



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 2 de julho de 2021

### Empresas Solicitantes:

#### **MONTSANS LITELA: CNPJ:09.208.878/0001-91**

Rua Dr. Botelho,50. Vila Lourdes  
CEP:06367-260  
Carapicuíba- SP  
A/C Sr. Luiz Santo Filho  
e-mail: [luis@veroar.com.br](mailto:luis@veroar.com.br)  
telefone: (11)99632-8833

#### **GRUPO SAFECAR: CNPJ:37.518.741/0001-79**

Rua Pde. Viegas de Menezes 151- Itaquera SP- Brasil  
e-mail: [contato@pwclean.com.br](mailto:contato@pwclean.com.br)

Referente: **Laudo TESTE VIRUCIDA- PW Clean**

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

#### 1) Produto:

**PW Clean- Limpeza automotiva ar condicionado**

**Fab: 03/2021**

**Val: 03/2024**

**Princípio ativo: Triclosan e quaternário de amônia**

Data chegada ao laboratório: 13/04/2021

Data leitura e resultado: 01/07/2021

#### 2) Condições experimentais

<b>Temperatura do ensaio</b>	22 °C +/- 1 °C.
<b>Concentração do produto</b>	Puro/100%
<b>Controle de citotoxicidade</b>	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.
<b>Controle de neutralização</b>	DMEM + 5% soro fetal bovino a 4 °C.
<b>Controle virucida</b>	Formaldeído a 0,7%.
<b>Temperatura de incubação</b>	37 °C + 5% de atmosfera de CO <sub>2</sub> .
<b>Tempo de incubação</b>	48h após período de adsorção.



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 2 de julho de 2021

**Vírus testado:** Coronavírus cepa MHV-3, Gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/COVID19 e MERS)

Vírus	Linhagens Celulares
Coronavírus MHV-3	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 e ASTM E1053).

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 realizada de acordo com o método DICT<sub>50</sub> (Doses Infectantes de Cultivos Tecidos 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  $2 \times 10^5$  células/orifício, contados através do equipamento *Cell Counter R1, Olympus*.

Após 48 horas de incubação em Estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.

- c) O **PW Clean** foi testado *in vitro* na linhagem celular 929 para a “Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD)”, para definir a concentração que não causa toxicidade às células.

- d) Após a verificação da DMTD, o produto PW Clean foi homogeneizado e misturado ao vírus e posteriormente submetido a diferentes tempos de contato. Cada tempo de contato (vírus e produto) foi titulado ( $10^1$  a  $10^{10}$ ) em quatro repetições, onde foram pipetados



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 2 de julho de 2021

100 µL em microplacas de 96 orifícios, e a seguir foram inoculadas sobre a monocamada de células permissivas (L929) previamente preparadas em microplacas de 96 orifícios.

e) O mesmo procedimento foi realizado com Formaldeído a 0,7%, para testar a eficácia virucida.

f) As microplacas com o Produto (diferentes tempos), vírus e sistema celular foram incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

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

Por fim, 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 (2x10<sup>5</sup> células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostra teste;
- Controle de vírus: Titulação de vírus (10<sup>1</sup> a 10<sup>10</sup>) e cultura de células em meio DMEM;
- Teste positivo: presença de vírus, **Produto** e linhagem celular em meio DMEM.
- Controle virucida: Formaldeído a 0,7% e linhagem celular em meio DMEM.

**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", 2 de julho de 2021

#### 4) Resultados:

**Tabela 2. Resultados dos títulos virais, Controle (PBS) e controle virucida Formaldeído a 0,7% (unidade  $\log_{10}TCID_{50}/ml$ ).**

Vírus	Título Viral	Controle virucida (Formaldeído a 0,7%)
Coronavirus MHV-3	8,25	2,00

**Tabela 3 - Resultados do produto "PW Clean" testado em diferentes tempos com o Coronavírus (Cepa MHV-3).**

Produto	Tempos	Percentual inativação viral (Tabela 1) Coronavírus (MHV-3)
<b>PW Clean- Limpeza automotiva ar condicionado</b>	1 minuto	99 % de inativação viral
	5 minutos	99 % de inativação viral
	15 minutos	99,9 % de inativação viral
<b>LONG LASTING</b>	7 dias	99 % de inativação viral
	15 dias	99 % de inativação viral
	30 dias	99 % de inativação viral

#### 5) Conclusões:

- O produto **PW Clean** demonstrou atividade de inativação em todos os tempos analisados, de até 99,9%, e, portanto, recomendamos o uso para os vírus do **grupo Coronavírus.**
- Produto PW Clean no ensaio **long Lasting** mostrou atividade antiviral até 30 dias.



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

(Responsável pelo Laudo)

LAUDO VIRUCIDA



Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 2 de julho 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](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>

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

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.