

**REPORT METODO ISO 11993-5:2009
BIOLOGICAL EVALUATION “in vitro”:
cytotoxicity test**

**RAPID BRONZ
COD. 013729 LOTTO 259612**

**Valutazione “in vitro” della valutazione biologica:
Prova di citotossicità in base al metodo
UNI EN ISO 11993-5**

RAPID BRONZ

INTRODUZIONE

UNIENISO 10993-5 2009.

La presente parte della ISO 10993-5 descrive i metodi di prova per valutare la citotossicità “in vitro” dei prodotti che vengono a contatto con la cute umana oppure che devono essere applicati sulla cute o mucosa umana, consente di determinare l’eventuale effetto citotossico del prodotto in esame, impiegando specifiche colture cellulari coltivate “in vitro”.

Questo metodo specifica che il prodotto è posto ad incubare a diretto contatto con le cellule in coltura o tramite una tecnica di diffusione del prodotto in esame. Il protocollo di analisi è stato studiato per determinare la risposta biologica “in vitro” di colture cellulari composte da cellule di mammifero, utilizzando appropriati parametri biologici.

La determinazione della citotossicità può essere raggruppata in categorie a seconda del tipo di valutazione:

- a) valutazioni del danno cellulare tramite mezzi morfologici;
- b) misurazioni del danno cellulare;
- c) misurazioni della crescita cellulare;
- d) misurazioni di aspetti specifici del metabolismo cellulare.

CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME

Denominazione della formulazione in esame:

RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612

Cosmetico: emulsione

Condizioni di stoccaggio: Temperatura ambiente.

Data ricevimento campione: 07/01/2013

Periodo di Analisi: Data inizio del test: 10-01-2013 ÷ Data fine test 11-02-2013.

METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO

Il metodo di prova della norma ISO 10993-5 2009 riguarda la valutazione del potenziale irritante in vitro di un dispositivo medico solido su cellule di derivazione cutanea.

Il potenziale citotossico del prodotto da sottoporre a test a contatto diretto è stato valutato su linee cellulari di derivazione cutanea: fibroblasti umani.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT.

L'MTT è un sale di tetrazolio dal colore giallo, che ridotto dall'enzima succinato deidrogenasi forma un precipitato blue di formazano nei mitocondri delle cellule vitali. Il formazano precipitato è un indicatore della vitalità cellulare.

DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

La citotossicità è stata determinata qualitativamente e quantitativamente:

1) VALUTAZIONE QUALITATIVA consiste nell'esaminare le cellule al microscopio, utilizzando un colorante citochimico / vitale per osservare le eventuali alterazioni, quali morfologia, vacuolizzazione, distacco o lisi cellulare e integrità della membrana.

I risultati valutati sono stati interpretati in base alla scala di citotossicità seguente:

0 = Non citotossico

1 = Lievemente citotossico

2 = Moderatamente citotossico

3 = Gravemente citotossico

DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

La citotossicità è stata determinata qualitativamente e quantitativamente:

2) VALUTAZIONE QUALITATIVA consiste nell'esaminare le cellule al microscopio, utilizzando un colorante citochimico / vitale per osservare le eventuali alterazioni, quali morfologia, vacuolizzazione, distacco o lisi cellulare e integrità della membrana.

I risultati valutati sono stati interpretati in base alla scala di citotossicità seguente:

0 = Non citotossico

1 = Lievemente citotossico

2 = Moderatamente citotossico

3 = Gravemente citotossico

6.2-RISULTATI: TEST MTT Cellule Vero / VERO cells (= fibroblasts)

TABELLA 1: Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / Cell viability inhibition (%)

Spettrofotometro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione <i>/concentration mg/ml</i>	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i> Valori medi / <i>Mean</i>	IC ₅₀	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612			
Controllo positivo/ <i>Positive control: SDS 0.06 mg/ml</i>	0.458 0.408 0.403	< <u>0.5</u>	Citotossico / <i>Cytotoxic</i>
Controllo negativo <i>Negative control:: D-MEM</i>	2.246 2.290 2.200	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Colture cellulare / <i>cell culture</i>	-	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C1 1000 µg/ml	2.132 2.208 2.261	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C2 5000 µg/ml	1.910 1.937 1.887		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C3 10.000 µg/ml	1.990 1.962 1.964		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C4 20.000 µg/ml	1.820 1.891 1.921		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C5 50.000 µg/ml	1.520 1.591 1.521		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

ESITO:

Il campione in esame RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612 (si presenta NON CITOTOSSICO “in vitro”, in quanto non è stato osservato nessuna percentuale di inibizione cellulare dei fibroblasti Vero e quindi il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

6.3-RISULTATI: TEST MTT Cellule Balb 3T3 / Balb 3T3 cell

TABELLA 1: Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / Cell viability inhibition (%)

Spettrofotometro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione / <i>concentration</i> mg/ml	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i> Valori medi / <i>Mean</i>	IC ₅₀	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612			
Controllo positivo/ <i>Positive control</i> : SDS 0.06 mg/ml	0.448 0.410 0.408	< <u>0.5</u>	Citotossico / <i>Cytotoxic</i>
Controllo negativo <i>Negative control</i> :: D-MEM	2.284 2.329 2.248	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Culture cellulare / <i>cell culture</i>	-	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C1 1000 µg/ml	1.946 2.105 1.980	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C2 5000 µg/ml	2.092 1.937 1.887		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C3 10.000 µg/ml	1.990 1.962 1.964		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C4 20.000 µg/ml	1.964 1.900 1.680		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C5 50.000 µg/ml	1.807 1.777 1.729		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

ESITO:

Il campione in esame RAPID BRONZ COD. 013729 LOTTO 259612 si presenta NON CITOTOSSICO “in vitro”, in quanto non è stato osservato nessuna percentuale di inibizione cellulare dei fibroblasti Vero e quindi il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

7- CONCLUSIONI

In base ai risultati ottenuti, il prodotto in esame denominato

RAPID bronz COD. 013729 LOTTO 259612

risulta “in vitro” NON CITOTOSSICO e non ha presentato effetti irritanti su colture cellulari, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 10993-5:2009.