



Valutazione *in vitro* del fattore di protezione solare di un prodotto cosmetico secondo il metodo di Diffey (Report Completo)

***In vitro* evaluation of sunscreen protection factor of a cosmetic product according to Diffey method (Complete Report)**

Premessa / Preliminary

Si tratta di un test spettrofotometrico per la determinazione dell' SPF *in Vitro* eseguito sul cosmetico. I risultati del test sono presentati in seguito ad una elaborazione statistica e matematica sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolezza di interpretazione.

Viene descritto in sintesi il protocollo sperimentale.

Questo tipo di studio viene condotto in stretta osservanza delle norme di Buona Pratica di Laboratorio (GLP).

This is a spectrophotometric test SPF *in vitro* of the cosmetic product. The test results are presented, after statistical and mathematical elaboration, in a concise table format for easy interpretation.

This presentation describes the study's design, including materials and procedures.

The present study is carried out in strict compliance to *Good Laboratory Practice* (GLP) guidelines.

Sommario/Summary

PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN

SCOPO DEL TEST /AIM OF THE TEST

ESECUZIONE DEL TEST/ASSY PROCEDURES

Materiali adottati / Materials

Preparazione del campione /Preparations of the samples

Protocollo di esecuzione del TEST /Execution protocol of test

Calcolo del fattore di protezione solare (SPF) / Sun Protector factor reating

Calcolo della lambda Critica / Broad spectrum rating

Sistema di classificazione in base al rapporto UVA/UVB / Boots star rating system

UVA/UVB ratio

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

Integrazione di Esperienze per la Gestione e Razionalizzazione INT.E.G.R.A. Sr.l.

Sede operativa - laboratorio: 20056 Via G. Pastore, 3 Trezzo Sull'Adda (MI) Italy

Sede legale: 20123 C.so Magenta, 81 Milano – Cap. sociale: 12.000 Euro

Tel. +39 02.90.92.95.69 Fax +39 02.92.09.23.82 E-mail: info@cosmeting.it WWW.cosmeting.it

P. IVA: 13201890152



Protocollo sperimentale/Study design

Scopo del test /Aim of the test

Lo studio qui descritto riguarda la valutazione di funzionalità di un prodotto cosmetico protettivo solare, tramite l'impiego di tecniche spettrofotometriche, .

Il test "in vitro" qui descritto consente di verificare strumentalmente il fattore di protezione solare (SPF) di un prodotto cosmetico in accordo alla metodica di Diffey (1, 2, 3). Consente inoltre di valutare la Lambda critica (λ_c) del prodotto in questione e di attribuire al prodotto un grado di protezione in base al rapporto UVA/UVB in accordo con la scala di Boots (λ_c).

L'applicazione del prodotto sul substrato simula le condizioni utilizzate per il test SPF *in vivo* sia per quanto riguarda la quantità da applicare sia per l'interazione con il substrato, consentendo di ottenere risultati predittivi del test *in vivo*.

Questo test non è comunque da considerarsi sostitutivo al test per la determinazione dell'SPF di un prodotto finito eseguito su volontari umani.

Il parametro denominato "*lambda critica*" ha un importante significato sperimentale poiché ci fornisce una chiara indicazione sull'efficacia protettiva del prodotto solare nei confronti dei raggi UV-A (320-400), in maniera indipendente dal valore di SPF.

I raggi UVA si possono dividere in UVA- I (340-400) e UVA- II (320-340).

Agli UVA I è attribuito un potere eritematogeno più elevato rispetto agli UVA II (6) e secondo studi di biologia molecolare (7,8) risulta che la parte di spettro ad azione eritematogena si sovrappone allo spettro che causa i danni al DNA (9,10) e allo spettro capace di indurre tumori della pelle di origine non melanomica nel topo e nell'uomo (11). Inoltre i danni causati alla pelle dall'UVA, che si accumulano nel tempo, sono i principali responsabili del fotoinvecchiamento e dell'elastosi solare.

Considerando infine che la radiazione incidente è composta per il 90% dall'UVA, si capisce l'importanza che riveste la protezione ad ampio spettro per la prevenzione del fotoinvecchiamento e della cancerogenesi cutanea.

La determinazione del rapporto tra l'assorbanza UVA e l'assorbanza UVB è anch'esso, come la lambda critica, un parametro in buona misura indipendente dal valore di SPF che ci fornisce una chiara indicazione sull'efficacia protettiva del prodotto solare nei confronti dei raggi UVA (320-400). Rappresenta inoltre un indice del bilanciamento protettivo della formulazione cosmetica e quindi dei rapporti di concentrazione ed efficienza dei filtri solari fisici e organici nell'intero spettro.

