



TEST DI CORROSIONE CUTANEA IN VITRO (OECD 431:2019)

Relazione Tecnica

RT 190878

del 16/12/2019

Campione in prova

RIFIUTO 3.211

(ID campione: 201914635)

Committente

C.B.A. ANALISI s.r.l.

Via G.B. Vico, 22

55042 Forte dei Marmi (LU)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	16/12/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1	Riassunto	3
2	Obiettivo della prova	3
3	Campione oggetto della prova	3
4	Sperimentazione.....	3
4.1	Principio del metodo	3
4.2	Sostanza di riferimento	3
4.3	Riferimenti.....	3
4.4	Apparecchiatura utilizzata.....	4
4.5	Reagenti.....	4
4.6	Preparazione.....	5
4.7	Metodo di prova.....	5
5	Dati grezzi	6
6	Calcoli	9
7	Risultati.....	9
8	Valutazione e discussione dei risultati	10
9	Archivi.....	10
10	Bibliografia.....	11

1 Riassunto

La presente relazione riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso del test, come le condizioni di esposizione dei tessuti epidermici e i risultati calcolati.

Questo test in vitro è in grado di discriminare in maniera affidabile le sostanze che sono corrosive per la pelle da quelle che non lo sono e può inoltre essere utilizzato per la classificazione di rischio di corrosione cutanea.

2 Obiettivo della prova

Lo scopo del presente test è quello di determinare se il campione può avere effetti corrosivi per l'epidermide umana.

3 Campione oggetto della prova

Il committente ha provveduto a spedire un campione, denominato RIFIUTO 3.211, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato accettato e identificato con l'ID 201914635.

Il campione è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per 1 mese dopo la fine dello studio.

4 Sperimentazione

4.1 Principio del metodo

I tessuti sono stati condizionati tramite pre-incubazione (overnight) per il rilascio di composti correlati allo stress da trasporto e detriti. Dopo la fase di pre-incubazione i tessuti sono stati trasferiti in un medium di mantenimento fresco ed esposti in maniera topica con il campione da testare rispettivamente per 3 minuti ed 1 ora. Sono stati utilizzati 2 tessuti per ogni trattamento, per il controllo negativo (C-) e per il controllo positivo (C+). Dopo l'esposizione i tessuti sono stati sciacquati ed asciugati ed il medium di saggio è stato sostituito con il medium MTT. Dopo 3 ore di incubazione i tessuti sono stati lavati con del DPBS, asciugati e sono stati estratti con isopropanolo i sali di blu di formazano. La densità ottica (D.O.) dell'estratto di formazano è stata determinata spettrofotometricamente a 570 nm, e la vitalità cellulare è stata calcolata per ogni tessuto come percentuale rispetto alla media dei tessuti del controllo negativo. La corrosività cutanea potenziale del materiale testato è stata classificata in accordo con la vitalità cellulare rimanente, ottenuta dopo l'esposizione a 3 minuti o 1 ora con il campione testato.

4.2 Sostanza di riferimento

Il potassio idrossido (KOH) è la sostanza di riferimento che viene testata come controllo positivo per assicurare che il lotto di pelle umana ricostruita utilizzato sia affidabile.

1 ora di esposizione al C+ deve dare una vitalità media dei tessuti <15 %.

4.3 Riferimenti

Il seguente test fa riferimento al metodo *OECD/OCDE 431:2019. "OECD guideline for testing of chemicals – In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method"*, al Regolamento CE 440/2008 - Allegato Parte B, metodo B.40bis "Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana" e al protocollo del fornitore dei tessuti epidermici MatTek Corporation "In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT)" (del 07/11/2014).

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Pinze sterili
- Incubatore a CO₂
- Tamponi sterili
- Pipettatore con pipette sterili monouso
- Cappa a flusso laminare
- Micropipette
- Navicelle in vetro
- Bilancia
- Microplate reader (spettrofotometro)
- Agitatore
- Timer

