

## **RELATÓRIO TÉCNICO DE ATIVIDADE VIRUCIDA – ASTM E3135: *Standard Practice for Determining Antimicrobial Efficacy of Ultraviolet Germicidal Irradiation Against Microorganisms on Carriers with Simulated Soil***

**Identificação do laboratório teste:** Laboratório de Biologia Molecular, Unidade Especial do Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

**Aviso legal:** i. A CROP® (Razão social de Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA.) é capaz de utilizar a estrutura física do HCFMB - UNESP para a realização dos procedimentos experimentais necessários por meio de convênio firmado entre as partes. ii. a CROP® é a responsável por todo e qualquer resultado apresentado neste relatório técnico, não transferindo ou compartilhando a responsabilidade dos mesmo com o HC/FMB e a UNESP.

### **Identificação do cliente**

Razão social: Ozonio Line Indústria de Geradores de Ozônio LTDA

Endereço do cliente: Rua Antônio Carlos Tacconi, 147, Vila Maria, São Paulo – 04810-020

### **Identificação da amostra**

Nome do produto: B.O.N. AIR - Tecnologia UVC e Ionizante

**Parecer técnico:** LBMCB13021

## **LBMCB13021**

### **Método de avaliação de atividade virucida**

De acordo com a ASTM E3135

### **Metodologia:**

Nesse relatório, o sistema B.O.N. AIR Tecnologia UVC e Ionizante foi avaliado para quantificar o percentual de inativação do SARS-CoV-2, de acordo com a ASTM E3135.

### **Solução de neutralização:**

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 2% v/v Soro Fetal Bovino em 4°C.

