



Laudo Virucida UNICAMP



Cartech Air+ Zero a 60 dias





Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Empresa Solicitante:

CARTECH Automotive Systems

Rua Guido Segalho, 633 - Sumaré/SP

A/C Sr. Reginaldo Moretti

(19)9816-6700

reginaldo@cartechautomotive.com.br

**Referente: LAUDO TÉCNICO AÇÃO VIRUCIDA –
CARTECH automotive systems AIR + com 60 dias de ação**

Vimos por meio desta enviar o relatório do ensaio eficácia a vírus realizado neste laboratório.

1. Introdução:

O presente estudo foi conduzido utilizando a metodologia descrita em "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)* e “ASTM E1053 – 11: Standard Practice to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces” com adaptações necessárias.

1.1. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade virucida durante 60 dias do produto Limpador automotivo “CARTECH automotive systems AIR+” em diferentes tempos de ação frente aos Coronavírus cepa MHV-3 e NOROVÍRUS.

1.2. Instalação de Teste e Período de Condução do Estudo:

Os ensaios foram realizados em laboratório de Virologia, NB-2 (Biosafety Level 2), Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas- SP- Brasil. Seguindo as Recomendações da ANVISA Art. 1 e Art. 3 da IN 04/13 e IN 12/16 e metodologias descritas nas normas (BS EN 14476:2013+A2:2019 e ASTM E1053 – 11).

As datas abaixo representam o período em que o estudo foi conduzido.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Data chegada ao laboratório:	27/11/2023
Início do Estudo	04/12/2023
Término do Estudo	19/12/2023
Emissão de laudo	19/12/2023

1.3. Pessoal envolvido no Estudo:

Coordenadora do Estudo	Clarice Weis Arns
Pessoal Técnico	Ana Paula Moraes, Gislaíne S. Jacinto

2. Materiais e Métodos

Dispositivo de nebulização: Nano spray gun e limpador automotivo Air +

Marca: Cartech



Figura 1. Dispositivo para nebulização Nano spray gun Cartech e limpador automotivo Air + contendo íons Ag+ (Cartech)



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

2.1 Condições experimentais

Temperatura do ensaio	25 °C +/- 1 °C
Produto	Desinfetante automotivo Air +
Controle de citotoxicidade	Teste <i>in vitro</i> na linhagem celular para a “Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD)”, para definir a concentração que não causa toxicidade às células.
Controle de neutralização	DMEM + 5% soro fetal bovino a 4 °C
Meio Cultivo Células	DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media)
Controle virucida	Formaldeído a 0,7%.
Temperatura de incubação	37 °C + 5% de atmosfera de CO ₂ .
Tempo de incubação	48h após período de adsorção do vírus a célula permissiva.

2.2 Vírus e Célula Utilizadas:

Vírus testados:

- **Coronavírus cepa MHV-3** da família *Coronaviridae* e gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família SARS-CoV-2/COVID-19 - **MENOS RESISTENTES A DESINFECÇÃO**).
- **Norovírus MNV-1** da família *Caliciviridae* - **MUITO RESISTENTES A DESINFECÇÃO**.

Vírus e procedência*	Linhagem Celular**
Coronavírus MHV-3 GenBank (MW620427), Garcia, et al, 2021.	L-929: NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] ATCC® CCL-1™
Norovírus MNV-1 (ATCC VR-1937™) Acervo do Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp.	RAW 264.7 cells (ATCC catalog no. TIB-71)

*Acervo do Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp

** Vírus muito resistente a desinfecção.



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

2.3 Multiplicação viral

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² utilizando uma concentração inicial de 3×10⁵ células/mL em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco® livre de antibióticos e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a propagação viral, as amostras foram inoculadas nas garrafas de cultivo celular e quando a monocamada apresentou 70% de efeito citopatogênico (CPE) procedeu-se a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares.

Estoques de vírus MHV-3 e NOROVÍRUS com 10⁸ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) por 100µL foram estocadas a -80°C para uso posterior.

2.4 Titulação viral

Amostra de Coronavírus MHV-3 e Norovírus foram diluídas em DMEM, tituladas na base 10 (10¹ a 10¹⁰) e inoculadas em quadruplicata em microplacas 96 orifícios contendo a respectiva linhagem celular permissiva em concentração equivalente a 3×10⁵ células por ml (volume de 100 µL/orifício). As placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por até 48h. A leitura das placas foi feita em busca do efeito citopático (ECP) característico para cada vírus às respectivas células (MHV-3 em células L929 e NOROVÍRUS em células RAW 264.7). O título viral foi definido em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) e foi calculado pelo método de Spearman & Kaerber (Muthannan Andavar Ramakrishnan, 2016).