4.5 Reagenti

Modello di pelle umana utilizzato

Per effettuare il test è stato utilizzato il modello EpiDerm™, fornito da MatTek Corporation. Si è deciso di utilizzare tale modello poiché viene citato sia dal metodo *OECD/OCDE 431:2019. "OECD guideline for testing of chemicals – In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method"* che dal Reg. CE 440/2008 All. III B.40 BIS – GUCE L142 31/05/2008 "Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana". Inoltre, il test proposto da MatTek è stato validato nel 2007 in uno studio di validazione internazionale che coinvolgeva BASF SE (Ludwigshafen, Germania), IIVS Inc. (Gaithersburg, USA) ZEBET al BfR (Berlino, Germania) e Zet-LSL (Linz, Austria). Lo studio è stato condotto in linea con i requisiti del documento OCSE GD 34 e del documento ECVAM Performance Standard per l'applicazione di modelli di pelle umana a test di corrosione cutanea in vitro. L'ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) ha formalmente approvato la validità scientifica del modello EpiDerm™ alla sua riunione di novembre 2008. ESAC ha concluso che il modello EpiDerm™ ha una precisione ed un'affidabilità sufficienti per la previsione di sostanze di prova corrosive e non corrosive per la pelle e che dovrebbe essere considerato un metodo in vitro convalidato in sostituzione dei test di corrosione cutanea sugli animali.

Il lotto utilizzato per il test era il 30839, derivante dal ceppo di keratinociti 00267. Nel certificato inviato dal fornitore viene dichiarato che nel lotto non sono stati riscontrati virus HIV-1, dell'epatite B e dell'epatite C. Non sono stati inoltre riscontrati batteri, lieviti o altri funghi. Il lotto non presenta quindi alcun tipo di contaminazione. Il fornitore ha inoltre dichiarato nel certificato di qualità che la funzionalità della barriera cellulare del lotto in esame ha superato tutti i controlli previsti. La vitalità tissutale ottenuta dal fornitore è risultata essere corrispondente a D.O. @ 540-570 nm = 1,895±0,072 (il lotto viene considerato accettabile dal fornitore se la D.O. è compresa tra 1,0 e 3,0).

MTT medium

Il medium è stato preparato fresco il giorno del test ad una concentrazione di 1 mg/ml: è stato diluito 1 mL del MTT concentrato a 5 mg/ml, conservato in freezer, con 4 mL di medium fresco.

Dulbecco PBS (DBPS)

È stata utilizzata una soluzione sterile già pronta, alla concentrazione 10x.

Potassio idrossido (KOH) 8N

Controllo positivo (C+) presente all'interno del kit acquistato.

Acqua distillata

Controllo negativo (C-).

Isopropanolo

Soluzione estraente.

4.6 Preparazione

Il campione, ove necessario, subisce una frantumazione fino a ridurlo in polvere sottile.

Si sono poi pesati, su di una navicella in vetro, 25 mg dello stesso. Il contenuto della navicella viene versato direttamente sopra il tessuto, evitando di fare compattare il materiale in un unico punto, e si aggiungono 25 μ L di acqua distillata sterile al fine di bagnare il materiale per aumentare la superficie di contatto.

4.7 Metodo di prova**Modello predittivo**

Il potenziale corrosivo dei rifiuti testati si ottiene comparando la media relativa della vitalità dei tessuti ottenuta dopo il trattamento a 3 minuti con quella ottenuta nei tessuti del controllo negativo trattati con acqua. Un campione viene classificato "corrosivo" in ogni caso se la vitalità relativa dei tessuti, dopo il trattamento a 3 minuti con il campione, è diminuita più del 50%. Inoltre, quei materiali che vengono classificati "non corrosivi" dopo 3 minuti (vitalità $\geq 50\%$), risultano classificati "corrosivi" se la vitalità relativa dei tessuti dopo il trattamento a 1 ora con il campione è $< 15\%$.

Controlli di qualità del test**Controllo negativo (C-)**

La densità ottica nel test MTT dei tessuti del C- trattati con acqua è un indicatore della vitalità ottenuta nel laboratorio di prova dopo il trasporto, la conservazione e le specifiche condizioni del test. La vitalità dei tessuti supera i criteri di accettabilità quando la media della densità ottica dei tessuti del C- risulta $\geq 0,8$ e $\leq 2,8$.

Controllo positivo (C+)

Viene utilizzato come C+ il KOH 8N.

1 ora di esposizione al C+ deve dare una vitalità media dei tessuti $< 15\%$.

Coefficiente di variazione (CV)

Il coefficiente di variazione non dovrebbe mai eccedere il valore 0,3.

Procedura sperimentale**Condizionamento dei tessuti (pre-incubazione)**

Una volta che il medium ha raggiunto la temperatura ambiente (20-25°C), è stata preparata una piastra a 6 pozzetti per il campione da testare, per il controllo negativo e una per il controllo positivo, pipettando 0,9 mL di medium in ogni pozzetto.

