



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



Giornata INT.E.G.R.A. :
test di corrosività cutanea *in vitro*
OECD 435 «Corrositex®»



Isabella Facchini, 2024





INTE.G.R.A.[®]

Determinazione della corrosività chimica con Corrositex

**Docenti: Isabella Facchini
Leo Salvi**



Elenco degli Argomenti

- *Quadro normativo di riferimento*
- *La Classificazione delle Materie Corrosive ai sensi del CLP*
- *La determinazione della Corrosività con Corrositex*

Quadro normativo di riferimento

CLP e REACH costituiscono i “pilastri” del corpus normativo comunitario sui Chemicals:

- *CLP (EC Regulation n. 1272/2008) definisce i criteri per la classificazione, etichettatura e imballaggio di sostanze e miscele (pericolose).*
- *REACH (EC Regulation n. 1907/2006) definisce le procedure da seguire per la fabbricazione delle sostanze e le modalità per trasferire informazioni all’interno della catena di approvvigionamento.*

I due sistemi sono fortemente interconnessi



Regolamento CLP

*Classificazione, imballaggio, etichettatura di
sostanze e miscele*

**CLP – Classification,
Labelling and Packaging of
substances and mixtures**



CLP: alcune definizioni

- *Classe di pericolo*

natura/tipo del pericolo

- *Differenziazione*

via di esposizione o tipo di effetto

- *Categoria di pericolo*

“entità” del pericolo

- *Es. tossicità acuta*

- *Via cutanea*
- *Via orale*
- *Via inalatoria*

- *Categoria 1*
- *Categoria 2*
- *Categoria 3*
- *Categoria 4*

Classi di pericolo		Categorie di pericolo				
3.1	Tossicità acuta orale	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
	Tossicità acuta dermica	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
	Tossicità acuta inalatoria	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
3.2	Corrosione/irritazione della pelle	Categoria 1			Categoria 2	Categoria 3
		Sotto-categoria 1A	Sotto-categoria 1B	Sotto-categoria 1C		
3.3	Gravi lesioni oculari/irritazione oculare	Categoria 1			Categoria 2/2A	Categoria 2B
3.4	Sensibilizzazione delle vie respiratorie o della pelle	Categoria 1				
		Sotto-categoria 1A	Sott-categoria 1B			
3.5	Mutagenicità sulle cellule germinali	Categoria 1A	Categoria 1B	Categoria 2		
3.6	Cancerogenicità	Categoria 1A	Categoria 1B	Categoria 2		
3.7	Tossicità per la riproduzione	Categoria 1A	Categoria 1B	Categoria 2	Allattamento	
3.8	Tossicità specifica per organi bersaglio (esposizione singola)	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3		
3.9	Tossicità specifica per organi bersaglio (esposizione ripetuta)	Categoria 1	Categoria 2			
3.10	Pericolo in caso di aspirazione	Categoria 1	Categoria 2			

Pericoli per la Salute

Recepite da CLP
Non recepite da CLP

Corrosione/irritazione: tabella 3.2.5

Classificazione	Sottocategorie 1A/1B/1C e categoria 1	Categoria 2
Pittogrammi GHS		
Avvertenza	Pericolo	Attenzione
Indicazione di pericolo	H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari	H315: Provoca irritazione cutanea

Corrosione/irritazione della pelle

Classi di pericolo		Categorie di pericolo			
3.2	Corrosione/irritazione della pelle	Categoria 1			
		Sottocategoria 1A	Sottocategoria 1B	Sottocategoria 1C	Categoria 2

La **Categoria 1** viene assegnata se i dati non bastano per classificare in una sottocategoria.

Categoria e sottocategorie di corrosione della pelle

Categoria	Criteri
Categoria 1 ⁽¹⁾	Distruzione del tessuto cutaneo, ossia una necrosi visibile dell'epidermide e del derma, in almeno un animale saggiato dopo un'esposizione ≤ 4 h
Sottocategoria 1A	Reazioni corrosive in almeno un animale dopo un'esposizione ≤ 3 min durante un periodo di osservazione ≤ 1 h
Sottocategoria 1B	Reazioni corrosive in almeno un animale dopo un'esposizione > 3 min e ≤ 1 h e un periodo di osservazione ≤ 14 giorni
Sottocategoria 1C	Reazioni corrosive in almeno un animale dopo un'esposizione > 1 h e ≤ 4 h e un periodo di osservazione ≤ 14 giorni

⁽¹⁾ Cfr. le condizioni per l'utilizzo della categoria 1 nel paragrafo a) del punto 3.2.2.

Categoria di irritazione della pelle ^(*)

Categoria	Criteri
Irritazione (categoria 2)	1) Valore medio $\geq 2,3$ e $\leq 4,0$ per eritema/escara o edema in almeno due dei tre animali saggiati a 24, 48 e 72 ore dalla rimozione del cerotto o, in caso di reazioni ritardate, nel corso di un periodo di osservazione di tre giorni consecutivi dopo la comparsa delle reazioni cutanee, oppure
	2) infiammazione persistente fino alla fine del periodo di osservazione (normalmente 14 giorni) in almeno due animali (in particolare alopecia locale, ipercheratosi, iperplasia e desquamazione), oppure
	3) quando le reazioni variano fortemente da un animale all'altro, effetti positivi molto netti in relazione a un'esposizione chimica in un solo animale, ma di minore entità rispetto ai criteri di cui sopra.

^(*) I criteri di classificazione sono da intendersi come descritti nel regolamento (CE) n. 440/2008.



Allegato I CLP: valori soglia generici

I valori soglia indicano quando la presenza di una sostanza deve essere presa in considerazione ai fini della classificazione di una sostanza o di una miscela contenente tale sostanza pericolosa, sia essa in forma di impurezza identificata, di additivo o di singolo costituente (vedasi l'articolo 11).

Tabella 1.1

Valori soglia generici

Classe di pericolo	Valori soglia generici da prendere in considerazione	Classe di pericolo	Valori soglia generici da prendere in considerazione
Tossicità acuta:		Nocivo per l'ambiente acquatico	
— Categoria 1-3	0,1 %	— tossicità acuta 1, categoria 1	0,1 % ⁽³⁾
— Categoria 4	1 %	— tossicità cronica, categoria 1	0,1 % ⁽³⁾
Corrosione/irritazione della pelle	1 % ⁽¹⁾	— tossicità cronica, categorie 2-4	1 %
Gravi danni oculari/irritazione oculare	1 % ⁽²⁾		

⁽¹⁾ O < 1 % se pertinente, cfr. 3.2.3.3.1.

⁽²⁾ O < 1 % se pertinente, cfr. 3.3.3.3.1.

⁽³⁾ O < 0,1 % se pertinente cfr. 4.1.3.1.



Additività

*Se la **somma delle concentrazioni** delle diverse sostanze presenti in una miscela è pari o superiore al limite di concentrazione (GCL) previsto per una specifica classe di pericolo/categoria, la **miscela deve essere classificata** per quel pericolo. **Nel caso di sostanze con SCL questi devono essere presi in considerazione nel metodo della somma.***

If the sum of $(\text{ConcA} / \text{clA}) + (\text{ConcB} / \text{clB}) + \dots + (\text{ConcZ} / \text{clZ})$ is ≥ 1 then the mixture needs to be classified for the hazard class in question.

Where ConcA = the concentration of substance A in the mixture;

clA = the concentration limit (either specific or generic) for substance A;

ConcB = the concentration of substance B in the mixture;



Regola del pH estremo

3.2.3.1. *Classificazione quando esistono dati sulla miscela in quanto tale*

3.2.3.1.1. La miscela è classificata in base ai criteri utilizzati per le sostanze, tenendo conto delle strategie di prova e di valutazione applicate per ottenere dati relativi a queste classi di pericolo.

3.2.3.1.2. Diversamente da quanto avviene per altre classi di pericolo, per certi tipi di sostanze e miscele esistono test di corrosività cutanea, semplici e relativamente poco costosi, che permettono una classificazione precisa. Per i test da effettuare sulle miscele, è da preferire una strategia per tappe successive basata sulla forza probante dei dati, come quella che fa parte dei criteri di classificazione delle sostanze come corrosive e irritanti per la pelle (punto 3.2.2.5), in modo da ottenere una classificazione esatta ed evitare inutili test su animali. Una miscela è considerata corrosiva per la pelle (corrosiva per la pelle categoria 1) se il suo pH è pari o inferiore a 2 o pari o superiore a 11,5. Se la riserva acida-alcalina lascia supporre che la sostanza o miscela in questione non sia corrosiva, nonostante un pH basso o elevato, sono effettuate ulteriori prove per ottenere dati di conferma, di preferenza ricorrendo a un saggio in vitro appropriato e convalidato.

Corrosione/irritazione: tabella 3.2.5

Classificazione	Sottocategorie 1A/1B/1C e categoria 1	Categoria 2
Pittogrammi GHS		
Avvertenza	Pericolo	Attenzione
Indicazione di pericolo	H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari	H315: Provoca irritazione cutanea

Il Trasporto Delle Merci Pericolose



CLASSIFICAZIONE DELLE MATERIE PERICOLOSE AI FINI DEL TRASPORTO

La corretta classificazione di una merce od un preparato pericoloso è di importanza fondamentale dato che si tratta del primo passo all'interno del mondo "trasporto delle merci pericolose".

Sulla base della classificazione vengono infatti determinate:

- *la tipologia di trasporto e le tipologie di imballaggi utilizzabili per il trasporto in colli;*
- *le indicazioni di pericolo, le modalità di stivaggio e di segregazione;*
- *le informazioni e i documenti da dare ai trasportatori, operatori ed autorità.*

CLASSI DI PERICOLO

1 Materie ed oggetti esplosivi

2 Gas

3 Liquidi infiammabili

4.1 Solidi infiammabili, materie autoreattive, materie soggette a polimerizzazione ed esplosivi solidi desensibilizzati

4.2 Materie soggette ad accensione spontanea

4.3 Materie che, a contatto con l'acqua, sviluppano gas infiammabili

5.1 Materie comburenti

5.2 Perossidi organici

6.1 Materie tossiche

6.2 Materie infettanti

7 Materiali radioattivi

8 *Materie corrosive*

9 Materie ed oggetti pericolosi diversi

Classificazione delle miscele cosa dice il CLP?

*In generale, la classificazione delle miscele come corrosive o irritanti per la pelle nel caso in cui siano disponibili dati sui componenti, ma non sulla miscela in quanto tale, si fonda sulla **teoria**.*

*Occorre particolare cautela nella classificazione di alcuni tipi di miscele contenenti **sostanze come acidi, basi, tensioattivi**. Tale approccio può non essere applicabile.*

Classificazione delle miscele cosa dice il CLP?

Per le miscele contenenti acidi o basi forti si usa come criterio di classificazione **il pH**, che è un indicatore di corrosione cutanea migliore rispetto ai limiti di concentrazione che determinano la classificazione della miscela come corrosiva/irritante per la pelle e ai quali si applica la regola dell'additività

In mancanza di altre informazioni, si ritiene che una miscela sia corrosiva per la pelle (corrosione della pelle — categoria 1) se il suo pH è **≤ 2 o $\geq 11,5$** . Se tuttavia la riserva acida/alcalina indica che la miscela in questione potrebbe non essere corrosiva, nonostante il pH basso o elevato, è necessario ottenere dati di conferma, di preferenza ricorrendo a un **adeguato test in vitro convalidato**.

Determinazione della corrosività chimica con Corrositex

Il test è basato sulla determinazione del tempo che è richiesto alle sostanze in esame per passare attraverso una biobarrierasintetica (una matrice di collagene ricostituito, e sviluppata per avere proprietà fisico-chimiche simile alla pelle in situ), e determinare un cambiamento percepibile ad occhio nudo nel sistema rivelatore del kit

8



Regolamento (UE) 2019/1390 – la corrosione

Latest update	Test Method	Validation status, regulatory acceptance	EU tested method/ OECD Test Guideline	Classification according to CLP Regulation	EURL ECVAM DB-ALM protocol number
2015	TER	Validated and regulatory acceptance	B.40*/TG 430	Cat. 1 or Non-corrosive	115
2019	EpiDerm™ SCT (EPI-200)	Validated and regulatory acceptance	B.40bis*/TG 431	Cat.1, 1A, 1B/1C or non-corrosive	119
2019	EpiSkin™ (SM)	Validated and regulatory acceptance	B.40bis*/TG 431	Cat.1, 1A, 1B /1C or non-corrosive	118
2019	SkinEthic™ RHE	Validated and regulatory acceptance	B.40bis*/TG 431	Cat.1, 1A, 1B/1C or non-corrosive	188
2019	epiCS®	Validated and regulatory acceptance	B.40bis*/TG 431	Cat.1, 1A, 1B/1C or non-corrosive	212
2019	LabCyte EPI-MODEL24 SCT	Validated and regulatory acceptance	B.40bis*/TG 431	Cat.1, 1A, 1B/1C or non-corrosive	-
2015	Corrositex®	Validated and regulatory acceptance	B.65/TG 435	Cat.1, 1A, 1B and 1C or non-corrosive	116

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS***In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion**

3. Validation studies have been completed for the *in vitro* membrane barrier test method commercially available as Corrositex[®] (6)(7)(8), showing an overall accuracy to predict skin corrosivity of 79% (128/163), a sensitivity of 85% (76/89), and a specificity of 70% (52/74) for a database of 163 substances and mixtures (7). Based on its acknowledged validity, this validated reference test method (VRM) has been recommended for use as part of a tiered testing strategy for assessing the dermal corrosion hazard potential of chemicals (5) (7). Before an *in vitro* membrane barrier test method for skin corrosion can be used for regulatory purposes, its reliability, relevance (accuracy), and limitations for its proposed use should be determined to ensure that it is similar to that of the VRM (9), in accordance with the pre-defined performance standards (PS) (10). The Mutual Acceptance of Data will only be guaranteed after any proposed new or updated test method following the PS of this Test Guideline have been reviewed and included in this Test Guideline. **Currently, only one *in vitro* test method is covered by this Test Guideline, the commercially available Corrositex[®] test method.**

4. Other test methods for skin corrosivity testing are based on the use of reconstituted human skin (OECD TG 431) (3) and isolated rat skin (OECD TG 430) (4). **This Test Guideline also provides for subcategorisation of corrosive chemicals into the three UN GHS Sub-categories of corrosivity and the three UN Transport Packing Groups for corrosivity hazard.** This Test Guideline was originally adopted in 2006 and updated in 2015 to refer to the IATA guidance document and update the list of proficiency substances.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede l'utilizzo di una membrana artificiale destinata a reagire alle sostanze chimiche corrosive in modo analogo alla cute.



PRINCIPIO DEL METODO

Proprietary biomembrane

Collagen gel

Cellulose membrane



La membrana artificiale impermeabile è costituita da due elementi: un gel acquoso macromolecolare proteico e una membrana di supporto.

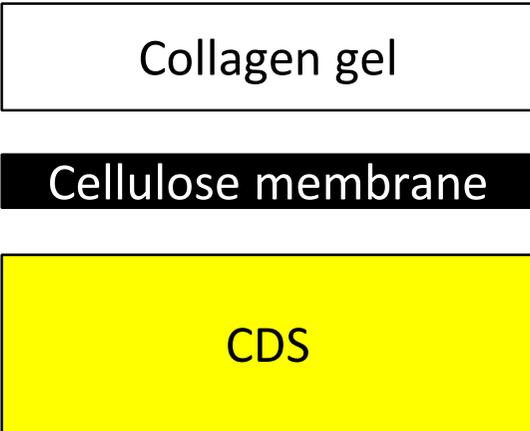
PRINCIPIO DEL METODO **Chemical Detection System (CDS)**



Il CDS è una soluzione a pH neutro composta da acqua e da due indicatori di pH colorati, uno acido ed uno basico, che determinano un cambiamento di colore del CDS se il pH di questa soluzione scende sotto 4.5 o supera 8.5 in presenza sostanza chimica in esame

PRINCIPIO DEL METODO

1



2



3



PRINCIPIO DEL METODO



Il momento in cui un cambiamento di colore viene osservato viene registrato manualmente, ed il tempo medio di penetrazione attraverso la biobarriera di 4 repliche della sostanza in esame viene utilizzato per:

- 1. Determinare se tale sostanza è corrosiva*
- 2. La sottocategorizzazione delle sostanze corrosive nelle 3 sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema UN GHS*
- 3. e nei 3 gruppi d'imballaggio per il trasporto (UN Packing Group) per quanto concerne il rischio di corrosività*



CONSIDERAZIONI INIZIALI

- 1. Il metodo può essere utilizzato per testare solidi (solubili o insolubili in acqua), liquidi (acquosi o non acquosi) ed emulsioni,*
- 2. Le sostanze in esame che non causano un cambiamento rilevabile nel sistema di rilevamento chimico (Chemical Detection System -CDS) non possono essere sottoposte a prova con il metodo della membrana,*
- 3. Le sostanze acquose aventi un pH compreso tra 4,5 e 8,5 spesso non sono adatte alla prova,*

Corrositex®



Corrositex®



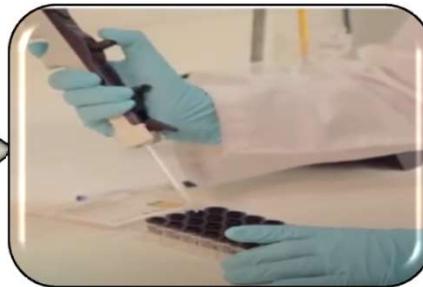
Corrositex® Protocollo



**Qualifica della sostanza
in esame**



**Categorizzazione della
sostanza in esame**



**Preparazione delle
biobarriera**



Classificazione

Corrositex® Protocollo

Interpretazione dei risultati e classificazione di corrosività della sostanza chimica in esame

	Corrositex Time (minutes)			
Corrositex Category 1	0 to 3 min.	>3 to 60 min.	>60 to 240 min.	>240 min.
Corrositex Category 2	0 to 3 min.	>3 to 30 min.	>30 to 60 min.	>60 min.

UN Packing Group	Packing Group I	Packing Group II	Packing Group III	Non-corrosive
GHS Skin Corrosion Category	GHS Skin Corrosion Category 1			
GHS Skin Corrosion Sub-categories	Sub-category 1A	Sub-category 1B	Sub-category 1C	

Conclusioni

Il Corrositex® consente:

- 1. Determinare se tale sostanza è corrosiva,**
- 2. La sottocategorizzazione delle sostanze corrosive nelle 3 sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema UN GHS ,**
- 3. e nei 3 gruppi d'imballaggio per il trasporto (UN Packing Group) per quanto concerne il rischio di corrosività,**
- 4. È necessaria solo una piccola area di lavoro, semplice strumentazione in dotazione ad un qualsiasi laboratori,**
- 5. E' un test di rapida esecuzione (una analisi non richiede più di 4 ore per essere portata a termine)**
- 6. Un solo operatore può effettuare diverse prove al giorno (il formato dei kit è da 1, 2 e 4 campioni)**

Conclusioni

L'utilizzo di Corrositex® offre alle aziende un maggiore controllo sui propri prodotti.

Ci sono due modi in cui è possibile utilizzare Corrositex®:

- 1. Il campione del prodotto può essere inviato ai laboratori INT.E.G.RA. dove il loro team altamente qualificato può effettuare le analisi***
- 2. oppure l'azienda può acquistare i kit Corrositex® ed eseguire i test presso la propria struttura.***

Grazie per l'attenzione

INTE.G.RA.®

INTE.G.RA s.r.l

Via Unità d'Italia 15, Sestri Levante (GE)

www.integracosmetics.com

info@integracosmetics.com



Corrositex® Protocollo



Qualifica della sostanza in esame



Corrositex® Protocollo



Categorizzazione della sostanza in esame



Corrositex® Protocollo



Categorizzazione della sostanza in esame

	Corrositex Time (minutes)			
Corrositex Category 1	0 to 3 min.	>3 to 60 min.	>60 to 240 min.	>240 min.
Corrositex Category 2	0 to 3 min.	>3 to 30 min.	>30 to 60 min.	>60 min.

Corrositex® Protocollo



Preparazione della biobarriera



Corrositex® Protocollo



Classificazione

