

MASCHERINA FILTRANTE RIUTILIZZABILE STANDARD

DOCUMENTO TECNICO

Fratubi Srl

Prodotta ai fini di cui all'art. 16, com. 2 del DL 17/3/2020 N. 18 e in conformità alla Circolare del Ministero della Salute 0003572-P-18/3/2020

CERTIFICAZIONI OTTENUTE:

OEKO-TEX 100

BIOCOMPATIBILITÀ ISO10993

CERTIFICAZIONI IN CORSO:

Efficienza di Filtrazione Batterica UNI EN14683

PRESENTAZIONE PROGETTO MASCHERINE FILTRANTI

In questo momento di emergenza nazionale anche noi della Fratubi abbiamo deciso di rimboccarci le maniche e dare il nostro contributo.

Questa emergenza ci ha portato **a riconsiderare il nostro ruolo di azienda all'interno della nostra Regione a cui teniamo in particolar modo.** Già in passato abbiamo manifestato il nostro sostegno devolvendo alle comunità/associazioni più bisognose ogni anno parte dei nostri profitti. Questa volta abbiamo però deciso di entrare direttamente in campo per aiutare a contenere il coronavirus. Il nostro progetto parte infatti dalla necessità impellente di proteggerci e non diffondere il COVID-19, **per riuscire come collettivo a ripartire tutti insieme.... #insiemesipuo**

Ecco perché la nostra azienda **si è fatta capofila per riattivare una piccola filiera oggi in profonda difficoltà,** realizzando nel territorio di Ancona e Provincia questa mascherina filtrante ad uso esclusivo della collettività. La mascherina è stata ideata dalla nostra azienda in collaborazione con un professore universitario di microbiologia che risiede nella nostra città, prodotta ai fini di cui all'art. 16, com. 2 del DL 17/3/2020 N. 18 e in conformità alla Circolare del Ministero della Salute 0003572-P-18/3/2020.

La mascherina è lavabile, altamente filtrante, anatomica e regolabile a seconda della dimensione del viso di ognuno di noi. È leggera e comoda da indossare, favorendone l'uso prolungato durante la giornata. È realizzata in tessuto non-tessuto di ultramicrofibra certificata OEKO-TEX® 100 per il contatto prolungato con la pelle ed è sente da qualsiasi sostanza tossica o pericolosa, e ha inoltre passato il test ISO10993 di biocompatibilità.

Il progetto ha incluso in questo prodotto anche la sostenibilità ambientale oltre che la salute del cittadino, difatti questo tessuto è riciclabile al 100% e aiuterà il nostro sistema di smaltimento locale a non ingolfarsi nell'eliminazione di materiali non riciclabili, che causerebbero ulteriori costi indiretti.

In questa fase siamo anche in stretto contatto con laboratori certificati sul territorio nazionale e sono in corso i test di Efficienza di Filtrazione Batterica UNI EN 14683 previsto per i dispositivi DM. È in corso inoltre l'avvio dei test di laboratorio e della procedura di certificazione e accreditamento come DPI FFP2.

Per info rivolgersi a: ordini@fratubi.it

Mascherina prodotta da Galassi snc, Via Giolitti, 2/4, 60028 Osimo Stazione (An) per conto di Fratubi srl e commercializzata da Fratubi srl, P.I. 00928860428 e sede in Via Einaudi, 25 60125, Ancona

AUTOCERTIFICAZIONE PRODUZIONE MASCHERINE FILTRANTI

COMMA 2, ART. 16 D.L. 17 MARZO 2020, N. 18

Il sottoscritto Leonardo Mezzabotta, Codice Fiscale MZZLRD79R10A271G in qualità di Amministratore della ditta Fratubi srl, P.I. 00928860428 e sede in Via Einaudi, 25 60125, Ancona, mail ordini@fratubi.it, telefono +39 071 200373 con la presente

DICHIARA SOTTO LA PROPRIA ESCLUSIVA RESPONSABILITA'

- di aver avviato la produzione in collaborazione con ditte terze e la commercializzazione di mascherine filtranti ad uso della collettività di cui all'art. 16 del DL 17 marzo 2020, n. 18, cd "Cura Italia", in deroga alle vigenti normative
- che la produzione e la commercializzazione avviene in maniera conforme alle indicazioni della Circolare del Ministero Salute 0003572-P-18/03/2020
- che le mascherine prodotte non sono Dispositivi Medici (DM) ne Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) e per tanto non posso essere utilizzate dal personale sanitario e non possono essere utilizzate nei luoghi di lavoro dove la norma preveda l'utilizzo di specifici DPI
- che le mascherine prodotte sono ad uso esclusivo della collettività come barriera contro la diffusione del coronavirus
- che la produzione é effettuata presso ditte specializzate nella produzione e realizzazione di capi di abbigliamento e sottoposte alle vigenti normative in tale settore
- che le mascherine filtranti prodotte non arrecano danni o determinino rischi aggiuntivi per gli utilizzatori nell'ambito della destinazione d'uso prevista
- che sono realizzate con una progettazione semplice e destinata a proteggere l'ambiente vicino all'utente con il contenimento e il filtraggio di grandi goccioline di microorganismi eliminati dalla bocca e dal naso salvaguardando le altre persone da rischi di lieve entità
- che il disegno del modello di mascherina filtrante prodotta si rifà alle indicazioni tecniche presenti nelle norme UNI EN 149:2001+A1 e rispetta lo stato dell'arte in termini di mascherine filtranti
- che il materiale di costruzione é tessuto non-tessuto (TNT) di ultramicrofibra non direzionali costituita da poliestere e poliammide. Il materiale utilizzato per la costruzione è garantito dal marchio Oeko-Tex (standard 100, classe prodotto 1) che certifica l'assenza di sostanze pericolose e ne garantisce l'idoneità del prodotto al contatto con la pelle dei bambini
- che il materiale viene trattato per aumentarne la capacità barriera rispetto ad acqua e aerosol, mantenendo nel contempo la capacità traspirante
- che il materiale utilizzato é adatto al lavaggio e alla sterilizzazione, rendendo la mascherina filtrante riutilizzabile e sterilizzabile
- che il materiale di costruzione é riciclabile e può essere smaltito in accordo con le vigenti normative insieme alla plastica

LUOGO E DATA: Ancona li 2/4/2020

FIRMA



INFORMAZIONI MASCHERINA FILTRANTE

Mascherina filtrante in ultramicrofibra tessuto non-tessuto anatomica ad uso esclusivo della collettività di cui all'art. 16 del DL 17 marzo 2020, n. 18, cd "Cura Italia", in deroga alle vigenti normative. Produzione e la commercializzazione avviene in maniera conforme alle indicazioni della Circolare del Ministero Salute 0003572-P-18/03/2020. Non adatto per uso sanitario o sui luoghi di lavoro come DPI. Prodotta in ultramicrofibra costituita da polietilene e poliammide. Tessuto non-tessuto certificata Oeko-Tex (standard 100, classe prodotto 1) per assenza di sostanze nocive e sicura per il contatto con la pelle. Certificata biocompatibile secondo la ISO10993. Non tossiche, e non arrecano danni o determinino rischi aggiuntivi per gli utilizzatori nell'ambito della destinazione d'uso prevista. Il materiale viene trattato per aumentarne la capacità barriera rispetto ad acqua e aerosol, mantenendo nel contempo la capacità traspirante. Non contiene PVC. Latex free. Il disegno del modello di mascherina filtrante prodotta si rifà alle indicazioni tecniche presenti nelle norme UNI EN 149:2001+A1 e rispetta lo stato dell'arte in termini di mascherine filtranti. Riutilizzabili dopo aver proceduto alla sanificazione secondo le indicazioni fornite. Materiale riciclabile da smaltire in accordo alle vigenti normative.



ETICHETTA PRODOTTO



MASCHERINA FILTRANTE IN ULTRAMICROFIBRA TNT ANATOMICA AD USO ESCLUSIVO DELLA COLLETTIVITÀ

Non adatto per uso sanitario o sui luoghi di lavoro come
DPI

**Ecologiche – Non Chirurgiche – Protezione Ampia –
Lavabile e Riutilizzabile – Taglia unica – Riciclabili**

Prodotta ai fini di cui all'articolo 16, comma 2, D.L.
17/03/2020 n.18 ed in conformità alle indicazioni della
Circolare del Ministero Salute 0003572-P-18/03/2020

Mascherina in Ultramicrofibra certificata Oeko-Tex
(standard 100, classe prodotto 1) per assenza di sostanze
nocive e sicura per il contatto con la pelle. Non contiene
PVC.