Fórmula Spearman & Kaerber:

$$\log_{10} 50\% \text{ end point dilution} = - (x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i)$$

x_0 = log₁₀ of the reciprocal of the highest dilution (lowest concentration) at which all cells/CPE* are positive;

d = log₁₀ of the dilution factor;

n_i = number of cell used in each individual dilution (after discounting accidental deaths);

r_i = number of positive CPE/cell (out of n_i).

* CPE: Cytopathic effect (ECP: Efeito citopático provocado pelo vírus nas células)



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

2.5 Determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT)

Os elementos que compõe o sistema de desinfecção do equipamento (UV-C) devem ser ativos somente contra o vírus e não às células. Em caso de toxicidade da amostra exposta a desinfecção, determina-se a concentração ideal dela para realização da atividade antiviral/virucida, ou seja, a diluição ideal para realizar o ensaio.

2.6 Cálculo e verificação da atividade virucida

A atividade virucida do produto de teste é avaliada calculando a diminuição do título em comparação com a titulação de controle sem o produto. A diferença é dada como fator de redução (FR). Onde: $FR = \frac{TV}{TT}$ (TV: Título de vírus do controle/não tratado e TT: Título de vírus do teste tratado).

De acordo com a EN 144476: 2019, uma solução antisséptica em uma concentração particular tem eficácia de inativação de vírus no título é reduzida em pelo menos quatro \log_{10} dentro do período de exposição recomendado. Isso corresponde a uma inativação de $\geq 99,99\%$.

2.7. Ensaio virucida – Nebulização do Limpador Automotivo “CARTECH automotive systems AIR +”:

- a) “Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)” na célula testada, para determinar a concentração que não causa toxicidade para a célula.
- b) Preparo das células: Para os estudos virucidas foram distribuídas 100 μL de suspensão de células L929 e RAW 264.7 nas microplacas de 96 orifícios com uma concentração de 3×10^5 células/mL diluída em meio de cultura (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino. As microplacas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 por 24 hs para que ocorra aderência das células às placas.
- c) O desinfetante Cartech Air + puro foi adicionado ao reservatório do dispositivo de nebulização.
- d) O dispositivo de nebulização foi posicionado no interior de Cabine de Segurança Biológica Classe II.



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

- e) Alíquotas de 100 μ L do vírus teste (MHV-3/NOROVÍRUS) foram espalhadas com micropipeta em papel filtro contido no interior da placa Petri. As placas foram devidamente identificadas com o tempo de ação e nome do vírus testado e posicionadas voltadas para o bocal de saída da névoa.
- f) O equipamento foi acionado pelos tempos pré-determinados (1 min e 5 min), tempo em que a névoa interagiu com a suspensão viral.
- g) Amostras residuais do inóculo constantes na placa Petri e no papel filtro foram recuperadas por submersão do filtro em DMEM (1000 μ L) e repipetagem.
- h) O inóculo recuperado foi diluído em série (base 10) em placa de diluição contendo DMEM (2% de soro fetal bovino) e uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi transferida para cada poço da placa de cultivo celular contendo a respectiva célula permissiva (Células L-929 para amostras contendo o MHV-3 e células RAW 264.7 para amostras contendo NOROVÍRUS).
- i) As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas.
- j) Após transcorridos o período de incubação, as microplacas foram lidas através do Microscópio Óptico Invertido na busca do Efeito Citopático (ECP) característico do vírus (verifica-se a presença ou não do efeito citopático da infecção viral) e os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Kaerber.
- Por fim, os resultados são expressos em percentual inativação viral (**Tabela 1**) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.
- d) O inóculo foi diluído em série (base 10) e transferido para cada poço da placa de cultivo celular contendo a respectiva célula permissiva (Células L-929 para amostras contendo o MHV-3 e células RAW 264.7 para amostras contendo NOROVÍRUS).
- e) As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas.
- d) Após transcorridos o período de incubação, as microplacas foram lidas através do Microscópio Óptico Invertido na busca do Efeito Citopático (ECP) característico do vírus e os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Kaerber.

Por fim, os resultados são expressos em percentual inativação viral (**Tabela 1**) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado invertido.



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Resumo:

Controle Negativo: controle de células (apenas o sistema celular, sem a presença de vírus).

Controle do vírus/ controle positivo: titulação Coronavírus e Calicivirus (10^1 a 10^{10}) e cultivo celular.

