



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 03 de junho de 2021.

Empresa Solicitante:

Bioseta Saúde Ambienata Ltda
Rua Monteiro Lobato, 341 - Bairro Novo Esteio
Esteio/RS
A/C Sr. Bruno Osório dos Santos
(51) 3396-6161/ (51) 98427-3653
bruno@bioseta.com.br

Referente: Ensaios antivirais no Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE

Vimos por meio desta enviar o relatório do ensaio virucida realizada neste laboratório.

1. Produto:

Gardian Safe

Tratamento ativo através da geração de oxidantes naturais com tecnologia PHI (foto-hidroionização) e ionização com célula UV-C 254 nm

Área de cobertura de até 800 m² e

Vazão de ar de até 17000 m³/h

Dimensões: 52 cm de altura, 28 cm de largura e 32 cm de profundidade.



Data chegada ao laboratório: 12/05/2021

Data Resultado: 02/06/2021

2. Vírus testado: Coronavírus cepa MHV-3 gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS e outros).

Vírus	Linhagens Celulares
Coronavírus MHV-03	Célula: L929 NCTC clone 929 L cell, (ATCC® CCL-1™)



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 03 de junho de 2021.

3. Procedimento experimental:

- a) Os ensaios foram realizados em laboratório NB-2 (Biosafety Level 2) seguindo as Recomendações da ANVISA Art. 1 e Art. 3 da IN 04/13 e IN 12/16 (obedecendo as Boas Práticas de Laboratório-BPL), metodologias descritas nas normas (EN14476:2019, ASTM E1053 – 11 e do Instituto Robert Koch – RKI).
O meio de cultura para vírus e linhagens celulares foi utilizado o Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) contendo 2% a 10% de soro fetal bovino.
- b) A titulação do Coronavírus (Cepa MHV-3) foi realizado de acordo com o método DICC₅₀ (Doses Infectantes de Cultivos Células 50%). Diluições sequenciais do vírus na base 10 foram realizadas em 06 repetições, em microplacas 96 orifícios estéreis. A seguir foram adicionadas as células L929 com uma concentração de 2×10^5 células/orifício. Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.
- c) Resumidamente o ensaio antiviral com o **Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE** foi realizado da seguinte forma:
Na entrada do ar do equipamento foi adicionado um nebulizador contendo Coronavírus-MHV-3 (100 DICC/mL). O equipamento ficou ligado por diferentes tempos para "aspirar" o vírus.
Na saída do ar foram acopladas Placas de Petri com Filtros Estéreis umedecidos com meio de cultura sem vírus.
- d) As amostras com "filtros em placa de Petri" foram obtidas em diferentes tempos pré-determinados: 1, 5, 15 e 30 minutos. Após cada tempo as placas foram recolhidas, lacradas e congeladas a -80°C até o momento do uso.
- e) As amostras foram descongeladas e testadas:
 - e.1) para a "Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)" na célula testada, para determinar a concentração que não causa toxicidade para a célula. Pois a ação do plasma deve ser ativa somente e contra o vírus e não às células.



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 03 de junho de 2021.

e.2) As placas foram submetidas a avaliação quanto a inibição ou não do vírus, a saber: Cada suspensão (Vírus + Diferentes amostras e diferentes tempos de contato) foi pipetada 100 µL em microplacas, homogeneizadas e diluídas.

- Em seguida 100 µL da célula (L929) foram pipetadas sobre a suspensão e incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.

f) Após o período de incubação as microplacas foram lidas através de Microscópio Ótico Invertido na busca do Efeito Citopático característico do vírus (verifica-se a falta ou não do efeito citopático (ECP) da infecção viral) e os títulos foram calculados com base no método de Reed and Muench, 1938.

Os resultados são expressos em percentual inativação viral (Tabela 1) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

Resumo:

Controle Positivo: filtros estéreis com DMEM que recebeu ar com Vírus no "Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE" (diferentes tempos) + Cultivo de Células;

Controle Negativo: controle de células, apenas sistema celular, sem a presença de vírus e sem a presença equipamento;

Controle do vírus: titulação Coronavírus (10¹ a 10¹⁰) e cultivo celular.

Tabela 1 - Os resultados são expressos em percentual de inativação viral em comparação com o controle viral não tratado:

Log de Redução	Fator de Redução	Percentual de Inativação/Redução
1	10	90%
2	100	99%
3	1000	99,9%
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%
6	1.000,000	99,9999%

<https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 03 de junho de 2021.

4. Resultados:

4.1) Título Coronavírus (MHV): $10^{8,25}$ DICT50/mL e a redução da infectividade viral foi $\geq \log 4$ (virucida).

Tabela 2. Ação Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE em relação ao Coronavírus, em diferentes tempos de contato e o teste de citotoxicidade.

Equipamento	Tempos de contato	Coronavírus Resultados em percentual de inativação e Atividade (tabela 1)	Teste in vitro Citotoxicidade Linhagem Celular L929
Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE	1 minuto	99,99% de atividade antiviral	NÃO TÓXICO
	5 minutos	99,99% de atividade antiviral	
	15 minutos	99,99% de atividade antiviral	
	30 minutos	99,99% de atividade antiviral	

5. Conclusões:

- Considerando que houve inativação de até 99,99% ($\log \geq 4$) da contaminação viral é possível concluir que o **Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE** foi eficaz na destruição de partículas virais.
- Portanto, o Equipamento Purificador de Ar GARDIAN SAFE é recomendado para uso virucida no combate ao grupo Coronavírus, e assim como, auxilia na eliminação de SARS-COV-2 no ar/ambiente.
- O produto do **Purificador de Ar GARDIAN SAFE** em contato com as células L929 (sem vírus), não foi tóxico.

Prof. Dra Clarice Weis Arns (ID Lattes: 8635038112182716)
(Responsável pelo Laudo)



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 03 de junho de 2021.

Bibliografia Consultada:

ANVISA - Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 2 DE JULHO DE 2013
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/int0004_02_07_2013.html

ANVISA- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 11 DE OUTUBRO DE 2016 – ANVISA.
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-12-2016-anvisa/>
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-in-no-50-de-3-de-dezembro-de-2019-anvisa/>

BS EN 14476:2013+A2:2019

Incorporating corrigendum August 2019
Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

DIN EN 14476:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements [phase 2, step 1].
Brussels 2015, CEN-Comité Européen de Normalisation.

ASTM E1053 – 11: Standard Practice to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces. This standard is issued under the fixed designation E1053; *This international standard was developed in accordance with internationally recognized principles on standardization established in the Decision on Principles for the Development of International Standards, Guides and Recommendations issued by the World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee.*
<https://compass.astm.org/download/E1053.26326.pdf>
https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?E1053+20

Rabenau HF, Schwebke I, Blumel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P.
Guideline of the German Association for the Control of Virus Diseases (DVV) e.V. and the **Robert Koch-Institute (RKI)** for testing chemical disinfectants for effectiveness against viruses in human medicine. Version of 1st December, 2014.
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.
2015;58: 493–504

Reed, L.I.; Muench, H.;

A simple method of estimating fifty percent endpoints.
Journal of Epidemiology, Volume 27, Issue 3, 1 May **1938**, Pages 493–497.