La confezione contenente i tessuti è stata aperta all'interno della cappa sterile a flusso laminare, è stata rimossa la garza sterile e sono stati prelevati con cura tutti gli inserti contenenti il tessuto epidermico, rimuovendo rapidamente ogni residuo di gel di agarosio che può rimanere adeso alla superficie esterna del supporto, facendolo assorbire gentilmente alla garza sterile e posizionando l'inserto immediatamente in un pozzetto delle piastre preparate. Questa operazione viene fatta velocemente assicurandosi che non vi sia la formazione di bolle d'aria al di sotto dell'inserto, infatti le culture cutanee possono seccarsi velocemente quando non sono in contatto con il medium.

Prima dell'incubazione a 37°C, 5% CO₂ per 1 ora, il coperchio delle piastre è stato segnato con le posizioni del C-, del campione da testare e del C+ su entrambe le piastre.

Preparazione per il test

Una volta preparato il medium MTT, sono state preparate 2 piastre a 12 pozzetti: una per il test a 3 minuti e una per il test a 1 ora, pipettando 300 µL di medium in ciascun pozzetto.

Applicazione a 1 ora

Dopo 1 ora di pre-incubazione, ogni inserto è stato trasferito in una nuova piastra a 6 pozzetti contenente del medium fresco (0,9 mL per pozzetto).

Tenendo le piastre all'interno della cappa a flusso laminare, sono stati dosati tutti i tessuti rispettivamente 50 µL di acqua (controllo negativo), il campione testato (50 µL per i liquidi; 25 mg + 25 µL di acqua per i solidi) e il controllo positivo.

Dopodiché le piastre sono state trasferite in incubatore (37°C, 5% CO₂) finché non è stata raggiunta 1 ora di esposizione per il primo tessuto che è stato dosato.

Dopo i 60 ± 1 minuti di esposizione, i tessuti sono stati risciacquati con DPBS sterile, riempiendo e svuotando gli inserti del tessuto 15 volte per rimuovere qualsiasi residuo del materiale testato. Da ogni inserto è stato rimosso l'eccesso di DPBS scuotendo delicatamente e asciugando il fondo su carta assorbente, dopodiché l'inserto è stato posizionato nelle piastre contenenti MTT già preparate, nel primo pozzetto della prima riga.

Applicazione a 3 minuti

Impostando il timer a 3 minuti, facendolo partire e tenendo le piastre all'interno della cappa a flusso laminare, sono stati dosati tutti i tessuti rispettivamente: 50 µL di acqua (controllo negativo), il campione testato (50 µL per i liquidi; 25 mg + 25 µL di acqua per i solidi) e il controllo positivo. Una volta trascorsi i 3 minuti, gli inserti sono stati sciacquati con DPBS sterile e posizionati poi nelle piastre contenenti MTT già preparate, nel primo pozzetto della prima riga.

Test con MTT e lettura

Una volta posizionati nelle piastre con MTT, i tessuti sono stati incubati per 3 ore (37°C, 5% CO₂).

Trascorse le 3 ore, è stato aspirato l'MTT dai pozzetti e sono stati riempiti e svuotati con DPBS sterile. Gli inserti sono stati trasferiti in una nuova piastra, immergendoli delicatamente in 2 mL di soluzione estraente contenente isopropanolo (il livello deve essere sopra il bordo superiore dell'inserto, in maniera da coprire completamente il tessuto da entrambi i lati).

Per sigillare la piastra si utilizzano più fogli di parafilm per evitare l'evaporazione della soluzione estraente. L'estrazione è stata fatta overnight, senza bisogno dell'agitazione, a temperatura ambiente.

Una volta finito il tempo di estrazione, gli inserti sono stati forati con un ago da siringa e eliminati.

Per ogni tessuto sono stati trasferiti in triplicato 200 µL della soluzione di blu di formazano in una micropiastra a 96 pozzetti a fondo piatto (ovvero per ogni tessuto ci sono 3 letture di densità ottica, questa procedura è valida sia per il trattamento ad 1 ora che a 3 minuti). Come bianco è stata utilizzata la soluzione estraente di isopropanolo. La densità ottica è stata letta allo spettrofotometro a 570 nm.

5 Dati grezzi

1° GIORNO DELLA PROVA – DATA: 11/12/2019

Pesate del campione per la prova a 3 minuti:

1. 23,63 mg
2. 26,21 mg

Pesate del campione per la prova a 1 ora:

1. 25,54 mg
2. 25,91 mg

Prima dell'inizio della fase di esposizione i tessuti sono stati condizionati.