Materiale riciclabile da smaltire nella plastica

OEKO-TEX®
CONFIDENCE IN TEXTILES
STANDARD 100



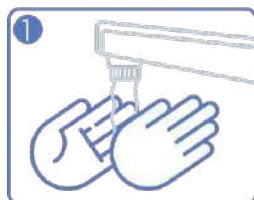
lotto _____
data _____
pz _____

FRATUBI SRL
Via Einaudi, 25 60125 – Ancona – P.I. 00928860428

FOGLIETTO ILLUSTRATIVO

Fronte:

INDICAZIONI D'USO



LAVARSI LE MANI
ACCURATAMENTE



POSIZIONARE LA MASCHERINA
SOPRA NASO E BOCCA



REGOLARE GLI ELASTICI CON
UN NODO SE NECESSARIO



DURANTE L'USO NON TOCCARE
L'ESTERNO DELLA MASCHERINA



AL TERMINE DELL'USO
RIMUOVERE SENZA TOCCARE
L'ESTERNO



SANIFICARE SECONDO LA
PROCEDURA SUGGERITA
(VEDI RETRO)



NON RIUTILIZZARE IN CASO DI
SOSPETTO CONTATTO CON
PERSONE INFETTE
O DANNEGGIAMENTO



DISPORRE IN ACCORDO
CON LE VIGENTI
DISPOSIZIONI

Retro:

PROCEDURA DI SANIFICAZIONE A SECCO ETANOLO 70%

1. Lavarsi bene le mani
2. Togliere la mascherina usando gli elastici
3. Lavarsi di nuovo le mani
4. Indossare guanti monouso o disinfettare le mani
5. Mettere la mascherina su una superficie lavata con acqua e sapone o disinfettante idoneo
6. Spruzzare uniformemente la mascherina con **alcool al 70%** su tutta la superficie compresi gli elastici senza eccedere nella bagnatura
7. Girare la mascherina e ripetere l'operazione
8. Lasciare agire fino a completa evaporazione in un luogo protetto (almeno 30 minuti, il tempo di asciugatura può variare in funzione delle condizioni ambientali)
9. Ora la mascherina è sanificata, evitare di contaminarla, se puzza di alcool lasciarla asciugare ulteriormente su una superficie pulita e sanificata, altrimenti riporla in una busta di plastica fino al nuovo uso.
10. La procedura è ripetibile fino ad un massimo di 10 volte

ISTRUZIONI D'USO

Le mascherine se utilizzate in maniera appropriata per favore il distanziamento sociale, in congiunzione con le altre regole di distanziamento sociale in vigore, sono efficaci nel diminuire il rischio di contagio e ridurre la trasmissibilità del COVID-19. Al fine di utilizzare correttamente la mascherina filtrante riutilizzabile si consiglia di seguire le seguenti istruzioni:

- Lavarsi accuratamente le mani prima di indossare la mascherina
- Posizionare la mascherina a coprire bocca e naso. Se necessario regolare gli elastici o i flap al fine di favorire un'adeguata aderenza al volto
- Durante l'uso, evitare di toccare la superficie esterna della mascherina con le mani. Nel caso succeda, lavare accuratamente le mani
- Rimuovere la mascherina evitando per quanto possibile di toccare le superfici esterne. La mascherina può essere riutilizzata se sanificata seguendo l'apposita procedura
- Non riutilizzare la mascherina se: I) si é entrati in contatto con persone affette da COVID-19 o che presentino sintomi evidenti compatibili con la patologia; II) Se la mascherina é visibilmente contaminata da liquidi biologici, o la sua forma é compromessa. In tali casi non procedere alla sanificazione ma sostituire la mascherina con una nuova
- La mascherina deve essere smaltita in accordo con le vigenti normative

PROCEDURA DI SANIFICAZIONE PER IL RIUTILIZZO

Procedura di Sanificazione e Lavaggio delle mascherine in TNT riutilizzabili prodotte da Fratubi Srl

PROCEDURA DI SANIFICAZIONE A SECCO

11. Lavarsi bene le mani
12. Togliere la mascherina usando gli elastici
13. Lavarsi di nuovo le mani
14. Indossare guanti monouso o disinfettare le mani
15. Mettere la mascherina su una superficie lavata con acqua e sapone o disinfettante idoneo
16. Spruzzare uniformemente la mascherina con alcool al 70% su tutta la superficie compresi gli elastici senza eccedere nella bagnatura
17. Girare la mascherina e ripetere l'operazione
18. Lasciare agire fino a completa evaporazione in un luogo protetto (almeno 30 minuti, il tempo di asciugatura può variare in funzione delle condizioni ambientali)
19. Ora la mascherina è sanificata, evitare di contaminarla, se puzza di alcool lasciarla asciugare ulteriormente su una superficie pulita e sanificata, altrimenti riporla in una busta di plastica fino al nuovo uso.
20. La procedura è ripetibile fino ad un massimo di 10 volte

PROCEDURA DI LAVAGGIO E SANIFICAZIONE

È possibile lavare la mascherina in un normale ciclo di lavaggio in lavatrice a temperature fino a 65°C con normale detersivo. Al fine di preservare le proprietà tecniche del materiale non utilizzare ammorbidenti o detersivi a base di cloro. Al termine del ciclo di lavaggio e di asciugatura è possibile seguire la procedura di sanificazione a secco descritta sopra.

La procedura è ripetibile fino ad un massimo di 10 volte.

Referenze

Viscusi, D. J., Bergman, M. S., Eimer, B. C., and Shaffer, R. E. (2009). Evaluation of Five Decontamination Methods for Filtering Facepiece Respirators. *Ann Occup Hyg* 53, 815–827. doi:[10.1093/annhyg/mep070](https://doi.org/10.1093/annhyg/mep070)

Agenzia Industrie Difesa, Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare. (2020). Istruzioni d'uso per la sanitizzazione delle mascherine monouso di protezione individuale in emergenza COVID-19. Available at: <http://www.comune.potenza.it/wp-content/uploads/2020/03/sanitizzazione-1.pdf> [Accessed April 28, 2020]

Rebmann, T. APIC Position Paper: Extending the Use and/or Reusing Respiratory Protection in Healthcare Settings During Disasters. Association of Professional in Infection Control and Epidemiology. Available at: [http://www.apic.org/Resource/TinyMceFileManager/Advocacy-PDFs/APIC Position Ext the Use and or Reus Resp Prot in Hlthcare Settings12091.pdf](http://www.apic.org/Resource/TinyMceFileManager/Advocacy-PDFs/APIC%20Position%20Ext%20the%20Use%20and%20or%20Reus%20Resp%20Prot%20in%20Hlthcare%20Settings12091.pdf) [Accessed April 28, 2020]

Institute of Medicine. 2006. Reusability of Facemasks During an Influenza Pandemic: Facing the Flu. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11637>.

CERTIFICAZIONI

CERTIFICATE

The company

Freudenberg Performance Materials S.A.S
20 Rue Ampere
68027 Colmar Cedex, FRANCE

is granted authorisation according to STANDARD 100 by OEKO-TEX® to use the STANDARD 100 by OEKO-TEX® mark, based on our test report **19.0.93907/Rev2**



for the following articles:

Bicomponent-microfilament fabrics made of polyamide and polyester, with and without embossing calendering, white or green, article "Evolon", "Evolon New Generation" including variation "Soft Comfort" as well as bicomponent-microfilament fabrics made of polyamide and polyester and recycled polyester.


The results of the inspection made according to STANDARD 100 by OEKO-TEX®, Appendix 6, **product class I** have shown that the above mentioned goods meet the human-ecological requirements of the STANDARD 100 by OEKO-TEX® presently established in Appendix 6 for baby articles.

The certified articles fulfil requirements of Annex XVII of REACH (incl. the use of azo colourants, nickel release, etc.), the American requirement regarding total content of lead in children's articles (CPSIA; with the exception of accessories made from glass) and of the Chinese standard GB 18401:2010 (labelling requirements were not verified).