The evaluation of the ratio between the UVA and UVB absorbance, as the critical lambda, is a parameter, largely independent from the SPF value, that give us a reliable measure of the product's broad-spectrum protection from UVA rays (320-400). Furthermore it is an index of the cosmetic formulations' balanced protection and even of the ratio of organic and physic sun filter's concentration and efficiency in the broad-spectrum.

Non solo ma la classificazione a numero di stelle crescenti corrispondente a un incremento relativo della protezione degli UVA rispetto agli UVB in uso nel Regno Unito (14) ci permette collocare il cosmetico in esame nella seguente tabella:

At also the star category, a classification used in U. K. , where the increasing stars' number is



related to an protection increment by UVA on UVB, let us to classify the tested product in the following table:

UV-A waveband can be divided into UVA I (320-340) and UVA II (340-400).

UVA I are more powerful erythema-inducing rays than UVA II (6) and from molecular biological studies (7,8) results that the spectrum able to cause erythema nearly matches with the spectrum able to induce DNA damages (9,10) and non-melanoma skin tumors in mice and humans (11).

The application of the product on the substrate simulates the *in vivo* application in SPF testing both for the quantity of product and for its interaction with the substrate and can predict the *in vivo* SPF with good reliability

This test in any case can not replace the *in vivo* test on human volunteers to determinate the SPF value of a sun product.

La λ Critica è il miglior parametro strumentale disponibile per valutare la reale protezione agli UVA fornita da un prodotto topico. Non esistono infatti ancora metodi ufficiali validati e standardizzati per la misura della protezione UVA *in vivo* su soggetti umani, vista la variabilità che tali misure mostrano in funzione della variabilità del fototipo e delle caratteristiche cutanee individuali (11,12,13).

The present study concerns the *in vitro* effectiveness evaluation of a sun protecting product, using spectrophotometric techniques. It allows to perform an instrumental control of the sunscreen protection factor of a cosmetic product according to the standard Diffey method (1, 2, 3).

The parameter called "*critical wavelength*" has a relevant experimental meaning because it provides a reliable measure of the product's UVA protection towards UV-A rays (320-400), independently from its SPF value.

The evaluation of Critical wavelength can be considered a reliable measure to evaluate the real UVA protection of the cosmetic product.

Several *in vivo* method using human subjects (12) can not be predictive to UVA induced carcinogenesis and photo-aging.

Following same authors "the limitations of *in vivo* test is due to the absence of an endpoint measure that is a true surrogate marker for UVA-induced skin damage not skin-type dependent"(13).



Esecuzione del test/Assay procedures

Materiali adottati / Materials:

Il substrato scelto per il test è un nastro Transpore 3M, sufficientemente trasparente alla luce ultravioletta, in grado di simulare la porosità e la texture dell'epidermide umana.

Le determinazioni strumentali della trasmittanza UV sono state condotte utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS Mod. Lambda 35 della Perkin Elmer, munito di un banco ottico a doppio raggio, e di doppia sorgente (lampada al Deuterio per l'intervallo spettro UV e lampada al Tungsteno per l'intervallo spettrale visibile).

The substrate is a surgical tape 3M Transpore fairly transparent to the ultraviolet and able to simulate the porosity and texture of human skin.

The measure of UV transmittance is carried with a Perkin Elmer Lambda 35 Spectrophotometer with double beam and double light sources (deuterium lamp for the UV spectrum and a tungsten lamp for the visible wavelengths)

Preparazione del campione /Preparations of the samples

Il protocollo Diffey utilizza per il test il prodotto cosmetico tal quale senza alcun pretrattamento. L'intensità del raggio di luce spettrofotometrico non espone il campione ad una dose luminosa eccessiva, mantenendo così l'analisi spettrofotometrica indipendente da problemi di fotostabilità.

Il campione viene spalmato uniformemente sul supporto (superficie trattata 7,5cm²), in modo tale che la lunghezza del percorso ottico attraverso il campione sia costante in ogni punto della superficie trattata del nastro.

Viene effettuato un controllo visivo del supporto dopo aver applicato il prodotto e un controllo gravimetrico con una bilancia analitica a 4 cifre decimali (risoluzione 0,1 mg) per valutare la quantità totale deposta e lo spessore dello strato di prodotto.

The cosmetic product does not undergo any preliminary treatment.

The intensity of spectrophotometric light ray is not so intense to damage the sample avoiding photo-stability problems

The sample is applied on the support surface (treated area 7,5 cm²) to obtain a constant thickness so that the length of the beam pathway through the sample can be considered omogeneous in each point .

A visual control as well as a gravimetric control (analytical balance with 0.1 mg resolution) of the product spread of the tape is made before the measure.