Volume di medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio condizionamento: 10:00 del 11/12/2019

Temperatura: 37,0°C

Concentrazione CO₂: 5%

Ora fine condizionamento: 11:00 del 11/12/2019

Fase di esposizione a 1 h

Tessuto	Campione	Ora inizio esposizione	Aggiunta acqua	Fase di lavaggio
Tessuto 1	Acqua (C-)	11:10	--	12:10
Tessuto 2	Acqua (C-)	11:11	--	12:11
Tessuto 3	KOH 8N (C+)	11:12	--	12:12
Tessuto 4	KOH 8N (C+)	11:13	--	12:13
Tessuto 5	201914635	11:14	25 µL	12:14
Tessuto 6	201914635	11:15	25 µL	12:15

C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo

Volume medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio incubazione: 11:15

Temperatura: 37,0°C

Concentrazione CO₂: 5%

Ora fine incubazione: 12:15

Preparazione MTT

Volume utilizzato di MTT concentrato a 5 mg/L: 1 mL

Volume utilizzato di medium fresco: 4 mL

Concentrazione finale MTT: 1 mg/l

Fase di esposizione a 3 minuti

Tessuto	Campione	Ora inizio esposizione	Aggiunta acqua	Ora fine esposizione
Tessuto 1	Acqua (C-)	12:10	--	12:13
Tessuto 2	Acqua (C-)	12:11	--	12:14
Tessuto 3	KOH 8N (C+)	12:12	--	12:15
Tessuto 4	KOH 8N (C+)	12:13	--	12:16
Tessuto 5	201914635	12:14	25 µL	12:17
Tessuto 6	201914635	12:15	25 µL	12:18

C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo

Finite le fasi di esposizione tutti i tessuti sono stati lavati con DPBS e posti in MTT.

Prove di interferenza del campione con MTT**Fase 1**

Pesata del campione: 25,50 mg
Volume acqua deionizzata: 0,3 mL
Ora inizio incubazione: 09:15
Ora fine incubazione: 10:15
Presenza di una forte colorazione: NO
Necessaria la fase 2: NO

Fase 3

Pesata del campione: 25,16 mg
Volume di medium MTT utilizzato: 1 mL
Controllo utilizzato: Medium MTT non trattato
Ora inizio incubazione: 09:20
Ora fine incubazione: 10:20
Presenza di colorazione blu/viola: NO
Necessaria la fase 4: NO
Il campione testato non interferisce con MTT.

Fase di contatto con MTT

Volume di MTT per pozzetto: 0,3 mL
Ora inizio incubazione: 12:20
Temperatura: 37.0 °C
Concentrazione CO₂: 5%
Ora fine incubazione: 15:20

Fase di estrazione:

Volume di isopropanolo per tessuto: 2 mL
Estrazione over night: 15:20
Ora fine estrazione: 09:00

2° GIORNO DELLA PROVA – DATA: 12/12/2019**Fase di lettura allo spettrofotometro**

Lunghezza d'onda utilizzata: 570 nm

Schema di carico piastra:

Prova a 3 minuti

	1	2	3	4
A	B	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635– tessuto 1
B	B	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635– tessuto 1
C	B	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635– tessuto 1
D	B	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635– tessuto 2
E	B	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635– tessuto 2
F	B	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635– tessuto 2

B = bianco (isopropanolo); C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo; volume per pozzetto: 0,2 mL

Prova a 1 ora

	6	7	8
A	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635- tessuto 1
B	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635- tessuto 1
C	C- tessuto 1	C+ tessuto 1	201914635- tessuto 1
D	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635- tessuto 2
E	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635- tessuto 2
F	C- tessuto 2	C+ tessuto 2	201914635- tessuto 2

B = bianco (isopropanolo); C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo; volume per pozzetto: 0,2 mL

6 Calcoli

Di seguito sono riportati i valori di densità ottica (D.O. a 570 nm) letti dallo spettrofotometro, con i valori di media e deviazione standard percentuale delle tre letture. I dati sono stati corretti sottraendo il valore medio delle letture del bianco.

