



15 de outubro de 2020

Empresa Solicitante:
Black Prime

Referente: RELATÓRIO TESTE VIRUCIDA

1. Produto:

H-05: Biguanida e Quaternário de 5ª geração.

- 2. Vírus testados:** Coronavírus (cepa MHV), Gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/COVID19 e MERS).

Vírus	Linhagens Celulares
Coronavírus MHV	célula: L929 NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

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 e metodologias descritas nas normas (EN14476:2019, ASTM E1053 – 11 e do Instituto Robert Koch – RKI) e seguindo as “Boas Práticas de Laboratório” (BPL).

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.

15 de outubro de 2020

- b) A titulação do Coronavírus (Cepa MHV) foi realizada de acordo com o método DICC₅₀ (Doses Infectantes de Cultivos Células 50%). Diluições sequenciais do vírus na base 10 foram realizadas em quadruplicata, em microplacas 96 orifícios estéreis. A seguir foram adicionadas as células L929 com uma concentração de 2×10^5 células/orifício. Após 48 hs verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.
- c) Inicialmente o produto “H-05” foi testado na linhagem celular para a “Determinação da Dose Máxima Não Tóxica”, para definir a concentração que não causa toxicidade às células.
- d) Após, a amostra “H-05” na forma pura foi testada nos tempos “Imediato, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 1 hora e 2 horas”, e a cada tempo de ação o vírus foi homogeneizado e testado.
- e) Para cada etapa e tempos de contato a mistura **produto e vírus** foram pipetadas 100 µL em microplacas (96 orifícios) e tituladas até 10^8 . A seguir foram inoculadas 100 µL sobre as células permissivas com uma concentração de 2×10^5 células/orifício e incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 hs.
- f) 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/Controles:

- Negativo: controle celular (2×10^5 células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostra teste;
- Controle de vírus: Titulação de vírus (10^1 a 10^{12}) e cultura de células em meio DMEM;
- Teste positivo: presença de vírus, **H-05** e linhagens celulares em meio DMEM.

15 de outubro de 2020

***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>

4. Resultados:

Tabela 2: Resultados *in vitro* da ação do produto “H-05” em diferentes tempos sobre Coronavírus (Cepa MHV)

Produto	Tempos	Resultados em Percentual e Atividade (Tabela 1) * Coronavírus MHV
H-05 (Biguanida e Quaternário de 5ª geração)	Imediato	99,9%
	30 segundos	99,9%
	1 minuto	99,9%
	2 minutos	99,9%
	1 dia	99,9%
	2 dias	99,9%

5. Conclusões:

O produto analisado mostrou inibição viral.

- Considerando que houve inibição de 99,9% da contaminação viral, pode-se concluir que o produto “H-05” foi eficaz nos tempos testados, e, portanto, recomendamos o uso para o grupo Coronavírus e ao combate da COVID-19.



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



15 de outubro de 2020

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 16777:2018: Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area

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)

BS EN 16777:2018: *Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area*

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.

Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann, Birte Bischoff, Daniel Todt , Eike Steinmann, Joerg Steinmann, Florian H. H. Brill and Jochen Steinmann
Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions
Antimicrobial Resistance and Infection Control (2019) 8:121
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-4>

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 LJ, Muench H.

A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493–497.



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13083-862 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



15 de outubro de 2020