The holder of the certificate, who has issued a conformity declaration according to ISO 17050-1, is under an obligation to use the STANDARD 100 by OEKO-TEX® mark only in conjunction with products that conform with the sample initially tested. The conformity is verified by audits.

The certificate Z0.0.5064 is valid until 30.11.2020

Boennigheim, 10.12.2019


Dipl.-Ing. (FH) Ivonne Schramm
Head of Certification Body OEKO-TEX®



Factsheet

STANDARD 100 by OEKO-TEX®

PRODUCT LABEL FOR TEXTILES AND ACCESSORIES THAT HAVE BEEN TESTED FOR HARMFUL SUBSTANCES

STANDARD 100 by OEKO-TEX® is a globally standardized, independent testing and certification system for textile raw materials, intermediate & end products of all processing stages and accessory materials used.



PRODUCT DESCRIPTION

STANDARD 100 by OEKO-TEX® distinguishes between four product classes: Infants and young children, skin contact, without skin contact, and accessory materials that can be tested based on the criteria in Annex 4 or Annex 6 of STANDARD 100 by OEKO-TEX®.

The strict tests for harmful substances and the comprehensive catalog of measures of STANDARD 100 by OEKO-TEX® include:

- › Important legal regulations such as banned azo colorants, pentachlorophenol, cadmium, lead (US-CPSIA), etc.
- › Numerous harmful chemicals, even if they are not yet regulated legally
- › Numerous substance classes that are relevant to the environment
- › Requirements of Annexes XVII and XIV of the REACH Regulation and the ECHA-SVHC candidate list

Prerequisites for issuing the certificate and the STANDARD 100 label are:

- › The material or different constituents of a textile product must comply with the conditions, test criteria, and limit values of the standard
- › Operational quality assurance
- › Successful quality audit in your company by the OEKO-TEX® Institute before or shortly after the certification

THE COMPELLING BENEFITS

- › You get to label your products with one of the world's most recognized and widely used labels for textiles that have been tested for harmful substances and document your product stewardship to protect the consumer.
- › The independent evaluation of the world's leading OEKO-TEX® Institutes represents a very strong, confidence-building measure for your materials and products.
- › The STANDARD 100 certificate is often the key to new business partnerships since the criteria of the STANDARD 100 by OEKO-TEX® are often the basis of Restricted Substances Lists (RSLs) of retail chains, discounters, producers, etc.
- › You receive practical assistance for your operational quality assurance without having to allocate resources yourself.
- › A network of over 10,000 companies around the world make it easier for you to select raw materials and business partners along the textile chain.

YOUR PATH TO STANDARD 100 BY OEKO-TEX®

- Fill out the application form and send it – together with the sample materials (if applicable) – to the OEKO-TEX® Institute of your choice.
- The selected OEKO-TEX® Institute will contact you.
- Your OEKO-TEX® Institute will check the submitted documents and sample materials, define the extent of the testing and necessary test parameters, and then examine your products.
- After successful laboratory tests and provision of all necessary documents, you will receive the STANDARD 100 certificate and a detailed test report from your OEKO-TEX® Institute.
- An OEKO-TEX® expert will visit you on site before or shortly after the certification to verify the given information.

VALIDITY

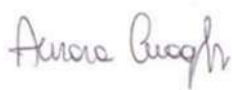


The STANDARD 100 certificate is valid for 1 year.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **1 / 17**

CLIENTE	Galassi snc Via Giolitti, 2/4 60028 Osimo Stazione An		
LABORATORIO	<input checked="" type="checkbox"/> MaB – Microscopia applicata e biologia cellulare <input checked="" type="checkbox"/> ToP - Tossicologia e Proteomica <input type="checkbox"/> Ms² – Materiali, sensori e sistemi		
Report svolto da: Aurora Cuoghi	Firma 	Data 14/04/2020	
Responsabile di laboratorio: Elena Veronesi	Firma 	Data 14/04/2020	
Approvato da: Massimo Dominici	Firma 	Data 14/04/2020	

Ed.	Report n°	Data	Descrizione
01	MAB_2020_58	14/04/2020	Prima Edizione

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 2 / 17

INDICE

1	RIFERIMENTI COMMESSA	3
2	SCOPO	3
3	STATO DELL'ARTE	3
4	MATERIALI	7
4.1	Identificazione del Campione	7
4.2	Standard	7
4.3	Linee Cellulari	7
4.4	Reagenti	7
4.5	Consumabili	8
4.6	Strumenti	8
5	Metodi	9
5.1	Saggio di Citotossicità	9
o	Analisi dei dati	11
5.2	Saggi <i>in vitro</i> alternativi per valutare infiammazione e sensibilizzazione	11
5.2.1	Determinazione dei nitriti	12
5.2.2	Determinazione dell'IL-6	12
6	RISULTATI	14
6.1	Valutazione della citotossicità	14
▪	Valutazione qualitativa	14
▪	Valutazione quantitativa	14
6.2	Valutazione dell'irritazione e sensibilizzazione mediante misura dei nitriti e dell'IL-6	15
7	CONCLUSIONI	17
8	BIBLIOGRAFIA	17

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **3 / 17**

1 RIFERIMENTI COMMESSA

TPM_2020_235

Data di inizio dell'esperimento: 08/04/2020

Data di fine dell'esperimento: 10/04/2020

2 SCOPO

Il presente studio ha un duplice obiettivo: a) la valutazione della citotossicità della maschera facciale in oggetto e b) la valutazione dell'eventuale potere irritante/sensibilizzante attraverso la quantificazione di IL-6 e nitriti.

3 STATO DELL'ARTE

Per dispositivi a contatto con cute integra per un tempo inferiore a 24 ore, la valutazione della biocompatibilità secondo ISO10993-1:2018 si effettua attraverso il test di citotossicità, il test di irritazione e il test di sensibilizzazione cutanea.

Tra gli approcci per studiare la citotossicità descritti nella ISO10993-5:2009, vi è il saggio di vitalità cellulare MTT, basato sulla capacità del sistema mitocondriale di trasporto di elettroni, ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre e quindi convertire un sale tetrazolico solubile MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H tetrazolio bromide] di colore giallo, in un prodotto insolubile quale i sali di formazano, di colore viola, in quantità direttamente proporzionale alla vitalità cellulare. Il numero delle cellule vitali è correlato all'intensità del colore, che viene valutato sotto forma di assorbanza, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro, dopo aver dissolto il formazano in alcool.

L'irritazione e la sensibilizzazione sono reazioni cutanee provocate dal contatto con particolari tipi di sostanze. Possono essere studiate rispettivamente mediante saggi in vivo come il "Primary Skin Irritation" e il "Guinea pig Maximization test" secondo quanto riportato nelle linee guida ISO10993-10. Tuttavia, si tratta di test che possono richiedere fino a 6 settimane per l'esecuzione. Per rispondere alle disposizioni del Decreto-legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15) in riferimento alla produzione in deroga di maschere facciali ad uso medico, si è proceduto a sviluppare un modello alternativo per studiare il potenziale di

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 4 / 17

irritazione e sensibilizzazione dei materiali. Si tratta di un modello accurato, specifico, semplice e di rapida esecuzione in condizioni di emergenza.

In letteratura sono riportati numerosi studi basati sull'utilizzo di cellule di origine umana con l'obiettivo di limitare la sperimentazione animale in accordo con il principio delle "3R - Refine, Reduce, Replacement" e nel contempo di ridurre la variabilità tra specie (Pupovac A et al. 2018; Vijayavenkataraman S et al. 2016). Numerosi sono i modelli di cute umana *in vitro* previsti al fine di sviluppare e standardizzare approcci alternativi per studiare l'irritazione e la sensibilizzazione. Essi sono ottenuti ad esempio, mediante tecniche di tissue engineering che prevedono l'associazione di cellule e biomateriali o più recentemente mediante tecnologia di bioprinting (Pupovac A et al 2018; Vijayavenkataraman S et al. 2016). Disponibili in commercio e ampiamente utilizzati vi sono gli skin equivalent come EPISKIN® o EpiDerm® inclusi nella ISO10993-10:2013 annex D come modello alternativo per lo studio di irritazione per i composti chimici - ma non applicabile per i dispositivi. Nell'ottica delle disposizioni del Decreto-Legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15), abbiamo selezionato modelli di studio semplificati basati su colture 2D di cellule umane. Questo approccio consente di ottenere risultati in tempi ridotti (5 giorni) grazie alla velocità di esecuzione dei test.

Un esempio di tale modello è fornito dalla pubblicazione di Sipahi H et al. avente il fine di studiare la biocompatibilità delle maschere chirurgiche disponibili in commercio valutando la citotossicità con saggio MTT e l'irritazione mediante la determinazione della concentrazione dei nitriti in seguito all'esposizione dell'estratto a popolazioni cellulari di fibroblasti murini (Sipahi et al. 2018). L'ossido nitrico (ON), metabolizzato da tre principali isoforme dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS), è coinvolto in numerosi processi fisiologici e patologici, come l'infiammazione. Poiché l'ON ha una emivita molto limitata, viene convertito istantaneamente e sturato sotto forma di nitriti (Shiva et al 2013).

I nitriti infatti sono il risultato di reazioni di ossido-riduzione della molecola di ON quando risulta essere in elevate concentrazioni.

L'irritazione è un processo di natura infiammatoria. Pertanto è importante, nella cute, la valutazione dell'espressione di NOS e la produzione di ON. E' riportato in letteratura che le principali popolazioni cellulari presenti nella cute, quali cheratinociti, fibroblasti, melanociti e cellule endoteliali esprimono NOS e sono capaci di rilasciare ON. (Grierson et al. 2004). In particolare, i fibroblasti producono spontaneamente NOS e NO, che risultano incrementati in

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 5 / 17

presenza di opportuni stimoli come ad esempio LPS, un lipopolisaccaride o agenti irritanti come il tritonX che sono in grado di stimolare cellule della cute come i fibroblasti e cellule del sistema immunitario, come macrofagi, a produrre citochine coinvolte (direttamente o indirettamente) nell'attivazione e richiamo di altri elementi cellulari del sistema immunitario (Wang R. et al. 1996; Kent et al. 1998).

Lo stato infiammatorio e di sensibilizzazione è il risultato di un processo complesso e ancora non del tutto noto di citochine e di cross-talk tra diversi tipi cellulari che compongono un tessuto come la cute. Le citochine sono prodotte da cellule del sistema immunitarie e non con il ruolo di mediare reazioni metaboliche di interazione tra diverse cellule al fine di generare un complesso stato infiammatorio (Juranova et al 2019).

L'IL-6 è una glicoproteina, prodotta e secreta da un ampio spettro di popolazioni cellulari, tra le quali ritroviamo cellule deputate alla risposta immunitaria innata e cellule B, ma anche cellule non appartenenti alla classe leucocitaria come cellule endoteliali, fibroblasti, astrociti e cellule epiteliali. Gli stimoli in grado di indurre il rilascio di IL-6 sono rappresentati da danno tissutale o stress cellulare e da altre citochine ad attività pro-infiammatoria. Poiché elevati livelli di concentrazione di IL-6 sono associati a diverse patologie infiammatorie, l'IL-6 è ritenuta essere un prodotto della risposta infiammatoria e un marker dell'infiammazione (Rincon 2012).

Alla luce delle considerazioni sopra riportate, in letteratura è possibile trovare studi che propongono la quantificazione di determinate citochine (tra le quali IL-6) per l'identificazione di sostanze sensibilizzanti e irritanti, in alternativa ai test *in vivo* richiesti dalla norma ISO 10993-10, al fine di ridurre l'utilizzo del modello animale.

In uno studio condotto da Gomes-Filho e colleghi, viene testata la biocompatibilità di un materiale endodontico attraverso studi citotossicità e determinazione dei livelli di citochine IL-6 (come mediatore del processo infiammatorio) e IL-1 β (come mediatore della proliferazione osteoblastica) rilasciate da fibroblasti di topo L929, attraverso saggio ELISA. In base ai risultati, il materiale testato ha indotto un rilascio di IL-6 non statisticamente maggiore rispetto al controllo, portando alla conclusione che tale materiale non inducesse il processo infiammatorio, risultando quindi sicuro dal punto di vista della biocompatibilità (Gomes-Filho et al. 2009).

Jung e collaboratori propongono invece un saggio di screening per differenziare le sostanze

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 6 / 17

sensibilizzanti dalle non sensibilizzanti attraverso la quantificazione delle citochine IL-6 e IL-1 α rilasciate da cheratinociti umani (HaCaT), come valida alternativa ai test *in vivo*. Nel caso dell'IL-6, il saggio ha mostrato una sensibilità del 69%, una specificità del 83% e un'accuratezza del 73%. Tali risultati suggeriscono quindi che la determinazione dei livelli extracellulari delle citochine pro-infiammatorie IL-1 α e IL-6 possono, potenzialmente, identificare sostanze sensibilizzanti per la pelle (Jung et al. 2016).

La norma ISO TR 15499:2016 (§6.3 Device Testing Consideration) raccomanda di adottare un approccio graduale per la valutazione biologica eseguendo quindi test *in vitro* al fine di ridurre, per quanto possibile, test su animali. Inoltre, come dichiarato dalla norma ISO 14971:2020, bassi rischi, sulla base di evidenze scientifiche, possono essere identificati e classificati come non richiedenti ulteriori misure di mitigazione. Tale approccio permette un minore spreco di risorse sulla ripetizione di test non necessari per materiali consolidati e valutati come sicuri per la specifica applicazione. Considerato che la ISO TR 15499:2016 è stata recepita completamente dalla ISO 10993-1:2018, si è deciso di procedere quindi con un approccio graduale, ritenendo una negatività nel test di quantificazione dei livelli di IL-6 e dei nitriti come verosimilmente indicativo del fatto che i campioni testati non diano origine a fenomeni di irritazione cutanea o reattività intracutanea; alla luce di queste considerazioni i test *in vivo* potrebbero essere considerati preliminari per stabilire la biocompatibilità del dispositivo testato.

Sulla base di quanto detto, lo studio proposto prevede la valutazione della citotossicità del campione tramite quanto previsto dalle linee guida UNI EN ISO 10993-5, in associazione alla valutazione della sua capacità irritante/sensibilizzante secondo la quantificazione di IL-6 e nitriti. Questa associazione di test, supportata da numerose evidenze presenti nella letteratura scientifica internazionale (Makene and Pool 2015; Advagic et al 2013; Piva et al 2013) consentirà di avere una indicazione globale degli effetti che la mascherina testata potrebbe avere a contatto con la cute integra al fine di prevedere effetti avversi tossici, irritanti, sensibilizzanti all'utilizzatore finale.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **7 / 17**

4 MATERIALI

4.1 Identificazione del Campione

Campione: maschera facciale

Parte del device che viene testata: porzione in contatto con la cute integra

Quantità di test: 1

Descrizione materiale: ULTRAMICROFIBRA 70%PE e dal 30% di poliammide tramatura TNT, 130g/m2. ID campione attribuita internamente: **0204GAL**

Sterile: il device non viene utilizzato in modo sterile

4.2 Standard

Controllo Positivo: Lattice ottenuto da "powder free surgical gloves "Adventa Health lotto 062681360 (scadenza 2020-12)

Controllo Negativo: Polietilene alta densità (HDPE), USP Reference Standard, cod. 1546707; lotto K0M357

4.3 Linee Cellulari

Fibroblasti murini L929 acquistati da Sigma-Aldrich cod. 85011425

Fibroblasti umani da prepuzio acquistati da ATCC cod. ATCC-SCRC-10-41; lot 63229645

4.4 Reagenti

- Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco cod. 31885023; lot 2131859; scadenza 31/12/2020
- Siero Bovino Fetale (SBF) HyClone; lot AC10240545; scadenza 03/2022
- Penicillina/Streptomina (P/S) Gibco cod. 15140-122; lot 2145453; scadenza 30/08/2020
- Glutamina Gibco cod. 25030-024; lot 20995B7; scadenza 05/2021
- Buffer fosfato (PBS) Dominique Dutscher cod. MS00AP100B; lot MS00AP; scadenza 22/07/2023
- Tripsina-EDTA Gibco cod. 15400-054; lot 2085657; scadenza 07/2021
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) Sigma-Aldrich M5655; lot MKCL1832
- Reagent di Greiss Sigma-Aldrich cod. G4410-10g; lot SLCC6697

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **8 / 17**

- LPS lipopolisaccaride da Escherichia coli O55:B5; Sigma-Aldrich cod. L2637-5mg; lot 068M4068V
- Triton X Sigma-Aldrich cod. T8787-50mL; lot MKBR5267V
- Trypan Blue Sigma-Aldrich cod. T8154-100ml; lot RNBH7515
- Isopropanolo Carlo Erba cod. P9A772079B; scadenza 02/2022
- Alpha-Lisa Human Interleukin 6 (IL-6) Kit, Perkin Elmer (Cod. AL223C); lot 2628936; Scadenza Ottobre 2020.

4.5 Consumabili

- Fiasche per Colture Cellulari T75 and MW96 (Greiner)
- Pipette da 2,5,10, 25mL (Clearline)
- Puntali sterili da 10, 200 e 1000uL (Clearline)
- Provette per centrifuga da 1mL (Eppendorf), a 15 e 50mL (Nunc)
- Filtri da siringa da 0,22 µm (Clearline)
- Siringhe da 5, 10 e 30mL (BBraun)
- Aghi per siringa 18G (Nipro)
- Forbici ad uso chirurgico (Histoline)
- Camera Burker (Biosigma)
- Reservoir 25mL sterili (Biosigma)

4.6 Strumenti

- Microscopio Ottico Invertito Observer Z1(Zeiss) certificato di calibrazione valido fino a febbraio 2021.
- Lettore multiplastrata Enspire (PerkinElmer)
- Pipette da 10, 200 e 1000µL (Eppendorf)
- Pipetta multicanale da 200µL (Eppendorf)
- Cappe a Flusso Laminare (Faster)
- Centrifuga (Thermo Scientific)
- Bagno termostato a temperatura controllata (memmert)
- Incubatori per colture cellulari 37°C, 5% CO₂ (Thermo Scientific)

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 9 / 17

- Agitatore Orbitale - Incushaker A 37°C (Benchmark)

5 Metodi

Le mascherine chirurgiche sono classificate, secondo l'Allegato A della norma ISO 10993-1:2018 (tabella 1) come dispositivo medico superficiale a contatto con la pelle integra per una durata <24 ore fino a 30 giorni considerando un'esposizione cumulativa. Pertanto, i test da effettuare sono citotossicità, irritazione cutanea e sensibilizzazione.

Per rispondere alle disposizioni del Decreto Legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15) per la produzione in deroga di maschere facciali ad uso medico si è proceduto alla valutazione biologica dei dispositivi in oggetto attraverso saggio di citotossicità secondo norma ISO 10993-5:2009 e alla valutazione della sensibilizzazione cutanea (ISO 10993-10:2010) *in vitro* attraverso la determinazione dell'IL-6 su fibroblasti umani e attraverso la determinazione dei livelli dei nitriti tramite saggio di Griess.

5.1 Saggio di Citotossicità

Le cellule L929 sono state scongelate e seminate secondo le istruzioni indicate dal fornitore a 15.000 cellule/cm² in piastre T75 per colture cellulari con DMEM + 10%FBS + 1% P/S + 1% glutammina e lasciate in atmosfera controllata a 37° C con 5%CO₂. Tre giorni dopo la semina, le colture sono state trattate per 5 minuti con una soluzione di 0,05% di tripsina-EDTA 0,02% a 37°C con 5% di CO₂. L'azione enzimatica è stata successivamente inibita con DMEM addizionato con 10% FBS, e la sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e il pellet cellulare risospeso nel terreno di coltura per la conta delle cellule mediante colorazione con Trypan Blue 0,4%. Le cellule L929 sono state poi seminate ad una concentrazione di 10.000 / 100µl, per ciascun pozzetto della piastra MW96, secondo normativa ISO10993-5:2009. Le piastre MW96 ottenute sono state e lasciate in atmosfera controllata per 24 ore a 37°C con 5% di CO₂, prima di aggiungere l'estratto.

L'estratto è stato preparato con terreno di coltura composto da DMEM e addizionato del 10% FBS e 1% di antibiotico secondo una procedura interna validata presso il tecnopolo, considerando il materiale/i materiali che entrano in contatto con la pelle intatta, esclusi gli elastici e/o fascette che passano per le orecchie.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 10 / 17

Lattice e HDPE sono stati utilizzati come materiali di riferimento, rispettivamente come controllo positivo e negativo, in accordo alla ISO10993-12:2012 e ISO10993-5:2009.

L'estrazione è stata eseguita con contenitori chimicamente inerti in agitazione a 37°C per 24 ore. Successivamente gli estratti sono stati filtrati con filtro da 0,22µm ed aggiunti alle colture cellulari con le seguenti diluizioni: 100%, 46,41%, 21,54% e 10%. Le cellule mantenute con il solo terreno di coltura sono di seguito definite blank. I controlli e le diluizioni dell'estratto sono stati somministrati alle colture cellulari e lasciate in incubatore per 24 ore a 37°C con 5% di CO₂. il saggio è stato condotto in sestuplicato.

Dopo 24 ore, la valutazione qualitativa delle cellule è stata eseguita mediante osservazione al microscopio, secondo i parametri della tabella 1, paragrafo 8.5.1, ISO10993-5:2009 riportata di seguito. Il conseguimento di un grado numerico maggiore di 2 è considerato un effetto di citotossicità.

Grado	Reattività	Condizioni della coltura
0	Nessuna	Granuli intracitoplasmatici discreti, nessuna lisi cellulare, nessuna riduzione della crescita cellulare.
1	Leggera	Non più del 20% delle cellule con morfologia arrotondata vagamente attaccate e senza granuli intracitoplasmatici. Oppure nessuna alterazione della morfologia o presenza alcune cellule lisate. Osservazione di una leggera inibizione della crescita.
2	Media	Non più del 50% delle cellule con morfologia arrotondata e senza granuli intracitoplasmatici, nessuna lisi cellulare estesa; non è osservabile più del 50% di inibizione della crescita cellulare.
3	Moderata	Non più del 70% di cellule ha un aspetto morfologico arrotondato e gli strati cellulari contengono cellule lisate. Gli strati cellulari non sono completamente distrutti, ma vi è un'inibizione della crescita superiore al 50%.
4	Severa	Quasi completa distruzione degli strati cellulari

Tabella1. Classificazione morfologica qualitative della citotossicità degli estratti

La valutazione quantitativa è stata determinata tramite saggio MTT. Sono stati aggiunti 50µl di soluzione MTT per ogni pozzetto per 2 ore a 37°C. La misura della vitalità cellulare è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro a lettore multiplacchetta (Enspire, Perkin Elmer), dopo la rimozione della soluzione MTT e la successiva sospensione delle cellule in 100µl di isopropanolo.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **11 / 17**

Il formazano è stato misurato con lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570nm.

○ Analisi dei dati

Per calcolare la riduzione della vitalità rispetto al blank, è stata utilizzata la seguente formula:

$$Viability (100\%) = \frac{100 * OD450e}{OD450b}$$

dove

OD450e è il valore medio della densità ottica misurata degli estratti al 100% del campione di prova;

OD450b è il valore medio della densità ottica misurata del blank.

Se la vitalità è <70% rispetto al blank, il campione analizzato ha un potenziale citotossico.

La vitalità è riportata come media ± deviazione standard.

Criteria di accettabilità

- Valutazione qualitativa

Controllo negativo ≤ 1

Controllo positivo ≥ 3

- Valutazione quantitativa

Il saggio è ritenuto affidabile se l'estratto del 50% del campione in esame ha una vitalità uguale o maggiore a quella dell'estratto al 100%.

La deviazione standard di ogni Gruppo deve essere ≤ 18%.

La percentuale della vitalità cellulare del controllo positivo deve essere < 70%.

5.2 Saggi *in vitro* alternativi per valutare infiammazione e sensibilizzazione

La determinazione dei nitriti e della citochina IL-6 sono stati eseguiti utilizzando fibroblasti umani.

Le cellule sono stati scongelate e seminate secondo le istruzioni riportate dal fornitore a 8.000 cellule/cm² in piastre T75 per colture cellulari con DMEM + 10%FBS + 1% P/S + 1% glutammina e lasciate in atmosfera controllata a 37° C con 5%CO₂. Tre giorni dopo la semina,

Fondazione Democenter-Sipe

via P. Vivarelli 2, 41125 – Modena • P.I. e C.F. 01989190366 • Tel. +39 059 2058146 - Fax +39 059 2058161
info@fondazioneemocenter.it • democentersipe@pcert.it • www.democentersipe.it

Tecnopolo di Mirandola

via 29 Maggio 6, 41037 Mirandola (Mo) • www.tpm.bio • Tel +39 0535 613801

FormTPM 010 Rev04 del 12.04.2018

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **12 / 17**

le colture sono state trattate per 5 minuti con una soluzione di 0,05% di tripsina-EDTA 0,02% a 37°C con 5% di CO₂. L'azione enzimatica è stata successivamente inibita con DMEM + 10% FBS, e la sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e il pellet cellulare risospeso nel terreno di coltura per la conta delle cellule mediante colorazione con Trypan Blue 0,4%. I fibroblasti umani sono stati poi seminati ad una concentrazione di 5000 cellule/100µl per ciascun pozzetto della MW96 e posti in incubatore per colture cellulari a 37°C, 5%CO₂ per 24 ore. Successivamente il terreno è stato sostituito con il 100% di estratto del campione, con il terreno di coltura rappresentato dal controllo negativo (CTRL-) e da 8 µg/mL di LPS per il saggio AlphaLISA e da 1,5% Triton X100 per il test dei nitriti come controlli positivi (CTRL+).

Dopo 4 e 24 ore di incubazione i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione rispettivamente della concentrazione dei nitriti e della citochina IL-6. Al fine di ottenere determinazioni più accurate delle molecole entrambi i saggi sono stati eseguiti in replicato.

5.2.1 Determinazione dei nitriti

I surnatanti sono stati incubati con reagente Greiss [1% sulfanilamide e 0,1% N- (1-naftil) etilendiammina diidrocloreuro] per 10 minuti a temperatura ambiente in accordo a Sipahi et al 2018.

La quantità di nitriti nei surnatanti è stata determinata in assorbanza a 570 nm usando uno spettrofotometro (Enspire, Perkin Elmer) e quindi calcolata usando una curva standard di nitrito di sodio generata con il range 100 µM-1,25 µM. Il controllo positivo utilizzato è il Triton X 100 1,5% (Juranova J et al. 2019). il controllo negativo è costituito da cellule coltivate con solo terreno di coltura.

I valori sono riportati come media ± deviazione standard.

5.2.2 Determinazione dell'IL-6

L'analisi e la quantificazione della citochina è stata effettuata utilizzando la tecnica Alpha-Lisa. Questa metodologia, sviluppata dall'azienda Perkin Elmer, offre il vantaggio di utilizzare piccoli volumi di materiale (5 µL), di avere un range dinamico molto ampio tale da poter evitare la diluizione del campione. Inoltre, non prevedere lavaggi e viene eseguito in tempi molto ridotti

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_58

Edizione: 01

Pagina: 13 / 17

rispetto ad un classico ELISA. Un volume pari a 5 µL di terreno di coltura di ciascun campione è stato distribuito nei pozzetti delle piastre multi-well "White ½ Area Plate" - 96 e incubati per 1h a temperatura ambiente con 20 µL di una soluzione composta da "Acceptor Beads" e dall' anticorpo anti-analita. Successivamente, 25 µL di una soluzione composta da "Donor Beads" in Alpha-Lisa Buffer sono stati aggiunti in ogni pozzetto lasciando nuovamente incubare per 30 minuti al buio. Terminato questo periodo, la piastra è stata analizzata dallo strumento EnSpire Plate Reader (Perkin Elmer) con un protocollo dedicato ai saggi Alpha-Lisa e impostando una $\lambda = 615$ nm. Per ottenere una quantificazione più accurata delle molecole in oggetto, ogni test è stato condotto in replicato.

Il controllo positivo utilizzato è LPS (8 µg/mL). Il controllo negativo è costituito da cellule coltivate con il solo terreno di coltura. I valori sono riportati come media dei livelli di espressione della citochina IL-6 (pg/mL) con la deviazione standard relativa espressa in percentuale.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **14 / 17**

6 RISULTATI

6.1 Valutazione della citotossicità

- Valutazione qualitativa

Dopo 24 ore di incubazione con l'estratto, è stata eseguita una valutazione qualitativa sulla coltura cellulare di L929 e riportata nella tabella 2. Nel controllo negativo le L929 hanno conservato la loro morfologia fisiologica e non è stata osservata nessuna lisi cellulare, riduzione della crescita cellulare, presenza di granuli intracitoplasmatici. Al contrario, nel controllo positivo si è osservata la distruzione degli strati cellulari. I criteri di accettabilità sono stati soddisfatti.

ID Campione	Blank	HDPE	Lattice	Estratto 100%
0204GAL	0	0	4	0

Tabella 2. Valutazione qualitativa

- Valutazione quantitativa

Nella tabella 3 abbiamo riportato la densità ottica (OD) 570nm.

Replicati	Blank	HDPE	Latex	0204GAL			
				100%	46,41%	21,54%	10%
1	0,31	0,54	0,05	0,38	0,38	0,53	0,53
2	0,36	0,61	0,05	0,41	0,43	0,58	0,57
3	0,39	0,53	0,05	0,39	0,39	0,53	0,56
4	0,35	0,45	0,06	0,41	0,47	0,54	0,56
5	0,38	0,39	0,05	0,40	0,39	0,53	0,56
6	0,40	0,41	0,05	0,41	0,39	0,55	0,45

Tabella 3. Densità ottiche rilevate con lo spettrofotometro a 570nm

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **15 / 17**

	Blank	HDPE	Latex	0204GAL			
				100%	46,41%	21,54%	10%
Media della vitalità	100	134,44	14,09	110,08	112,38	149,49	148,3
Deviazione Standard	3,25	8,6	0,21	1,15	3,44	2,25	4,41

Tabella 4. Vitalità media ± deviazione standard espresse in percentuale

I criteri di accettabilità sono stati soddisfatti.

6.2 Valutazione dell'irritazione e sensibilizzazione mediante misura dei nitriti e dell'IL-6

La tabella 5 riassume la media dei livelli di concentrazione dei nitriti espressa in μM ± deviazione standard.

Le concentrazioni sono state ottenute interpolando i valori di densità ottica con una curva standard con 8 punti di concentrazione (100 – 1,25 μM). Lo scarto quadratico medio $R^2 = 0,99$.

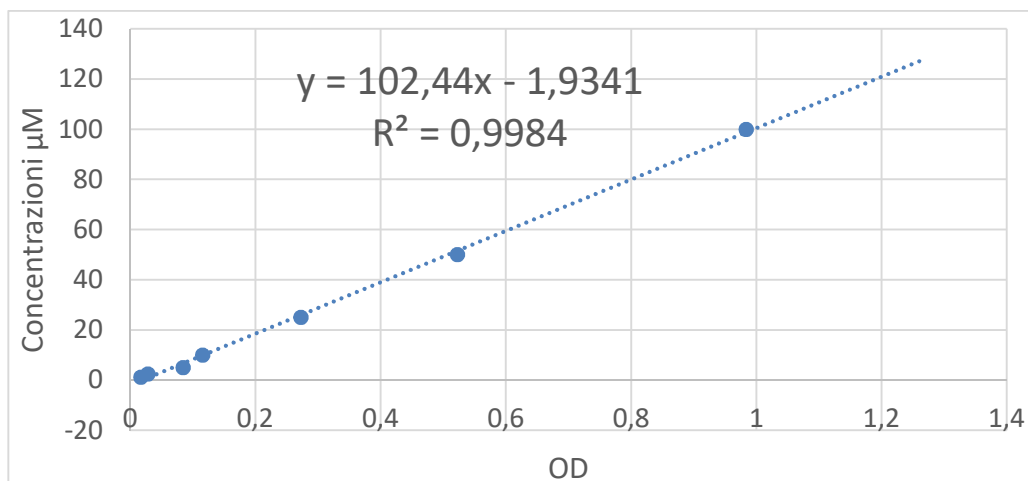


Figura 1. Curva Standard per Concentrazione dei nitriti

ID Campione	Concentrazione dei nitriti (μM)			Valutazione
	CTRL -	CTRL+	Campione	
0204GAL	Non rilevato	59,63±4,13	Non rilevato	Negativo

Tabella 5. Concentrazione dei nitriti riportata come media ± deviazione standard

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **16 / 17**

La tabella 6 riassume la media dei livelli di espressione della citochina IL-6 (pg/ml) con il valore di deviazione standard relativa espressa in percentuale (RSD%).

Le concentrazioni sono state ottenute interpolando i valori di densità ottica con una curva standard come indicato dal datasheet. Lo scarto quadratico medio $R^2 > 0,99$.

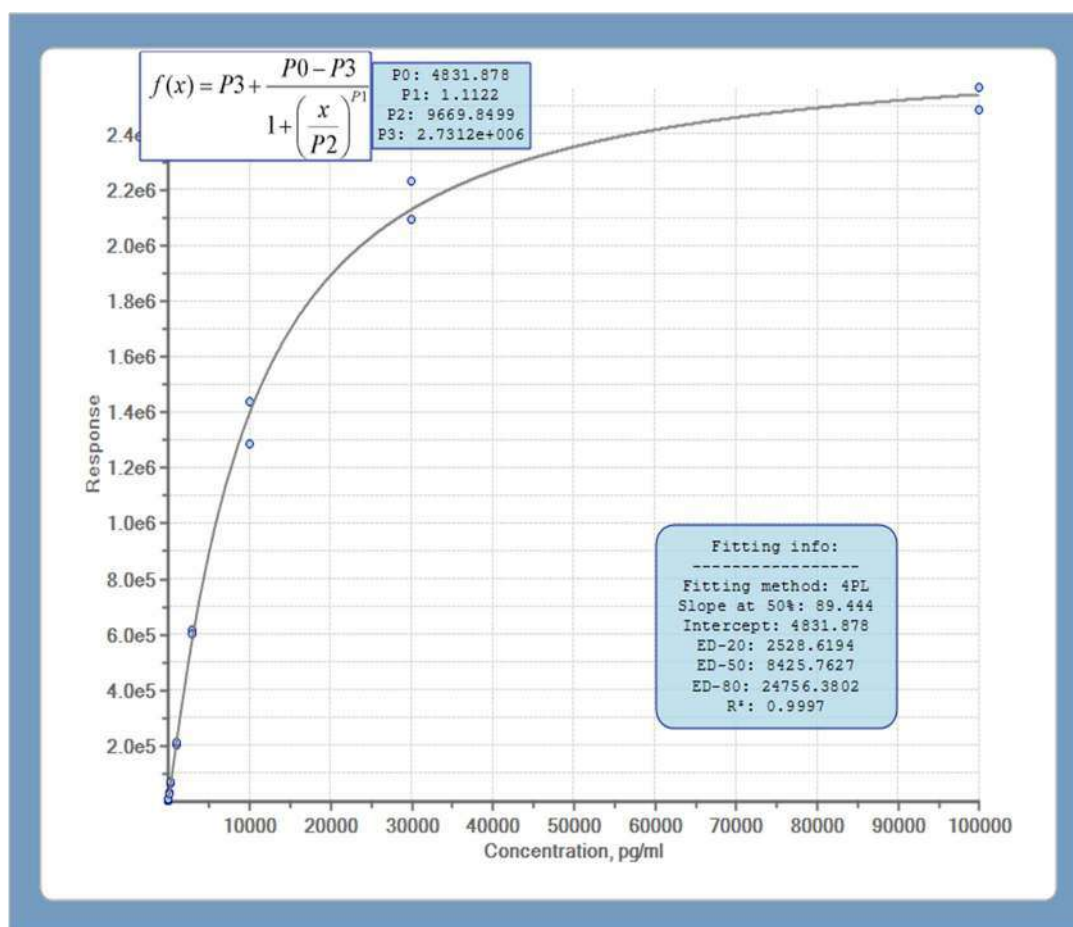


Figura 2. Curva Standard per Concentrazione della citochina IL-6

ID Campione	IL-6 pg / mL			Valutazione
	CTRL - (RSD%)	CTRL+ (RSD%)	Campione (RSD%)	
0204GAL	105,8 (6,9%)	2296,4 (0,3%)	90,7 (10,7%)	<CTRL -

Tabella 6. Concentrazione della citochina IL-6 riportata come media e deviazione standard relativa espressa in percentuale.

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_58**

Edizione: **01**

Pagina: **17 / 17**

7 CONCLUSIONI

Il campione risulta non citotossico in accordo con le linee guida ISO10993-5:2009.

Dai risultati ottenuti *in vitro* il campione non risulta irritante/sensibilizzante.

8 BIBLIOGRAFIA

- Avdagić et al 2013. "Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease". *Bosn. J. Basic Med. Sci.*
- Cals-Grierson M.M. and Ormerod A.D. 2004. "Nitric oxide function in the skin." Nitric Oxide.
- Gomes-Filho, João Eduardo et al. 2009. "Evaluation of the Effects of Endodontic Materials on Fibroblast Viability and Cytokine Production." *Journal of Endodontics.*
- Jung, Daun et al. 2016. "Discrimination of Skin Sensitizers from Non-Sensitizers by Interleukin-1 α and Interleukin-6 Production on Cultured Human Keratinocytes." *Journal of Applied Toxicology.*
- Juranova J et al. 2019. "Modulation of Skin Inflammatory Response by Active Components of Silymarin" *molecules.*
- Kent et al. 1998. "Effect of Lipopolysaccharide and Inflammatory Cytokines on Interleukin-6 Production by Healthy Human Gingival Fibroblasts". *Infect Immun.*
- Makene and Pool 2015. "The assessment of inflammatory activity and toxicity of treated sewage using RAW264.7 cells". *Water Environ J.*
- Piva et al 2013. "Assessment of inflammatory and oxidative biomarkers in obesity and their associations with body mass index". *Inflammation.*
- Pupovac A. et al. 2018. "Toward Immunocompetent 3D Skin Models." *Advanced Healthcare Materials.*
- Rincon, Mercedes. 2012. "Interleukin-6: From an Inflammatory Marker to a Target for Inflammatory Diseases." *Trends in Immunology.*
- Sipahi H et al. 2018. "Investigation of the biocompatibility of Surgical Masks." *Pteridines.*
- Vijayavenkataraman S et al. 2016. "3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes." *Biofabrication.*
- Wang R. et al. 1996. "Human dermal Fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms." *J. Invest. Dermatol.*

ALLEGATI TECNICI



Technical Safety Information Sheet on a voluntary basis (TSIS) according to EC 1907/2006

SEC/RIS/DOC/004
Version 2
Date : 14/03/2014
Page : 1 / 4

Date of issue: 18/03/2014

Date of revision: 14/03/2014

1. Product- and company identification: Fabric made of micro-filaments:
Trade name : EVOLON
Company : **FREUDENBERG EVOLON**
20 Rue Ampère
F - 68020 COLMAR
Telephone : ++33 389 206 400
Telefax : ++ 33 389 206 409
Information department : Management System
e-Mail address : jean.chilles@freudenberg-nw.com
Telephone : ++ 33 389 206 485
Telefax : ++ 33 389 206 409

2. Possible hazards No hazardous product under normal conditions.
Special hazard reference Accidental thermal decomposition or melting state may cause hazards

3. Composition / information on ingredients

This document provides Material Safety Information (TSIS) for nonwovens on a voluntary basis. The TSIS is a means of forwarding essential hazard information (including information on transport, handling, storage and emergency actions) from the supplier of a nonwoven product to the recipient of this product. As nonwovens are generally not hazardous, TSIS is not legally requested but must be considered as information. It is based on the EC recommendation for MSDS (EC 1907/2006).

The information contained in this Material Safety Information Sheet has been compiled to the best of our knowledge upon the explicit request of the customer. Therefore, the manufacturer does not assume any liability with respect to the correctness and/or completeness of the information provided by this Material Safety Information Sheet. The customer in particular shall not be released from his duty to check all safety-relevant properties of the delivered nonwovens, and to comply with the local official regulations.