Valori misurati Campione ID 201914635												
D.O. Misurata	Controlli a 3'				Campione a 3'		Controlli a 1h				Campione a 1h	
	Controllo negativo a 3 minuti Tessuto 1	Controllo negativo a 3 minuti Tessuto 2	Controllo positivo a 3 minuti Tessuto 1	Controllo positivo a 3 minuti Tessuto 2	Tessuto 1 trattato con la sostanza a 3 minuti	Tessuto 2 trattato con la sostanza a 3 minuti	Controllo negativo a 1 ora Tessuto 1	Controllo negativo a 1 ora Tessuto 2	Controllo positivo a 1 ora Tessuto 1	Controllo positivo a 1 ora Tessuto 2	Tessuto 1 trattato con la sostanza a 1 ora	Tessuto 2 trattato con la sostanza a 1 ora
	1.464	1.535	0.206	0.202	1.481	1.484	1.464	1.535	0.206	0.202	1.704	1.734
	1.457	1.514	0.207	0.203	1.487	1.480	1.457	1.514	0.207	0.203	1.691	1.736
	1.497	1.542	0.208	0.210	1.474	1.507	1.497	1.542	0.208	0.210	1.715	1.715
Media	1.473	1.531	0.207	0.205	1.481	1.491	1.473	1.531	0.207	0.205	1.704	1.729
Dev St. %	2.14	1.46	0.10	0.44	0.65	1.46	2.14	1.46	0.10	0.44	1.20	1.16

7 Risultati

La D.O. media per i tessuti di controllo negativo (C-) a 3' e 1h è risultata essere pari a 1,502 (se entrambe le prove vengono effettuate in giornata si può fare un unico controllo). Tale valore corrisponde al 100% delle vitalità dei tessuti esposti ai due tempi diversi. Inoltre, i controlli negativi (C-) risultano essere conformi a quanto previsto dal metodo ($0,8 \leq \text{D.O.} \leq 2,8$).

È stata poi calcolata la vitalità percentuale per ogni singolo tessuto esposto al controllo positivo (C+):

C+, prova a 3' e 1h

Tessuto 1 = 13,8%

Tessuto 2 = 13,7%

La vitalità media dei tessuti esposti al C+ per 3' e 1h è del 13,7% (se entrambe le prove vengono effettuate in giornata si può fare un unico controllo), valore conforme a quanto previsto dal metodo per il controllo positivo (vitalità % C+ @ 1h $\leq 15\%$).

Si può quindi concludere che dai valori di D.O. trovati nei controlli negativi e dai valori di vitalità percentuale ottenuti nei controlli positivi, il lotto utilizzato risulta conforme alle specifiche dettate dal metodo.

Si è infine calcolata la vitalità percentuale per ogni singolo tessuto esposto al campione oggetto del test:

Prova a 3 minuti

Tessuto 1 = 98,6%

Tessuto 2 = 99,3%

La vitalità percentuale media risulta quindi essere pari al 98,9%.

Inoltre, il coefficiente di variazione dei tessuti esposti al campione è risultato essere pari a 0,007 conforme a quanto previsto dal metodo ($CV < 0,3$).

Prova a 1 h

Tessuto 1 = 113,4%

Tessuto 2 = 115,1%

La vitalità percentuale media risulta quindi essere pari al 114,3%.

Inoltre, il coefficiente di variazione dei tessuti esposti al campione è risultato essere pari a 0,018, conforme a quanto previsto dal metodo ($CV < 0,3$).

8 Valutazione e discussione dei risultati

Il Reg. CE 440/2008 All. B, B.40bis "Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana", al p.to 2.1 scrive:

Il campione in prova è considerato corrosivo per la pelle in uno dei seguenti casi:

- se la vitalità dopo 3 minuti d'esposizione è inferiore al 50%;
- se la vitalità dopo 3 minuti d'esposizione è superiore o uguale al 50%, ma è inferiore al 15% dopo 1 ora di esposizione.

Il campione in prova è considerato non corrosivo per la pelle:

- se la vitalità dopo 3 minuti di esposizione è superiore o uguale al 50%, e la vitalità dopo 1 ora di esposizione è superiore o uguale al 15%.

Poiché la vitalità percentuale media dopo 3 minuti di esposizione è del 98,9% e quella ottenuta dopo 1 ora di esposizione è del 114,3%, si può affermare che il campione in prova non è corrosivo per la cute umana.

9 Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

10 Bibliografia

1. OECD/OCDE 431:2019. "OECD guideline for testing of chemicals – In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method"
2. MatTek Corporation protocollo "In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT)" del 07/11/2014
3. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) - Allegato Parte B, metodo B.40bis "Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana"