

Cliente:

**RMC INDÚSTRIA BRASILEIRA DE PRODUTOS MÉDICOS EIRELI.
RUA RAMIRA MOREIRA SILVEIRA, N° 239
JARDIM MOREIRINHA – AMPARO – SP - CEP: 13903-340
FONE: (19) 3808-5224**

Executado por:

**MEDLAB PRODUTOS DIAGNÓSTICOS LTDA.
Rua Octávio Teixeira Mendes Sobrinho, 35
Vila Santa Catarina – São Paulo – SP
Fone: (011) 5671-7666 – Fax: (011) 5271-7686**

1. Identificação da Amostra¹

Identificação da Amostra:	GEL ANTICONGELANTE		
Categoria:	Produto para Saúde		
Lote	8095	CAS:	N/A
Data de fabricação:	06/07/2022	Data de validade:	06/07/2025
Composição:	Hidroxietilcelulose, Glicerina bidestilada, Metilcloroisotiazolinona+Metilisotiazolinona, EDTA dissódico, Propilenoglicol USP, Monoisopropanolamina, Corante azul, Água.		
Informações adicionais:	ND		

¹:Informações fornecidas pelo cliente

2. Norma(s) de referência

Método

MET-TOX-022

Normas de Referência:

ISO 10993-5: 2009, "Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity."

ISO 10993-12: 2021, "Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials."

3. Declaração da natureza / propósito do ensaio

Ensaio de citotoxicidade, determinam a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro* a partir de parâmetros biológicos apropriados. A citotoxicidade é baseada em funções celulares, como permeabilidade de membrana, atividade enzimática, aderência celular, produção de ATP, produção de coenzima e atividade de captação de nucleotídeos. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é baseado na determinação da viabilidade celular, através da sua atividade metabólica por colorimetria, utilizando MTS (5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4,5-dimetil-tiazol) -3- (4-sulfofenil) tetrazólio, convertido em sal de formazan a partir da atividade mitocondrial de células vivas em cultura. A quantidade de cristais formados tem uma correlação positiva com o número de células e sua atividade, e a medição do valor colorimétrico de absorvância (densidade ótica) reflete o número de células sobreviventes e sua atividade metabólica. Assim, o objetivo do presente ensaio, é avaliar o potencial citotóxico da amostra, GEL ANTICONGELANTE.

4. Datas

Início da fase experimental:	22/08/2022
Término da fase experimental:	24/08/2022

5. Sistema teste

Foram utilizadas células da linhagem L-929 (NCTC clone 929).

5.1. Caracterização

Sistema teste: Linhagem L-929 (fibroblastos isolados de tecido conectivo subcutâneo, areolar e adiposo de camundongos C3H/An- camundongo macho com 100 dias de vida).

Procedência: Banco de Células do Rio de Janeiro.

Lote: LC1-G23-V00

5.2. Manutenção

As células foram propagadas a partir de estoques de cultivo e semeadas em garrafas de 25 cm² ou 75 cm² em meio de cultura completo, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina, mantidas a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂ por aproximadamente 48 horas, até que sua densidade alcance uma confluência de 80%.

6. Método de administração e razão de escolha

As extrações foram realizadas conforme descrito na norma ISO 10993-12: *Sample preparation and reference materials*, 2021. A amostra diluída, e os extratos dos itens de referência foram aplicados diretamente à camada celular conforme descrito na metodologia (MET-TOX-022).

7. Substância de referência

Anteriormente ao processo de extração as substâncias de referência foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos. As substâncias de referência (controles negativo e positivo), foram submetidas ao processo de extração em meio completo, contendo soro fetal bovino 10%, a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂, por 24±2 horas, a uma proporção de 0,2 g da substância de referência, para 1 mL do veículo. Para o preparo dos controles negativo e positivo, são usados respectivamente, polietileno de alta densidade (PEAD) e látex natural. Os extratos obtidos, foram aplicados sem diluições, em quatro replicatas (100±2 µL), diretamente sobre o sistema teste.

8. Preparo da amostra / dose de aplicação

A amostra foi recebida lacrada, e foi manipulada em fluxo laminar, em condições estéreis. A amostra se apresentava com aspecto de gel, com coloração azul. Devido suas características, a amostra foi diluída em meio completo contendo soro fetal bovino 10%, a uma concentração de 20%, no momento da exposição. A amostra deixou alguns precipitados no veículo, e modificou a coloração para roxo claro.

A amostra foi diluída em meio completo contendo soro fetal bovino 10%, no momento da exposição. A amostra foi aplicada em quatro replicatas (100±2 µL), diretamente sobre o sistema teste.

Amostragem: 0,400 mL; Proporção da amostra: 20% (1:5); Volume do veículo 1,6 mL; Condição: Preparo no momento da exposição.

A amostra preparada, foi utilizada imediatamente, antes de 24 horas.

9. Material, equipamentos e reagentes utilizados

Equipamentos: balança analítica, bomba aspiradora, centrífuga, fluxo laminar, incubadora, leitor de microplaca, micropipeta, pipeta repetidora.

Material: filtro de seringa, gaze, garrafa de cultivo celular, microtubos, pinça, placa de 96 poços, ponteiras, seringa, tubo falcon, vidrarias.

Reagentes: tampão PBS estéril, meio de cultivo completo suplementado com soro fetal bovino 10% e L-glutamina 1%, tripsina-EDTA (0,25%), MTS/PMS.

10. Desenho experimental

10.1. Cultivo e plaqueamento celular

Células NCTC clone 929 (L-929, de tecido conectivo subcutâneo, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro), foram cultivadas e mantidas rotineiramente em meio Dulbecco *Eagle's* modificado (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de L-glutamina a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂. Após alcançarem confluência de

RF-TOX-003 R.0

aproximadamente 80%, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS-0,05M / 0,15M NaCl, pH 7,4), para remoção do excesso de SFB e submetidas a um processo de "descolamento", pela adição de tripsina 0,25%, por 5 minutos a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂. Após o período de "descolamento", a tripsina foi inativada pela adição de meio completo, e as células centrifugadas a 1100 rpm por 5-7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular ressuspensionado em 1 mL de meio de cultivo completo, então, 10 µL das células foram retirados e adicionados a 10 µL de azul de tripano para a contagem. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, para o ajuste da concentração de células por poço (1x10⁴ céls/poço) e do volume de meio de cultivo completo. O plaqueamento foi realizado em placas de 96 poços. As células foram mantidas em incubadora a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂, por 24±2 horas para a formação da monocamada celular.

10.2. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

Após o período de 24±2 horas, 100±2 µL dos extratos das substâncias de referência e da amostra, foram aplicados diretamente sobre a monocamada de células, permanecendo por 24±2 horas a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂. Após o período de exposição, os extratos foram retirados dos poços com o auxílio de uma bomba aspiradora. Para a leitura, foram adicionados aos poços, 100±2 µL de meio de cultura completo, seguidos de 20±2 µL de MTS/PMS. A placa foi mantida em incubadora a 37,0±0,5°C em atmosfera de 5,0±0,2% de CO₂, por 120±10 min. Ao final da incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 490±2 nm (com comprimento de referência de 620 nm).

10.3. Cálculo da porcentagem de viabilidade celular (VC%)

A citotoxicidade de uma amostra é determinada a partir da porcentagem de células que se mantem viáveis após sua exposição ao extrato. O corante vital MTS/PMS se incorpora às células, produzindo uma coloração específica, detectada pelo espectrofotômetro a um comprimento de onda de 490±2 nm (com comprimento de referência de 620 nm). A intensidade da cor resultante da incorporação celular será proporcionalmente igual ao número de células viáveis na cultura. Uma amostra é considerada citotóxica se a viabilidade celular (V.C) resultante das 24±2 horas de exposição das células ao extrato for menor que 70%. O cálculo da viabilidade celular em porcentagem (%) deve ser feito de acordo com a fórmula a seguir:

$$V.C\% = \frac{\text{Média das leituras da densidade óptica da amostra dos poços tratados}}{\text{Média da leitura da densidade óptica dos poços de células não tratados}} \times 100$$

V.C ≥ 70%: **não citotóxico**

V.C < 70%: **citotóxico**

11. Resultados

11.1. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Células da linhagem L-929 expostas por 24±2 horas à amostra, **GEL ANTICONGELANTE - 13673-1/2022.0**, apresentaram viabilidade celular de **12,9%**. A tabela 1 e o gráfico 1, demonstram a média da viabilidade celular, e o desvio padrão encontrados para as substâncias de referência e para a amostra.

Tabela 1. Valores da média da viabilidade celular (%), desvio padrão e redução da viabilidade celular, para as substâncias de referência e para a amostra.

Grupo	Valores da Média da Viabilidade celular (%)	Desvio Padrão ²	Classificação
Controle Negativo (PEAD ¹)	101,6%	±1,7	-
Controle Positivo (Látex)	12,9%	±0,2	-
Amostra (13673-1/2022.0)	12,9%	±0,2	<i>Citotóxico</i>

¹PEAD = Polietileno de Alta Densidade | ²A média do desvio padrão deve ser ≤18

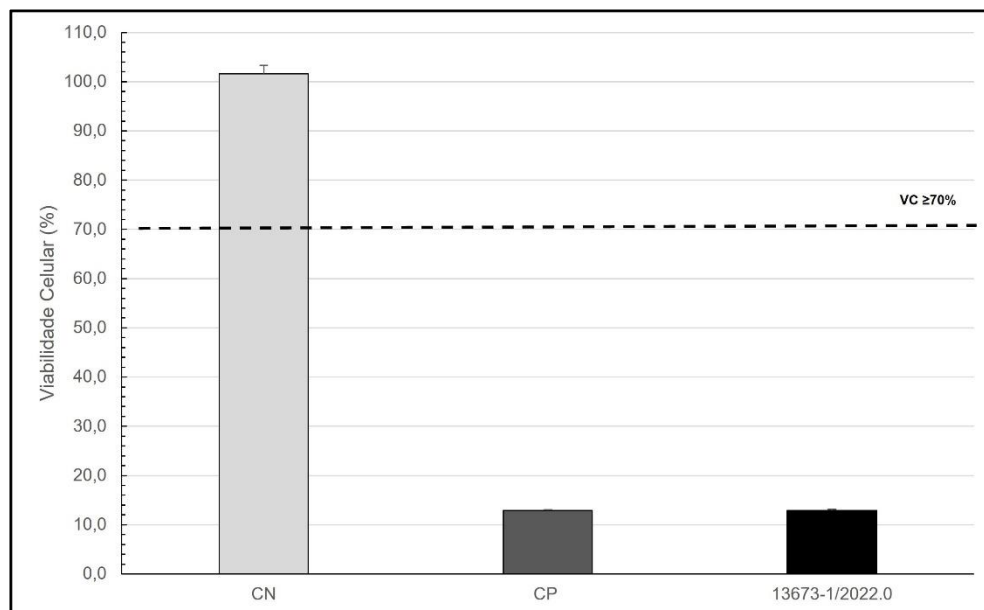


Gráfico 1- Viabilidade celular obtida para as substâncias de referência (CN: controle negativo; CP: controle positivo) e para a amostra 13673-1/2022.0.

12. Discussão

Após o período experimental, células expostas ao extrato da amostra, **GEL ANTICONGELANTE -13673-1/2022.0**, apresentaram viabilidade celular **abaixo** de 70%. Foi observado a destruição total da camada celular.

13. Conclusão

De acordo com o método adotado para realização do ensaio, a amostra **GEL ANTICONGELANTE -13673-1/2022.0**, foi considerada **citotóxica**.

14. Armazenamento e retenção

Os dados brutos e registros oriundos a este ensaio serão armazenados no arquivo por um período de cinco anos.


A amostra será mantida em retenção por 60 dias, e após esse período será descartada.

O resultado desta análise tem significação restrita e se aplica apenas ao item (s) analisado (s).

Este relatório deve ser reproduzido por inteiro. Reprodução de partes deste relatório requer autorização da Medlab.

As informações referentes a caracterização da amostra analisada foram fornecidas pelo cliente juntamente com o envio da amostra.

Este documento foi assinado digitalmente e possui validade jurídica, equivalente a uma assinatura de próprio punho, a validade da assinatura pode ser verificada clicando-se sobre a mesma.



Andrea da Costa, M.Sc, Ph.D
Diretora de Estudos *in vitro*
Bióloga CRBio01 - 072416

Assinado de forma digital por
ANDREA DA COSTA:32446839835
Dados: 2022.08.24 15:58:45 -03'00'

APROVAÇÃO ENSAIO CITOTOXICIDADE

GEL ANTICONGELANTE

Conforme relatório do laboratório ICARE Medlab N° 13673-1/2022.0. Nas condições de ensaio, houve redução da viabilidade celular abaixo de 70% da amostra GEL ANTICONGELANTE após exposição de 24 horas. Porém o produto é de uso transitório de no máximo 30 minutos, não causando dessa forma impactos na indicação de uso e segurança do produto.

Documento assinado digitalmente
 ALESSANDRO DE OLIVEIRA FACCA
Data: 26/06/2023 13:19:46-0300
Verifique em <https://validar.itf.gov.br>

Alessandro de O. Facca
Farmacêutico Resp. Técnico
CRF/SP: 25319