Chemical nature (product)

Description : Nonwovens made of Polyethylene Terephthalate (PET) and Polyamide being hydro entangled
May contain : Polyethylene Terephthalate (PET) and Polyamide

4. Further information : hydrophilic and antistatic substances

5. First-aid measures

General advice : Under normal condition ...
Inhalation : no specific measures to be taken
Skin contact : no specific measures to be taken
Eye contact : no specific measures to be taken
Ingestion : no specific measures to be taken
Information for the doctor :

6. Fire fighting measures

Suitable extinguishing means : Pulverized water / Foam / Carbon dioxide / Dry powder
Unsuitable extinguishing means : NA
Exposure hazards : Burning may release toxic combustion gases: Carbon oxide, Carbon dioxide, gas generated from the decomposition of Polyamide and Polyethylene Terephthalate (PET).
Protective equipment for fire fighters : Use full protective clothing against chemicals and self-contained breathing apparatus.
Further information : For flammable and toxic fumes as well as skin contact with molten



FREUDENBERG EVOLON
20 RUE Ampère
F - 68027 COLMAR Cedex

We ^{all} take care!



Technical Safety Information Sheet on a voluntary basis (TSIS) according to EC 1907/2006

SEC/RIS/DOC/004
Version 2
Date : 14/03/2014
Page : 2 / 4

materials see § 10

6. Accidental release measures

Not applicable

Personal precautions :
Environmental precautions :
Methods for cleaning :
Further information :

7. Handling and storage

Normal requirements

Handling :
Protection against fire and explosion :
Storage : Vertical storage in an appropriate manner in order to avoid the rolls of Nonwovens could start rolling (risk of crushing the fabric)
Humidity protection
Protection against direct sunrays

8. Expose controls and personal protection

No specific measures

Technical protective measure :
Exposure control limits :

Personal protective equipment

Respiratory protection :
Hand protection :
Eye protection :
Skin protection :

General safety and hygiene measures

Measures :

9. Physical and chemical properties

Appearance : Substrate formed by Polyamide and Polyethylene Terephthalate (PET) filaments of solid nonwoven

Colour : white or according to customers specifications
Odour : Not applicable

Changes in physical state

Boiling point/Boiling range (°C) : Not applicable
Melting point (°C) : 220°C
Freezing temperature (°C) :
Flash point (°C) : Not applicable
Ignition temperature (°C) : > 400°C
Auto ignition :
Explosion hazard : Not applicable
Explosion limits (Vol.-%) : Not applicable
Vapour pressure (mbar) : Not applicable
Density (g/cm³) : 180 to 250Kg /m³
Bulk density (kg/m³) : Not applicable
Solubility in water : Not applicable
Solubility in other solvents : partially in an acid medium
pH-value : Not applicable
Viscosity :
Additional information



FREUDENBERG EVOLON
20 RUE Ampère
F – 68027 COLMAR Cedex

We ^{all} take care!



Technical Safety Information Sheet
on a voluntary basis (TSIS)
according to EC 1907/2006

SEC/RIS/DOC/004
Version 2
Date : 14/03/2014
Page : 3 / 4

10. Stability and reactivity

- Conditions to avoid : Under thermal decomposition flammable and toxic fumes may be generated.
- Substances to avoid :
- Hazardous decomposition products : Above 300°C toxic and flammable gases like carbon monoxide can be released.
The generation of decomposition and oxidation products is subject to fire conditions. Non burned residues and water contaminated after fire fighting should be disposed of in compliance with official regulations.
- Additional information : Molten material should not be contact with skin as it may adhere and cause burns.

11. Toxicological information

- Acute toxicity :
- Specific symptoms in animal experiments :
- Irritation effects :
- Sensitization :
- Subacute to chronic toxicity :
- Carcinogenicity, mutagenicity, teratogenicity :
- Information from practical experience :
- Additional information : No toxic reaction known under normal conditions.
- Note : Under decomposition conditions; toxic fumes and contaminated water, see § 10.

12. Ecological information

- Biodegradability :
- Ecotoxicity :
- Further ecological information : For transportation, storage, normal use, no toxicological effect is known. Possible water pollution, if components are washed out.

13. Disposal considerations

- Product : Nonwovens can be disposed of as non-hazardous solid waste, under compliance with the local regulations.
The possibility of recycling has to be checked
- Disposal code number :
- AVV-Code : 040222

14. Transport information

Not classified as dangerous in the terms of transport regulations.

15. Regulatory information

- Labelling according to EC-regulation : The product / is not required to be labelled according to EC regulations.
- National directives :

16. Other information

The information contained herein is based on the present state of knowledge and does not therefore guarantee certain properties. The technical safety information sheet only describes the products in aspect to their safety requirements.
Recipients of our products must take on responsibility for observing existing laws and regulations.



FREUDENBERG EVOLON
20 RUE Ampère
F – 68027 COLMAR Cedex

We ^{all} take care!



Technical Safety Information Sheet
on a voluntary basis (TSIS)
according to **EC 1907/2006**

SEC/RIS/DOC/004
Version 2
Date : 14/03/2014
Page : 4 / 4



FREUDENBERG EVOLON
20 RUE Ampère
F – 68027 COLMAR Cedex

We ^{all} take care!

MATERIAL DATA SHEET

Technical Data

Filament blend	70% PET / 30% PA 6		
Evolon weight	130 g/m ²		
Web bonding (EN 29092)	hydrolace		
Mass per unit area (EN 9073-1)	g/m ²	target	130
Thickness (regarding ISO 9073-2)	mm	target	0,45
Tensile strength Machine direction (EN 13934-1)	N	target	400
Tensile strength Cross direction (EN 13934-1)	N	target	400
Tear strength Machine direction (EN 13 937)	N	target	10
Tear strength Cross direction (EN 13 937)	N	target	10
Elongation at break Machine direction (EN 13934-1)	%	target	50%
Elongation at break Cross direction (EN 13934-1)	%	target	50%
Absorption of water (regarding DIN 53923-78)	ml / m ²	target	500
Roll make-up	Inner Core diameter	mm	150
	Max. diameter	mm	850
	Standard width	mm	2050
	Standard length	m	1000

evolon®

MICROFILAMENT TEXTILES

Based on Domestic washing and drying procedures for textile testing (ISO 6330:2000).

Article reference: EVO 100

WASHING RECOMMENDATIONS



Machine wash, hot. 95°C.



Do not bleach.



Tumble dry, normal or medium heat.



Iron, medium (150°C). Can be steamed.



Dry clean, any solvent.

Do not use softener.

The customer is responsible for conducting his/her own tests to determine for him/herself the suitability of the products for his/her particular purposes. The customer is especially responsible for testing the suitability of the product for specific post-treatments before large-scale production.

The product brand marked ® is a registered trademark of Carl Freudenberg KG in several countries.

Latest update: 08/11/2017

Freudenberg Performance Materials s.a.s. · 20, rue Ampère · 68027 Colmar · France · evolon@freudenberg-pm.com · www.evolon.com · www.freudenberg-pm.com

FOTO DEL PRODOTTO

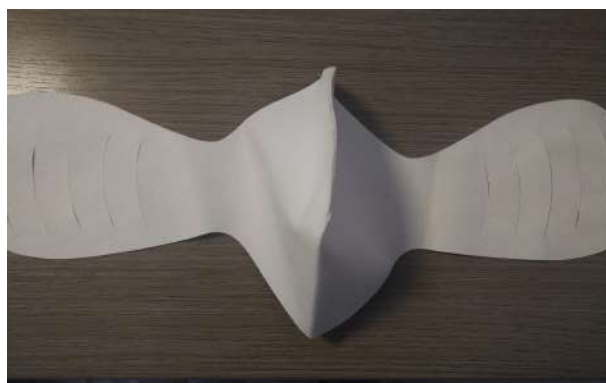
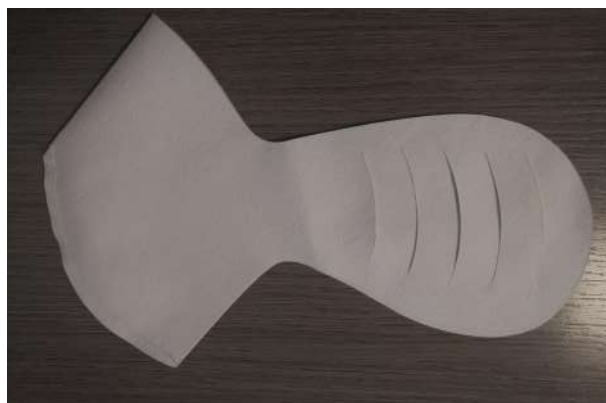


FOTO RELATIVE ALLA PRODUZIONE E AL CONFEZIONAMENTO

