



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 25 de maio de 2021.

**Empresa Solicitante:**

PLASMA POWER TECHNOLOGIES IMPORTAÇÃO E COMÉRCIO DE ELETRO-ELETRÔNICOS LTDA

Av Paulista, 1159 \_\_\_\_\_

CNPJ: 05673877000167

A/C Srs: \_\_\_\_\_

**Referente: Ensaios com Vírus no Equipamento ForestAir**

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

**1. Produto:**

**Equipamento ForestAir**

Ions positivos e negativos (Ionização H+ e O-)

A tecnologia de ionização bipolar quebra a estrutura das proteínas dos microrganismos e as torna inofensivas.

Data chegada ao laboratório: 22/04/2021

Data Resultado: 22/05/2021

**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™)

**3. Procedimento experimental:**

- 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.
- A titulação do Coronavírus (Cepa MHV-3) foi realizado de acordo com o método DICC<sub>50</sub> (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



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 25 de maio de 2021.

adicionadas as células L929 com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/orifício. Após 48 hs verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.

- c) Na entrada do ar do equipamento **ForestAir** 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 de filtros em placa de Petri foram obtidas em diferentes tempos pré-determinados: 10 e 20 minutos. Após cada tempo as placas foram recolhidas, lacradas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.
- e) Após os diferentes tempos de ação os filtros foram retirados e testados:  
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.  
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  $\mu\text{L}$  em microplacas, homogeneizadas e diluídas.  
• Em seguida 100  $\mu\text{L}$  da célula (L929) foram pipetadas sobre a suspensão e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  em Estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas (ver item b).
- f) Após 48 horas de incubação as placas 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 "ForestAir" (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 ( $10^1$  a  $10^{10}$ ) 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", 25 de maio de 2021.

#### 4. Resultados:

##### 4.1) Título Coronavírus (MHV): $10^{8,00}$ DICT50/mL e a redução da infectividade viral foi $\geq \log 5$ (virucida).

**Tabela 2.** Ação da "ForestAir" 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
ForestAir	10 minutos	99,999% de atividade antiviral (virucida)	NÃO TÓXICO
	20 minutos	99,999% de atividade antiviral (virucida)	

#### 5. Conclusões:

- Considerando que houve inativação de até 99,999% ( $\log \geq 5$ ) da contaminação viral é possível concluir que o equipamento **ForestAir** foi eficaz na destruição de partículas virais.
- Portanto, o equipamento **ForestAir** 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 **ForestAir** 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](mailto:arns@unicamp.br)



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 25 de maio 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 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](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.