Controle virucida: Formaldeído a 0,7% e linhagem celular em meio DMEM.

Controle de Citotoxicidade: Células (3×10^5 células/mL) em meio DMEM e amostra teste

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	de	Percentual de Inativação/Redução
1	10		90%
2	100		99%
3	1000		99,9%
4	10.000		99,99% VIRUCIDA
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”, 19 de novembro de 2023

3. RESULTADOS:

Tabela 2- Resultado do Teste de citotoxicidade (Dose Máxima Não Tóxica-DMNT) do produto Air + Cartech nebulizado, na diluição 10^1 a 10^{10} em DMEM testado em células e sem vírus (item 3.4).

Células	O título da diluição mais alto que não mostra toxicidade as células hospedeiras
L-929: NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™)	Apresentou toxicidade leve na diluição 1:100 e ausente a partir de $1:10^3$
RAW 264.7	Apresentou toxicidade leve na diluição 1:10 e ausente a partir de $1:10^2$

Tabela 3: Controles: Interferência, citotoxicidade, e um padrão interno de formaldeído 0,7%, Título do Coronavírus Cepa MHV-3, $10^{7,5}$ DICT₅₀/ml e NOROVÍRUS, 10^8 DICT₅₀/ml*

Controles	Título viral DICT ₅₀ /ml *	Redução da infectividade viral DICT ₅₀ /ml */log
Controle de vírus	10^8 (MHV-3)	-
	10^8 (NOROVÍRUS)	-
Controle virucida:	$10^{1,5}$ (MHV-3)	6,0 (99,9999% Virucida)
Formaldeído a 0,7%	10^3 (NOROVÍRUS)	5,0 (99,999% Virucida)
Controle de neutralização:	10^8 (MHV-3)	
DMEM + 5% soro fetal bovino a 4 °C	10^8 (NOROVÍRUS)	-

*Média de 10 diluições do vírus (de 10^1 a 10^{10}) em 04 repetições

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Tabela 4 - Resultados *in vitro* da ação do **Limpador automotivo “CARTECH automotive systems AIR +”**, testado durante 60 dias por diferentes tempos de ação sobre Coronavírus (Cepa MHV-3) e Norovírus.

Produto CARTECH automotive systems AIR + 60 dias	Tempos de exposição	Vírus	Fator de Redução (FR) da Infectividade viral DICT50/ml** log	Resultados em percentual de inativação viral
(Nebulizado)	1 minuto	MHV-3	4	99,99%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	4	99,99%
(Nebulizado)	1 minuto	NOROVÍRUS	3	99,9%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	4	99,99%
(Testado na forma líquida na concentração de 24%)	1 minuto	MHV-3	5	99,999%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	6	99,9999%
(Testado na forma líquida na concentração de 24%)	1 minuto	NOROVÍRUS	0	< 90%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	0	< 90%
(Testado puro na forma líquida)	1 minuto	MHV-3	4	99,99%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	4	99,99%
(Testado puro na forma líquida)	1 minuto	NOROVÍRUS	4	99,99%
	5 minutos	Título inicial: 10 ⁸ DICT50/ml	4	99,99%

** Onde: FR= TV-TT (TV: Título de vírus não tratado - TT: Título de vírus do teste tratado) calculado em DICT50/ml, Média de diluições do vírus (de 10¹ a 10¹⁰) em 04 repetições (item 3.5).



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

4. CONCLUSÕES:

- O Limpador automotivo “CARTECH automotive systems AIR+” foi testado de ZERO a 60 dias e demonstrou eficácia na desinfecção do Coronavírus a partir de um 1 minuto de nebulização do produto (inativou 99,99% das partículas virais) e a partir de 5 minutos de nebulização para o Norovírus (**vírus mais resistente a desinfecção**).
- O produto puro, testado em sua forma líquida, foi eficaz na desinfecção do Coronavírus a partir de um 1 minuto para ambos os vírus (Coronavírus e Norovírus).
- Pode-se concluir que o Limpador automotivo “CARTECH automotive systems AIR + foi eficaz na descontaminação de vírus **de zero a 60 dias**, portanto, auxilia no combate do grupo Coronavírus, incluindo o coronavírus causador da COVID-19 e no combate ao grupo de vírus mais resistentes a desinfecção.

Prof. Dr. Clarice Weis-Arns
Responsável pelo Laudo
CRMV-SP: 08979



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Bibliografia Consultada:

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).

ASTM E1053 – 11: Standard Practice to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces.

Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch Exp Path Pharmac; 162, 1931, 480-487.

Spearman, C.: The method of ‘right or wrong cases’ (constant stimuli) without Gauss’s formulae.
Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann

Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents

Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246e251

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701

Garcia AB, de Moraes AP, Rodrigues DM, Gilioli R, de Oliveira-Filho EF, Durães-Carvalho R, et al.

Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. Microbiology Resource Announcements. 2021;10: e00248-21

Muthannan Andavar Ramakrishnan

Determination of 50% endpoint titer using a simple formula

World J Virol

May 12;5(2):85-6. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85. (2016)

Anexo 01:



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

Aparelhos utilizados:

- Cabines de biossegurança nível II e III
- Geladeiras
- Biofreezer - 80 °C
- Biofreezer -150 °C
- Incubadoras de CO₂
- Agitador (misturador Vortex)
- Medidor de pH
- Microscópio Invertido (Olympus, tipo CK 30)
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG)
- Banho-maria
- Medidor pH

vidrarias e pequenos itens de produto

- Pipetas descartáveis, ajustáveis e de volume fixo (Eppendorf AG)
- Microplacas de 96 poços Polysterol (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Frasco de cultura celular
- Tubos de ensaio selados
- Pipetas mono e multicanais (Eppendorf)
- Filtros descartáveis

Meio de cultura e reagentes

- Solução de antibióticos (penicilina-estreptomicina).
- Estoque de vírus conservado em -80°C
- Soro fetal de Bovino
- Solução de formaldeído 1,4%
- Aqua bidest. (Sistema de água ultrapura Sartorius)
- PBS (Invitrogen, artigo nº 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, artigo no. CA-2153)



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

- Eritrócitos de ovelha.
- Albumina
- Solução de tripsina versene 0,25%
- DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media): DMEM 9,6 g,
Trishidroximetilaminometano (Tris) 2,4% 50 mL,
Bicarbonato de sódio 2,0 g, H₂O ultrapura q.s.p. 1000 mL.
- Meio de congelamento de células;
- DMSO- Dimetilsulfóxido-10% e Soro fetal bovino 90%)

Soluções:

Água dura para diluição de produtos:

Para a preparação de 1 litro de água dura, o procedimento é o seguinte:

- Solução A: dissolver 19,84 g de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 46,24 g de cloreto de cálcio (CaCl₂) em água e diluir para 1 000 ml. Esterilize por filtração por membrana.

Armazene a solução na geladeira por não mais de um mês;

- Solução B: dissolver 35,02 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em água e diluir para 1000 ml. Esterilize por filtração por membrana. Armazene a solução na geladeira por não mais que uma semana;

- Colocar 600 ml a 700 ml de água em um balão volumétrico de 1 000 ml e adicionar 6,0 ml da solução A, depois 8,0 ml da solução B. Misturar e diluir até 1 000 ml com água.

O pH da água dura deve ser $7,0 \pm 0,2$.

Substância interferente:

3 g/L albumina bovina + 1ml/L soro fetal bovino em água estéril desmineralizada

ANEXO 2:



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 19 de novembro de 2023

VÍRUS e RESISTÊNCIA A DESINFETANTES (simplificado)

Fonte:

https://www.cleanroomtechnology.com/news/article_page/Virucidal_testing_of_cleanroom_disinfectants/173893

Vírus sem envelope: SÃO VÍRUS RESISTENTES

Subdivididos em:

Em termos de resistência a desinfetantes ajuda a separá-los novamente por tamanho, **pequenos vírus não envelopados com menos de 50 nm** podem ser altamente resistentes à inativação por desinfecção, pois, apesar da falta de um envelope lipídico, esses organismos possuem um capsídeo proteico muito resistente. As famílias neste subgrupo incluem: Picornaviridae, *Parvoviridae*, *Caliciviridae* (**NOROVÍRUS**), Astroviridae e *Polyomaviridae*.

Grandes vírus sem envelope, de 50 a 100 nm de tamanho, são menos resistentes à inativação por desinfecção, pois, embora tenham um capsídeo de proteína resistente, seu tamanho maior os torna mais vulneráveis do que suas contrapartes virais menores. As seguintes famílias virais neste subgrupo: *Adenoviridae*, *Reoviridae* e *Papillomaviridae* (HPV).

Segue abaixo uma figura ilustrativa:

	Bactérias com esporos (<i>Bacillus e Clostridium</i>).	MAIS RESISTENTES
--	--	-------------------------

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de novembro de 2023