### **Condições experimentais:**

**Período da análise:**

10 de maio de 2021 a 14 de maio de 2021

**Equipamento de emissão UV:**

B.O.N. AIR - Tecnologia UVC e Ionizante

**Tempo de exposição ao vírus:**

10 minutos

**Temperatura durante experimento:**

25 °C +- 1°C

**Umidade Relativa do ar:**

90 %

**Temperatura de incubação:**

37°C +- 1°C + 5% CO<sub>2</sub>

**Linhagem viral utilizada:**

**SARS-CoV-2 (causador da COVID-19)**

**Linhagem celular e passagem:**

Vero ATCC ® CCL-81™

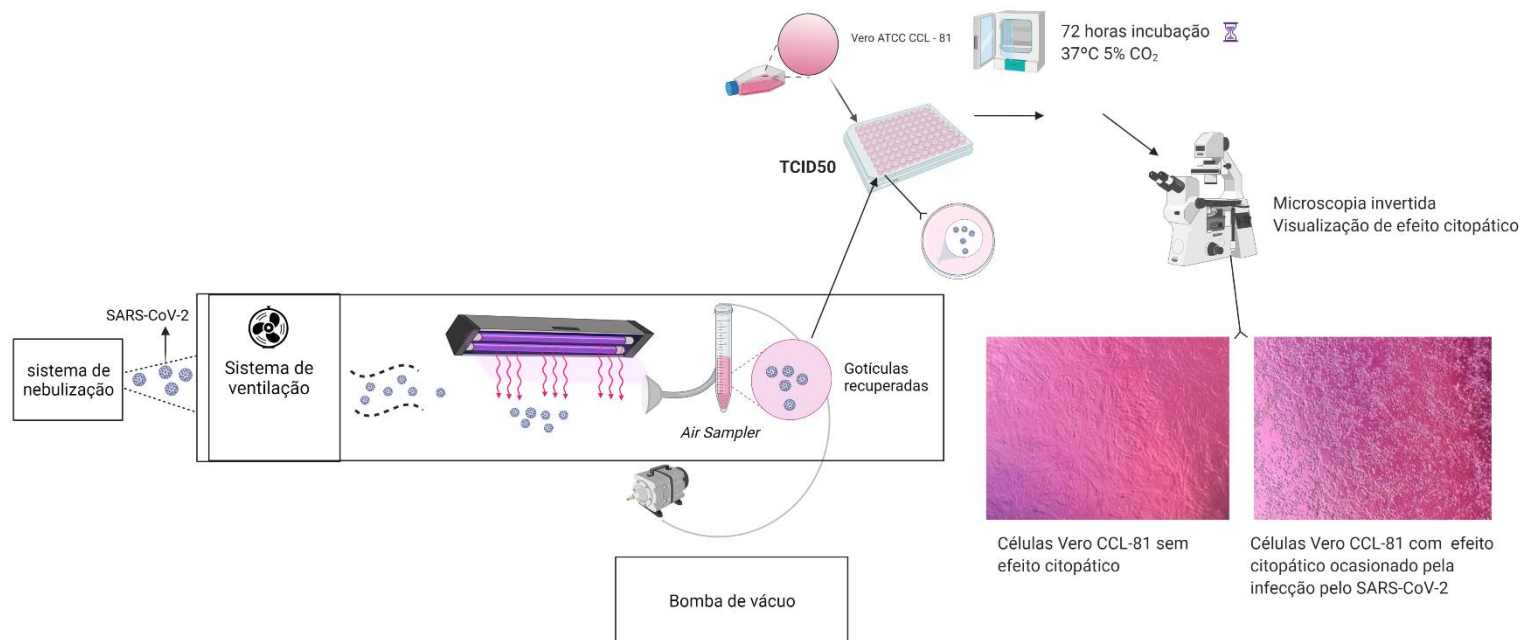


## Resumo

Neste relatório técnico, o sistema UV-C (254 nm) do equipamento BON AIR (*Biological and Odor Neutralizer*) foi avaliado para determinar a capacidade de inativação de partículas de SARS-CoV-2, de acordo com adaptações da ASTM-E3135. No procedimento experimental realizado quantifica-se a redução de partículas de SARS-CoV-2 após 10 minutos de nebulização da solução de SARS-CoV-2 dentro de um sistema hermético, com acondicionamento e funcionamento do equipamento fornecido. Os resultados são comparados com os dados do equipamento B.O.N. AIR -Tecnologia UVC e Ionizante com a função UVC e ionizante desligada. Após a nebulização com o sistema em funcionamento ocorre a passagem das partículas até um amostrador biológico, em que as gotículas recuperadas são diluídas para neutralizar quaisquer efeitos virucida após o tempo de exposição previamente determinado. Em seguida, o vírus recuperado é inoculado em cultura de células hospedeiras (Vero ATCC ® CCL-81™) preparadas previamente em microplacas de 96 poços. Por fim, essas são incubadas durante 72 horas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> para posterior determinação do título viral por meio da metodologia *Tissue culture infectious dose<sub>50</sub>* (TCID<sub>50</sub>). A figura 1 expressa esquematicamente os procedimentos de exposição e captura das gotículas virais.

### Teste de Eficácia Virucida:

O teste virucida é realizado para avaliar o potencial do equipamento B.O.N. AIR -Tecnologia UVC e Ionizante em inativar partículas virais, impedindo-as que infectem as células hospedeiras (Vero ATCC ® CCL-81™). Os ensaios foram executados em réplicas e triplicatas independentes. Destaca-se que os resultados são expressos em comparação da ação virucida frente a redução de partículas virais da solução estoque de SARS-CoV-2 com o equipamento e sua função UVC e ionizante ligada e desligada de modo que seja possível calcular o percentual de inativação viral, representado por log<sub>10</sub> de redução do TCID<sub>50</sub>. Os ensaios são baseados nas recomendações e instruções metodológicas da ASTM E-3135.



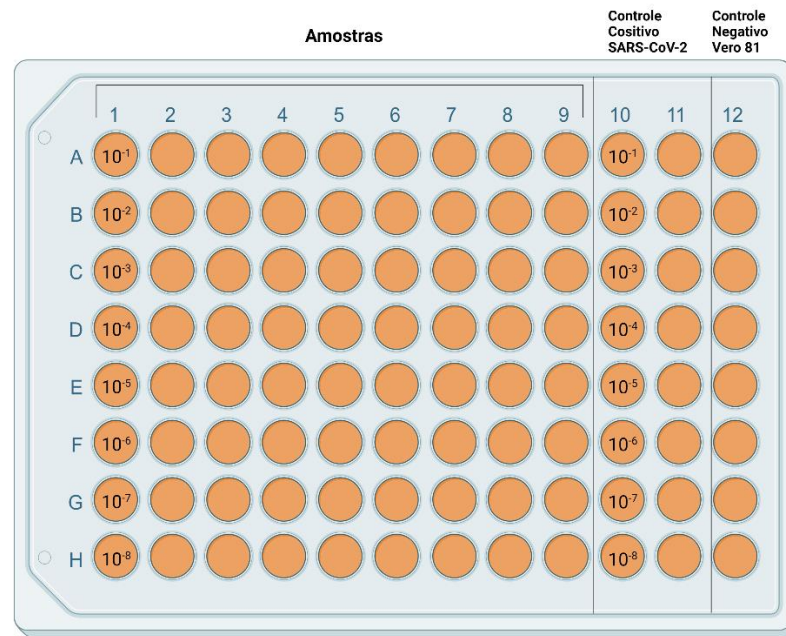
**Figura 1:** Configuração experimental (simulação do funcionamento do B.O.N. AIR - Tecnologia UVC e Ionizante) e coleta de partículas de SARS-CoV-2 nebulizadas com posterior determinação da infectividade em culturas de células pela metodologia TCID<sub>50</sub>. As gotículas de aerossol líquido geradas foram coletadas em um *Air Sampler* para análise de infectividade e título viral.



## Método de Análise

A determinação quantitativa da atividade virucida do B.O.N. AIR - Tecnologia UVC e Ionizante é realizada de acordo com a metodologia TCID<sub>50</sub> (*Median Tissue Culture Infectious Dose*). O protocolo consiste resumidamente em quatro etapas: 1) expor a solução viral ao agente potencialmente virucida (Sistema UVC e Ionizante); 2) diluir o vírus para neutralizar o efeito do agente em questão; 3) inocular o vírus em células Vero ATCC® CCL-81™ previamente cultivadas em microplacas de cultura de 96 poços; 4) e por fim, avaliar o efeito citopático causado pelo vírus.

De forma um pouco mais detalhada, após exposição (etapa 1) e a diluição de neutralização (etapa 2), o vírus recuperado é submetido a diluições decimais seriadas, conforme a metodologia de diluição limite (*end-point-dilution*), figura 2.



**Figura 2:** Esquema de placa de titulação: Método TCID<sub>50</sub> (*Median Tissue Culture Infectious Dose*), realizado em microplaca de 96 poços, onde na primeira linha foram adicionados 9 poços com amostras de vírus pós coleta em Air Sampler com e sem exposição ao sistema B.O.N. AIR — Tecnologia UVC e Ionizante, as amostras passam por neutralização (ação para neutralização da interação viral com qualquer agente interferente), em uma diluição igual a 10<sup>-1</sup>, na segunda linha uma diluição igual a 10<sup>-2</sup> e assim sucessivamente, até a linha 8 com diluição de 10<sup>-8</sup>. Na coluna 10 e 11 foi adicionado o controle positivo (CP), em que as células Vero 81 foram infectadas com a solução viral diluída serialmente e na coluna 12 todos os poços foram tratados somente com células e meio de cultura (Controle Negativo – CN).

Em seguida, cada ponto da diluição é transferido para cultura de células Vero em placa de 96 poços e incubada por 72 horas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (etapa 3). Após o período de incubação é possível observar em quais pontos da diluição o efeito citopático foi observado, o que caracteriza a replicação viral nas células Vero (etapa 4).

A partir dos dados obtidos é possível identificar o ponto da diluição viral em que 50% dos poços apresentaram efeito citopático e consecutivamente permitindo calcular o percentual de inativação viral através do cálculo Reed & Munch *endpoint calculation method* (Reed & Munch, 1938), conforme apresentado na tabela 1. A interpretação dos resultados é baseada no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973) e para determinar da capacidade de inibição viral utiliza-se da diferença logarítmica entre o grupo controle e o grupo tratado, levando em consideração o fator de diluição do vírus (SARS-CoV-2) utilizado em cada ensaio. Por fim, os resultados são expressos em TCID<sub>50</sub>/mL.