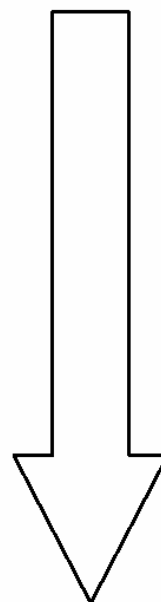
DISTRIBUIRE IL PRODOTTO SUL SUPPORTO
IN QUNTITA PREDETERMINATA

EFETTUARE ALMENO QUATTRO SCANSIONI IN PUNTI
DIFFERENTI DELLA SUPERFICIE TRATTATA

RIPETERE LA PROVA IN TRIPLO

ELABORAZIONE STATISTICA DEI RISULTATI PER OTTENERE
UNA TRASMITTANZA MEDIA

ELABORAZIONE MATEMATICA E GRAFICA



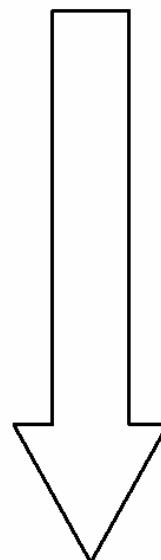
DISTRIBUTE THE PRODUCT ON THE TAPE IN A
PREDETERMINATE QUANTITY

MAKE AT LAST FOUR SCANNING ON
DIFFERENT POINTS OF THE SAMPLE

REPEAT 3 TIMES THE TEST

STATISTIC ELABORATION OF RESULT TO CALCULATE
A MEDIUM TRANSMITTANCE

MATHEMATIC AND GRAFIC ELABORATIONS





Calcolo del fattore di protezione solare (SPF) / Sun Protector factor reating

Il protocollo utilizzato misura la trasmittanza dello spettro UV tra i 290nm ed i 400nm.

Il fattore di protezione monocromatico (PF) a una determinata lunghezza d'onda (λ), è dato dal rapporto tra il valore di trasmittanza del supporto (T_B) e il valore di trasmittanza del campione (T_C) misurato alla stessa λ .

The present protocol measures the spectral transmittance in the range between 280nm-400nm. The monochromatic protection factor (PF) at a defined wavelengths (λ) is given by the ratio between the transmittance value of the tae (T_B), and the transmittance value of the product (T_C) at the same λ .

$$PF = T_B / T_C$$

Il fattore di protezione solare è poi calcolato applicando la seguente formula:

The sun protection factor is calculated applying the following formula:

$$SPF = \frac{\sum_{290nm}^{400nm} E(\lambda)\epsilon(\lambda)}{\sum_{290nm}^{400nm} E(\lambda)\epsilon(\lambda) / PF(\lambda)}$$

dove $E(\lambda)$ e $\epsilon(\lambda)$ sono delle costanti. $E(\lambda)$ rappresenta l'irradiazione spettrale solare in determinate condizioni ambientali (alle ore 12 estive ad una latitudine di 40°N e 70° sull'orizzonte), mentre $\epsilon(\lambda)$ è il risultato di una serie di costanti denominate "spettro ad azione eritematogena".

Ognuna di esse rappresenta l'effettiva dose di radiazione ad una specifica λ in grado di provocare una eritema sulla pelle umana. (8).

where $E(\lambda)$ e $\epsilon(\lambda)$ are constants. $E(\lambda)$ is the spectral irradiance of earth sunlight under defined environmental conditions (12 a.m. in summer at a latitude of 40° and 70° on the sunset) while $\epsilon(\lambda)$ is a group of constants called "erythema action spectrum". Each one of them acts as the effective dose of radiation at a specific λ able to cause erythema on human skin (8).



Calcolo della lambda Critica / Broad spectrum rating

La Lambda Critica del prodotto è la lunghezza d'onda in corrispondenza della quale l'area della curva di assorbanza spettrale rappresenta il 90% dell'assorbanza totale. Per ogni lunghezza d'onda λ viene misurato il rapporto R definito come segue:

The Critical Wavelength is the wavelength where the integral of the spectral absorbance curves reaches 90% of the integral from 290 to 400 nm. For each wavelength λ the ratio is measured as it follows:

$$R = \frac{\int_{290nm}^{\lambda_c} A_{\lambda} d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} A_{\lambda} d\lambda}$$

La lunghezza d'onda critica, λ_c , è il valore di λ per cui risulta $R = 0,9$.

La protezione UVA misurata è basata esclusivamente sull'ampiezza dello spettro di assorbanza e dipende unicamente dal coefficiente di estinzione dei filtri solari.

