolism of hexobarbitone, amidopyrine, antipyrine and aniline». *Biochem. Pharmacol.*, 1, 152.
- 12 **Weisburger, H.H., Grantham, P.H. and Weisburger, E.R. (1964):** «Metabolism of N-2-fluorenylacetamide in the hamster». *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 6, 427.
- 13 **Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. (1981):** «Significance of the LD₅₀-Test for the Toxicological evaluation of Chemical Substances». *Arch. Toxicol.* 47, 77.

OTHER CONSULTED BOOKS

- 1 **Drill, V.A., Lazar, P. (1977),** Eds., «Cutaneous Toxicity», *Academic Press Inc.*, New York, San Francisco, London.
- 2 **Drill, V.A., Lazar, P. (1980),** Eds., «Current Concepts in Cutaneous Toxicity», *Academic Press Inc.*, New York, London, Sydney, Toronto, San Francisco.
- 3 **Maibach, H. (1975),** Éd., «Animal Models in Dermatology», Churchill, Livingstone, Edinburgh, London and New York.
- 4 **Marzulli, F.N., Maibach, H.I. (1977),** Eds., «Dermatotoxicology and Pharmacology», in: «*Advances in Modern Toxicology*», Vol. 4, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, London, a Halsted Press Book, John Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto.
- 5 **Pruniéras, M. (1981),** «Précis de Cosmétique Dermatologique», Masson.