**Tabela 1** – Forma de análise numérica de inativação viral.

Log de redução	Fator de redução	Percentual de Inativação
1	10	90%
2	100	99%
3	1.000	99,9%
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%

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

## Resultados:

### Infectividade do SARS-CoV-2 em aerossol após exposição ao sistema B.O.N. AIR — Tecnologia UVC e Ionizante ligado durante 10 minutos de nebulização

A infectividade do vírus após 10 minutos de nebulização e coleta em *Air Sampler* foi avaliada por inoculação das amostras recuperadas, as quais são recuperadas em gotículas, diluídas em série em microplacas de cultura de células Vero. Cada cultura de células expostas aos tratamentos e controles foram avaliadas quantitativamente para determinação do título viral através da metodologia de titulação viral TCID<sub>50</sub>. Os resultados são expressos de modo comparativo entre a nebulização viral no sistema avaliado com a lâmpada UV-C (ultravioleta 254nm) ativada e desativada. Levando em consideração a sensibilidade do equipamento empregado no ensaio experimental, observa-se que a infectividade viral após a nebulização com o sistema UV-C ativo resultou em uma redução de 3 log<sub>10</sub> no TCID<sub>50</sub>/mL da solução viral nebulizada, conforme tabela 2. Desse modo, após a exposição a B.O.N. AIR — Tecnologia UVC e Ionizante (254 nm) reportou-se a inativação de 99,9% das partículas virais de SARS-CoV-2 em 10 minutos de funcionamento do sistema.

**Tabela 2:** Inativação viral do SARS-CoV-2 após exposição ao sistema B.O.N. AIR — Tecnologia UVC e Ionizante

Equipamento	TCID <sub>50</sub> /mL (média) <sup>1</sup>	Percentual de inativação viral	Tempo de Nebulização/exposição
B.O.N. AIR Tecnologia UVC Ionizante <b>desligado</b>	- e 1,12x10 <sup>3</sup> ± 40	-	10 minutos
B.O.N. AIR Tecnologia UVC Ionizante <b>ligado</b>	- e 1,12	99,9%	10 minutos

<sup>1</sup>= Cálculo do título viral em TCID<sub>50</sub> em um intervalo de confiança de 95% de acordo com a EN14776

## Conclusão:

### Verificações metodológicas e análise dos resultados

- 1) O sistema B.O.N. AIR — Tecnologia UVC e Ionizante apresentou atividade virucida *in vitro*, de acordo com os resultados apresentados, demonstrando 3 log<sub>10</sub> de redução em relação ao controle (nebulização viral sem o funcionamento do sistema UV-C), equivalente a 99,9% de redução das partículas virais infectantes de SARS-CoV-2.



**Responsável técnico**  
**Chief Scientific Officer (CSO)**  
Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia  
Lucas Gabriel Ribeiro  
Data: 30/05/2021



**Revisor (a)**  
**Professora Responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do HCFMB**  
Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto  
Data: 30/05/2021

Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto  
CRF 1022128-2  
Responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA)  
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

#### Aviso Legal:

Os resultados apresentados nesse relatório técnico são referentes somente ao produto testado. Os testes para determinação da inativação viral do produto supracitado foram efetuados seguindo o protocolo da ASTM-E3135. Todos os procedimentos e resultados foram executados de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPLs). No entanto, além do que é expresso no relatório: (1) quaisquer usos pelo cliente dos resultados reportados devem ser de entendimento e concordância da Crop para verificação de uso correto de informações providos por esse relatório ou (2) que os resultados de efetividade de inativação viral esperado pelos clientes podem ser alcançados ou (3) que o cliente pode livremente fazer uso desses resultados ou entregáveis desde que não infrinja nenhum direito ou propriedade intelectual de terceiros.