Il livello di protezione UVA è dato dal valore della λ_c secondo la seguente definizione

The critic wavelength, λ_c , is the first value of λ for which result $R = 0,9$.

UVA protection is measured on the spectrum of absorbance and it depends only on the coefficient of extinction of sun filters.

The UVA protection level is related with the λ_c value as follows:

se $\lambda_c > 370$ nm il prodotto offre una protezione ad ampio spettro

If $\lambda_c > 370$ nm the product's protection level is broad spectrum



nota:

L' FDA accetta provvisoriamente (in attesa della definizione di un metodo ufficiale) che un prodotto dichiari una protezione verso l'UVA se dimostra di possedere una $\lambda_c > 360\text{nm}$.

For the time being (until an official method will be approved) the FDA accepts that a product claims a UVA protection if it proves to have a $\lambda_c > 360\text{nm}$.

Sistema di classificazione in base al rapporto UVA/UVB / Boots star rating system UVA/UVB ratio

In questo sistema di classificazione si valuta il rapporto tra l'assorbimento totale nell' UVA e quello nell' UVB (aUVA/aUVB), secondo la seguente relazione:

In this classification scheme, we evaluate the ratio between the UVA and UVB absorbance in accordance with the following formula:

$$\frac{aUVA}{aUVB} = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} A_{\lambda} d\lambda}{\int_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} A_{\lambda} d\lambda}$$

In base al risultato il prodotto viene classificato secondo lo schema di interpretazione qui riportato:

On the bases of the result the product is classified according to the following scheme:

CLASSIFICAZIONE IN STELLE DI BOOTS / BOOTS STAR CATEGORY

Ratio UVA/UVB	Stelle/stars	Descrizione delle categorie Categories description
< 0.2	-	Troppo basso per proporre il prodotto con protezione UVA/ Too low to claim UVA protection
0.2 - 0.4	*	Moderata / Moderate
0.4 - 0.6	**	Buona / Good
0.6 - 0.8	***	Elevata / Superior
> 0,8	****	Massima / Maximum

Integrazione di Esperienze per la Gestione e Razionalizzazione INT.E.G.R.A. Sr.l.

Sede operativa - laboratorio: 20056 Via G. Pastore, 3 Trezzo Sull'Adda (MI) Italy

Sede legale: 20123 C.so Magenta, 81 Milano – Cap. sociale: 12.000 Euro

Tel. +39 02.90.92.95.69 Fax +39 02.92.09.23.82 E-mail: info@cosmeting.it WWW.cosmeting.it

P. IVA: 13201890152



Bibliografia/Bibliography

1. Stokes and Diffey BL *Int. J. of Cosm. Science*, 1999 21: 341-351
2. AAVV: "Guida all'analisi dei filtri solari nei prodotti cosmetici" Quaderno 23, Unipro 1989
3. Cosm. Technol 2002, n°5(3) 21-25 " Ottimizzare lo sviluppo con le Valutazioni strumentali"
4. 'AAVV I filtri solari nei prodotti cosmetici GCF Gruppo Cosmetici Farmacia, Unipro, Milano, 2001.
5. Picardo M, Bocchietto E; Callegari E, Pecis L. "Nuove frontiere nel campo della fotoprotezione" Congresso Sidev-ADOI Roma, Giugno 2001
6. Urbach, F *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*, Valdenmar Publishing, Overland Park, Kansas, 1992:1-6.
7. Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. "Erythema and melanogenesis action spectra of a normal human skin". *Photochem Photobiol* 1982, 36:187-92.
8. McKinaly AF, Diffey BL "A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin". *Photochem Photobiol* 1982, 36:187-92.
9. Hacham H, Freeman SE, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC, Sutherland BM. "Do pyrimidine diimer yields correlate with erythema induction in human skin irradiated in situ with ultraviolet light (275-365nm)" *Photochem Photobiol* 1991, 53:559-63.
10. Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Nikaïdo O, Ramsdem J, Potten CS. "The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggest that DNA is the chromophore for erythema". *J Invest Dermatol* 1998, 111:982-88.
11. De Gruïjl FR, Van der Leun JC. "The wavelength dependence of ultraviolet carcinogenesis in human and its relation to risk assessment of stratospheric ozone depletion". *Health Physics* 1995, 67:317-29.
12. Kaidbey K, Gange RW. "Comparison of methods for assessing photoprotection against ultraviolet A in vivo." *J Am Acad Dermatol* 1997, 16:346-353.
13. Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, and Nash F. "In vitro Assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of Sunscreen Products" 2003 in press
14. AAVV "La valutazione dell'efficacia dei prodotti solari" a cura del Consorzio Uniservice, Comitato piccole e medie imprese, Unipro, Milano, Maggio 2001.