



Relatório Final

Adaptação da norma internacional EN 14476 para uso em teste

Virucida quantitativo em suspensão com o SARS-CoV-2.

Avaliação da atividade virucida em suspensão.

Emprego da norma EN 14476 em teste virucida quantitativo em suspensão
com Nanogel potencializado com Cobre.

Vírus utilizado no teste:

SARS-CoV-2 amostra SP02/BRA

Material testado:

Nanogel potencializado com cobre - Antisséptico para mãos e corpo.

Lote: LABGW 001/12/2021 Fabricação: 12/2021 Validade: 12/2023

Material cedido pronto para o teste pelo patrocinador do estudo.

Patrocinador do estudo:

Greenwood indústria e Comércio Ltda. CNPJ: 61.733.242/0001-89. Rua Professora
Célia Asse Jacob, 127 – Pavilhão C, São Roque – SP. Responsável Técnica: Rita C. Modesto.

Autores:

Leonardo Camilo de Oliveira & Mauro Martins Teixeira.

Laboratório de Imunofarmacologia, Bloco G3 sala 101, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, CEP: 31270-901, Belo Horizonte - MG – Brasil. Fone/Fax:
+55 31 3409- 2651.

Declaração de conformidade:

O presente relatório técnico final descreve atividades detalhadas, desenvolvidas e realizadas em ambiente seguro e controlado, seguindo-se recomendações de normas internacionais padronizadas. Todas as atividades foram conduzidas seguindo-se estritamente boas práticas de laboratório.

Leonardo Camilo de Oliveira



Mauro Martins Teixeira



Belo Horizonte, 14 de Abril de 2022.

Local de realização do teste:

- Laboratório de Imunofarmacologia, Bloco G3, Sala 101. ICB. Universidade Federal de Minas Gerais.

- Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, LFDA-MG.

Elaboração do Relatório Final:

- Laboratório de Imunofarmacologia, Bloco G3, Sala 101. ICB. Universidade Federal de Minas Gerais.

- Simile Pesquisa e Desenvolvimento LTDA.

Autores do estudo:

Pesquisador Responsável: Dr. Mauro Martins Teixeira.

Graduado em medicina pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, 1990), concluiu a residência médica no Hospital das Clínicas da mesma instituição (1992). Em 1994, obteve título de doutor em imunofarmacologia no Instituto Nacional do Coração e do Pulmão, da Universidade de Londres (1994) e realizou estágio de pós-doutorado, entre 1994 e 1997, na mesma instituição. Concomitantemente, adquiriu, em 1996, diploma em higiene e medicina tropical, na Escola de Higiene



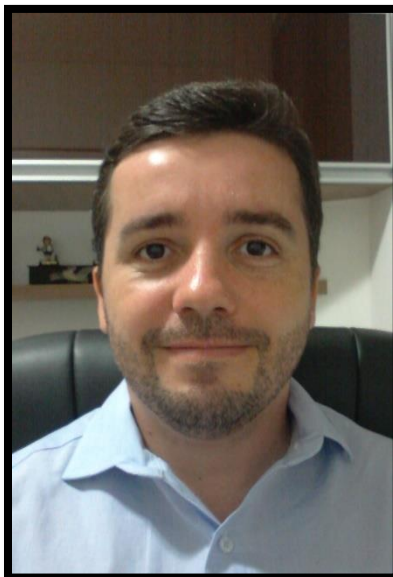
e Medicina Tropical de Londres (LSHTM, na sigla em inglês). É professor titular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pesquisador 1A do CNPq. Em 2009, realizou novo estágio de pós-doutorado, no Centro Nacional para a Pesquisa Científica (CNRS, na sigla em francês). O Acadêmico atua na área de inflamação, tentando compreender a relevância e mecanismos moleculares da resposta inflamatória durante doenças infecciosas e autoimunes. “O desenvolvimento de terapias tem um horizonte de longo prazo”, e é no decorrer dessa longa jornada que Mauro reúne prêmios e títulos, dos quais destacam-se: Prêmio Capes Scopus (2007), da Capes/Elsevier; título de Comendador da Ordem Nacional do Mérito Científico (2009); Prêmio Fundep para as Ciências da Vida, da UFMG (2013); e o Prêmio Wayne G. Watson do Periódico Americano de Ortodontia e Ortopedia Dentofacial (2013). Além de ser membro da Academia Brasileira de Ciências, também é membro da Sociedade Farmacológica Britânica (BPS, na sigla em inglês) e da Academia Mundial de Ciências (TWAS, na sigla em inglês).

Currículo na Plataforma Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1316412551645220>

Linkedin: <https://www.linkedin.com/in/mauro-teixeira-ba46b642/>

Responsável Técnico: Dr. Leonardo Camilo de Oliveira CRBio: 123133/04-D.

Graduado em Ciências Biológicas pela UFMG (2008). Obteve o título de Mestre (2009) e Doutor (2013) em Microbiologia na mesma instituição. No período, foi responsável pelo desenvolvimento de modelos in vitro e animal para estudos de terapia antiviral contra o vírus da Dengue e o vírus da Febre Amarela. Colaborou com o grupo do Dr. Mark Buller da Saint Louis University (SLU), St. Louis, EUA, durante a etapa de sanduiche do doutorado (2012-2013), onde obteve treinamento em manipulação e genotipagem de animais de laboratório, Microscopia Confocal e Sistema de Imageamento in vivo (IVIS) para estudos de disseminação viral de Poxvirus e Flavivirus.



Como Pós-Doutor, engajou em estudos de prospecção de antivirais contra flavivírus em projeto multicêntrico envolvendo a UFMG e a SLU. Também colaborou com o grupo do Dr. Sankar Ghosh da Columbia University em Nova Iorque, NY, EUA, e o grupo do Dr. Aristóbolo M. Silva da UFMG em estudos de sinalização inflamatória envolvendo GTPases, onde obteve treinamento em RNAi e em edição de genomas usando as técnicas de Crispr-Cas9. Atualmente, é Residente Pós-Doutoral junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da UFMG sob supervisão do Professor Mauro Martins Teixeira, atuando em projetos multidisciplinares com foco na diminuição do impacto da Covid-19 na saúde pública. Possui ampla experiência nas áreas de Virologia, Biologia Molecular/Celular e Imunologia.

Currículo na Plataforma Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8145796171253526>

Linkedin: <https://www.linkedin.com/in/leonardo-camilo-de-oliveira-6b792456/>

Abreviações utilizadas no texto:

CIT:	controle de interferência
CIV:	controle inicial de vírus
CTX:	controle de citotoxicidade
DMEM:	meio essencial mínimo modificado por Dulbecco.
DMEM-2:	DMEM suplementado com 2% de SFB
mL:	mililitro
μL:	microlitro
PPM:	partes por milhão
SFB:	soro fetal bovino
SARS-CoV-2:	Coronavírus-2 associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave.
UFP:	unidade formadora de placa de lise viral

Resumo geral do estudo

Título:	Teste Virucida Quantitativo em suspensão para desinfetantes químicos e antissépticos de interesse na área médica.
Desenho do estudo:	O presente relatório descreve as atividades realizadas em conformidade com a norma internacional EN 14476:2013 + A2:2019, a qual foi empregada com um isolado clínico de SARS-CoV-2.
Material:	Formulação líquida de coloração azulada, com atividade virucida em teste.
Nome, lote e fabricação:	Nanogel potencializado com cobre - Antisséptico para mãos e corpo. Lote: LABGW 001/12/2021 Fabricação: 12/2021 Validade: 12/2023
ID do estudo:	RF-CPDF/UFMG-Greenwood-TV003-2022/04
Patrocinador do estudo:	Greenwood indústria e Comércio Ltda. CNPJ: 61.733.242/0001-89

Objetivo: A norma internacional EN 14476 empregada com o SARS-CoV-2 de forma a substanciar o requerimento de ação virucida ao material testado. O teste determina o potencial do produto em teste em inativar uma suspensão viral de SARS-CoV-2 na presença de material de interferência, o qual simula uma condição “suja” rica em material biológico. Uma amostra de vírus foi empregada neste estudo, sendo um isolado viral devidamente sequenciado e confirmado como o vírus SARS-CoV-2 amostra SP02/BRA (SARS.CoV2/SP02.2020.HIAE.Br). Este teste foi conduzido em acordo com a norma internacional EN 14476 – 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).

CONDIÇÕES DO TESTE:

- Amostra de vírus:** SARS-CoV-2 SP02/BRA (GenBank accession number MT350282).
- Hospedeiro:** Linhagem de cultura contínua Vero ATCC CCL-81.
- Ingrediente ativo:**

Formulação em estado líquido de uso imediato “Nanogel potencializado com cobre”, fornecido pronto para uso pelo patrocinador do estudo.

d. Condições gerais durante a realização do teste:

Temperatura ambiente de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

e. Características do material testado:

Formulações em estado líquido, de coloração azulada, com concentrações de componente ativo definida em 410 partes por milhão (ppm).

f. Preparação do material:

Previamente à realização dos testes, a embalagem do material foi limpa externamente com lenço embebido em etanol 70%. O material foi posicionado no interior de cabine de segurança biológica (CSB) Classe II tipo A2 durante 1 hora previamente à realização do teste para equilíbrio de temperatura das amostras e reagentes utilizados. O material foi utilizado diretamente, não diluído, nos testes de exposição ao SARS-CoV-2.

g. Agente neutralizante:

A solução neutralizante utilizada no estudo consiste em meio de diluição Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), 4 g/L de Albumina Sérica Bovina (BSA), 0.5% Polisorbato 80, 0.5% Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) e 0.5% Lecitina de Soja.

h. Meio de cultura utilizado para diluição de vírus e cultura de células:

Meio de cultura DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), doravante denominado DMEM-2, é o meio de diluição das amostras. As culturas celulares são mantidas e propagadas com DMEM suplementado com 7% de SFB (DMEM-7). Após infecção, as culturas são cobertas com meio DMEM-2 acrescido de 1.2% de Carboximetilcelulose (CMC).

i. Tempo de contato:

Minutos: 1, 2, 10 e 60.

Horas: 8, 16 e 24 horas.

j. Temperatura de contato: Temperatura ambiente controlada $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.

k. Substância de interferência:

3.0 g/L de Albumina sérica bovina (BSA) e 3.0 mL/L de sangue de carneiro.

A substância de interferência é incorporada à suspensão viral de modo a aumentar a carga de material biológico presente na amostra de vírus. O emprego de substância de interferência dificulta a ação de materiais com propriedades antivirais. O uso de substância de interferência mimetiza condições encontradas em campo, nas quais agentes infecciosos encontram-se misturados a secreções e outros contaminantes que dificultam o processo de limpeza.

l. Meios e reagentes:

- DMEM + 2% SFB (DMEM-2).
- DMEM + 10% SFB (DMEM-10) + BSA 4.0g/L + 0.5% Polisorbato 80 + 0.5% NaHCO_3 + 0.5% Lecitina de Soja (meio neutralizante de recuperação viral).
- DMEM-2 + 1.2% CMC.
- Salina tamponada com solução fosfato (PBS).
- Água Dura, conforme especificação da norma EN 14476.
- Solução de interferência 3.0g/L BSA e 3.0 mL/L de sangue de carneiro.

m. Local de realização do estudo:

A fase laboratorial do estudo com o emprego do vírus SARS-CoV-2 infeccioso (viável) foi realizada em laboratório de alta contenção e biossegurança localizado na Unidade NB4-OIE do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG) em Pedro Leopoldo, MG. Os testes virucidas foram iniciados após entrega do material teste (Formulações virucidas prontas para uso). Os testes foram iniciados em 28 de março de 2022 e finalizados no dia 14 de Abril de 2022. A equipe de gestão do estudo revisou os protocolos anteriormente ao início do estudo. A data de finalização do estudo é a data na qual o documento final será assinado pela coordenação do estudo. Todas as alterações e revisões de protocolo foram documentadas e assinadas pela equipe de execução do estudo. Todo o material produzido foi catalogado, registrado, datado e mantido juntamente ao protocolo empregado.

n. Registros do estudo:

Todos os dados referentes aos testes, protocolos, modificações do protocolo original, registro de material utilizado, o relatório final e correspondências entre a Greenwood indústria e Comércio Ltda. CNPJ: 61.733.242/0001-89., patrocinadora do estudo, e a equipe de execução do teste da Universidade Federal de Minas Gerais serão devidamente armazenados em arquivo físico e digital localizado no Laboratório de Imunofarmacologia, bloco G3, sala 101, ICB-UFMG, Avenida Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. Cópia do material será também mantida off-site em unidade de disco-rígido sob controle da equipe de execução.

1. DESENHO GERAL DO ESTUDO:

O presente teste foi conduzido com uma formulação de um produto com ação virucida potencial – “Nanogel Potencializado com Cobre”. Detalhes das formulações são de responsabilidade do patrocinador do estudo. O produto foi fornecido pronto para uso no teste. O agente virucida líquido foi testado contra o vírus desafiante SARS-CoV-2, em suspensão. O material em teste é avaliado em vários tempos de contato/exposição, sendo avaliada sua ação virucida na presença de substância de interferência. O produto foi avaliado diretamente no estudo e sem diluição.

Em cada exposição individual, o vírus SARS-CoV-2 será adicionado à solução contendo o produto em teste na presença de substância de interferência e imediatamente homogeneizados com agitador tipo vórtex. A mistura será então mantida à temperatura ambiente pelos tempos de contato definidos no estudo. O volume de inóculo viral adicionado à mistura será mantido em 10% do volume final (100µL de inóculo viral em 900µL de suspensão, Vf= 1.0 mL). Após cada intervalo de exposição, uma alíquota de 100µL da reação é coletada, neutralizada na solução de neutralização, e titulada por ensaio de placa.

A alíquota neutralizada é diluída seriadamente na ordem 1:10 em meio de diluição, sendo então inoculada nas células hospedeiras apropriadas para determinar a carga viral após exposição. Os testes são conduzidos com triplicatas técnicas.

1.1. Preparação do inóculo:

O vírus SARS-CoV-2 utilizado no estudo foi preparado por infecção de cultura de células epiteliais de rim de macaco verde africano, Vero CCL81. Após o intervalo de infecção de 48 horas com MOI = 0.1, o sobrenadante contendo a produção viral foi coletado, clarificado por centrifugação, alíquotado e

armazenado a -80°C . O estoque viral utilizado no estudo foi titulado em células Vero CCL81 para determinação da carga viral em “Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) obtendo-se o título aproximado de 1.5×10^7 UFP/mL. O método de titulação viral (quantificação da carga viral) utilizado no presente estudo é o ensaio de placa em células Vero CCL81.

1.2. Exposição do SARS-CoV-2 ao agente virucida:

Para os testes de exposição do SARS-CoV-2 ao agente virucida, ou ao agente controle (meio de diluição DMEM), uma suspensão de SARS-CoV-2 com volume 100 μL (contendo aproximadamente 1.5×10^6 UFP) é inoculada em um tubo de 1.5 mL contendo uma suspensão formada por 800 μL do agente virucida em teste, acrescido de 100 μL de substância de interferência (Volume final da preparação para o teste igual a 1.0mL). A suspensão é fortemente homogeneizada com auxílio de vórtex durante 10 segundos, sendo então iniciado o tempo de contato imediatamente ao início da homogeneização. Ao término do tempo de contato, uma alíquota de 100 μL da suspensão em teste é recuperada e neutralizada em um novo tubo de 1.5 mL contendo 900 μL de solução de neutralização, composta por meio DMEM acrescido de 10% de SFB e 4g/L de BSA. Essa suspensão viral recuperada e neutralizada é então titulada por ensaio de placa em células Vero CCL81. O sistema de teste utilizado segue as recomendações da norma EN 14476.

O sistema montado e homogeneizado é mantido sem perturbação pelos tempos de contato definidos no planejamento do estudo. O mesmo tipo de sistema é utilizado para tempos de contato diferentes. O sistema é utilizado individualmente e independentemente em cada tempo de contato e em cada repetição. Cada condição foi independentemente testada 2 vezes durante o desenvolvimento deste estudo.

1.3. Metodologia de quantificação e cálculo da carga viral – Ensaio de Placa em células Vero CCL-81

O presente estudo foi conduzido alinhado integralmente com norma europeia referência EN 14476:2013 + A2:2019. Um isolado clínico de SARS-CoV-2 amostra SP02/BRA (Wuhan-Hu-1) foi utilizado como agente viral no teste virucida.

Titulação do SARS-CoV-2 por ensaio de placa.

A titulação da recuperação da carga viral de SARS-CoV-2 obtidos após exposição foi realizada de acordo com o método Ensaio de Placas de lise viral. Brevemente, as células Vero CCL-81 foram crescidas por 24 horas, sendo $1,0 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços. Cem microlitros de uma série de diferentes

diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão neutralizada contendo o vírus a ser titulado, foram inoculados às culturas recém confluídas, sendo uma mantida falsamente infectada, como controle celular. Após 1 hora de adsorção, ao meio de inóculo foi adicionado meio DMEM contendo 2% de SFB e acrescido de Carboxi-metilcelulose a 1.2%. A revelação foi realizada 96 horas pós-infecção através da fixação das culturas com solução de formalina a 10% em PBS 1X e coloração com solução 0.5 % (p/v) de cristal violeta em PBS 1X. As diluições contendo entre 5 e 50 placas (range para leitura de UFPs não-confluentes) de lise foram utilizadas para determinação do número de unidades virais formadoras de placas (UFP) por ml da suspensão neutralizada recuperada.

Cálculo da atividade virucida dos produtos testados:

A avaliação de eficácia do produto testado é conduzida através do cálculo da redução da carga viral. A redução da carga viral é a diferença entre o título viral obtido sem exposição ao agente em teste em log10 UFP ou UFP/mL em comparação com o título viral recuperado após exposição ao agente em teste pelos tempos de contato definidos no planejamento do estudo. Somente poços apresentando placas de lise viral não-confluentes do SARS-CoV-2 serão utilizados para o cálculo final. Os resultados finais representados em UFP ou UFP/mL são obtidos de experimentos realizados com triplicatas biológicas. Os valores apresentados no relatório final representam a média aritmética (quando a contagem das UFPs se dá na mesma diluição para todas as amostras tituladas) ou a média ponderada (quando o título viral é obtido por contagem da carga viral em diferentes diluições) da carga viral obtida após exposição ao agente teste (ou não-exposição nos controles experimentais) em cada replicata experimental titulada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$PFU / t = \frac{\sum c_1 + c_2 + \dots c_n}{(n_1 + n_2 \times v_2 + \dots n_n \times v_n) \times d}$$

onde:

t é o volume inoculado em cada poço por ponto da diluição seriada em placas de 24 poços;

c_1 é o número de UFPs não-confluentes em todas as placas em titulação na primeira diluição da série plausível de leitura;

c_2 é o número de UFPs não-confluentes em todas as placas em titulação na segunda diluição da série plausível de leitura;

cn é o número de UFPs não-confluentes em todas as placas em titulação na última diluição da série plausível de leitura (o ponto mais diluído na diluição seriada);

$n1$ é o número de replicatas correspondentes a $c1$;

$n2$ é o número de replicatas correspondentes a $c2$;

$v2$ é o fator de diluição seriada entre $n1$ e $n2$;

n_n é número de replicatas correspondentes a cn ;

v_n é o fator de diluição entre $n1/n_n$

d é o fator de diluição de $c1$.

1.4. Critérios de validação do teste virucida:

O teste empregado no presente estudo é considerado válido, ou aceitável, quando os critérios de validação listados abaixo são satisfeitos:

1. A suspensão viral em teste possui concentração suficiente que permita a determinação de pelo menos $4.0 \log_{10}$ de título viral.
2. A citotoxicidade do produto testado não afeta a viabilidade da cultura celular hospedeira nas diluições das suspensões em teste necessárias para demonstrar $4.0 \log_{10}$ de fator de redução da carga viral.
3. O Efeito Citopático (ECP) induzido pelo vírus é claramente distinguível do efeito citotóxico produzido pelo produto em teste nos controles de citotoxicidade e interferência, quando presente.
4. Não é detectado infecção acidental de vírus no controle de viabilidade.
5. As diferenças de títulos virais encontradas entre os controles de neutralização TEN-1 ou TEN-2 e os controles experimentais são iguais ou inferiores a $0.5 \log_{10}$.
6. A diferença de título observada no controle de interferência é igual ou inferior a $1.0 \log_{10}$.
7. O fator de redução viral observado para o agente virucida de referência é superior a $4 \log_{10}$.

2. RESULTADOS DESCRITIVOS:

2.1. CONTROLES EMPREGADOS NO TESTE:

2.1.1. Controle inicial de vírus (CIV):

O estoque viral do SARS-CoV-2 foi titulado em células Vero CCL81 por diluição seriada na ordem de 10 vezes. O mesmo estoque viral titulado foi utilizado para inoculação nas suspensões testadas. O título do estoque viral será representado em UFP/mL.

Título do CIV de SARS-Cov-2 durante a realização do teste:

- $1.55 \pm 0.18 \times 10^7$ UFP/mL (7.19 ± 0.05 log₁₀ UFP/mL)

2.1.2. Controle de citotoxicidade (CTX)

O controle CTX define o limite de detecção do ensaio para o teste. É essencial avaliar se o resíduo do agente antiviral recuperado juntamente com o vírus exerce alguma atividade tóxica sobre a cultura de células, o que pode gerar resultados falso positivos. Para a realização do CTX, o agente antiviral em teste é neutralizado, tal como descrito anteriormente, e o eluato neutralizado é seriadamente diluído na ordem de 1:10. Após a diluição seriada, a monocamada de células Vero é inoculada com 100 µL de cada diluição e incubada durante 1 hora a 37°C, em estufa de CO₂. Após o intervalo, a monocamada de células Vero é lavada duas vezes com solução de salina tamponada com fosfato, sendo em seguida cobertas com meio DMEM-2 – CMC 1% e incubadas em estufa de CO₂ durante 96 horas, para simular as condições empregadas nos ensaios de placa para titulação viral. A viabilidade celular foi avaliada após 96 horas através de contagem diferencial de células vivas/mortas com corante vital Azul de Trypan e através de observação da monocamada e marcação com Crystal Violeta.

Resultados:**– Marcação com Cristal Violeta:**

Marcação com Cristal Violeta – Avaliação da integridade da monocamada de células Vero após tratamento de 1 hora com suspensão contendo o eluato neutralizado do agente em teste “Nanogel potencializado com Cobre.					
/////	Diluição seriada do agente teste				Controle tratado com DMEM
	Neutralizado	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
Integridade da monocamada de células Vero CCL-81	Células mortas	Monocamada íntegra	Monocamada íntegra	Monocamada íntegra	Monocamada íntegra

Tabela 1: Avaliação da viabilidade de monocamada de células Vero após marcação com solução de Cristal Violeta 0.5%. Avaliação macroscópica de monocamadas cultivadas em placas de 24 poços após exposição ao eluato neutralizado de “Nanogel potencializado com Cobre”. A suspensão contendo o Nanogel de Cobre foi neutralizada em meio de neutralização e diluída seriadamente na proporção 1:10 em meio de diluição DMEM-2. As monocamadas foram coradas com solução de Cristal Violeta 0.5% e a integridade celular foi observada qualitativamente. Monocamada íntegra foi igualmente corada com a solução, sendo visualmente observada sem alterações. Monocamada com células mortas foi parcialmente ou totalmente afetada pelo tratamento com o agente virucida em teste.

– Teste citotóxico com suspensões de “Nanogel potencializado com Cobre” seriadamente diluídas:

Avaliação citotóxica de suspensão de Nanogel diluída seriadamente em DMEM-2.	
Diluição*	Suspensão de Nanogel potencializado com Cobre.
Nanogel**	Citotoxicidade observada nos 3 poços inoculados.
Neutralizado	Citotoxicidade observada nos 3 poços inoculados.
1 : 10	Não foi observado citotoxicidade.
1 : 100	Não foi observado citotoxicidade.
1 : 1.000	Não foi observado citotoxicidade.

Tabela 2: Resultados dos testes de avaliação citotóxica por diluição seriada das amostras de agentes virucidas: resultado qualitativo de citotoxicidade de diluições seriada na ordem de 1:10 de suspensões

com o Nanogel potencializado com Cobre. O teste foi conduzido com triplicatas técnicas. * Diluição refere-se à quantidade proporcional de vezes que o agente teste foi diluído. ** A amostra de Nanogel com Cobre original, não diluída, foi testada diretamente sobre a monocamada de células Vero.

- Avaliação de citotoxicidade pelo método de coloração diferencial de células vivas ou morta por marcação com o corante vital Azul de Trypan:

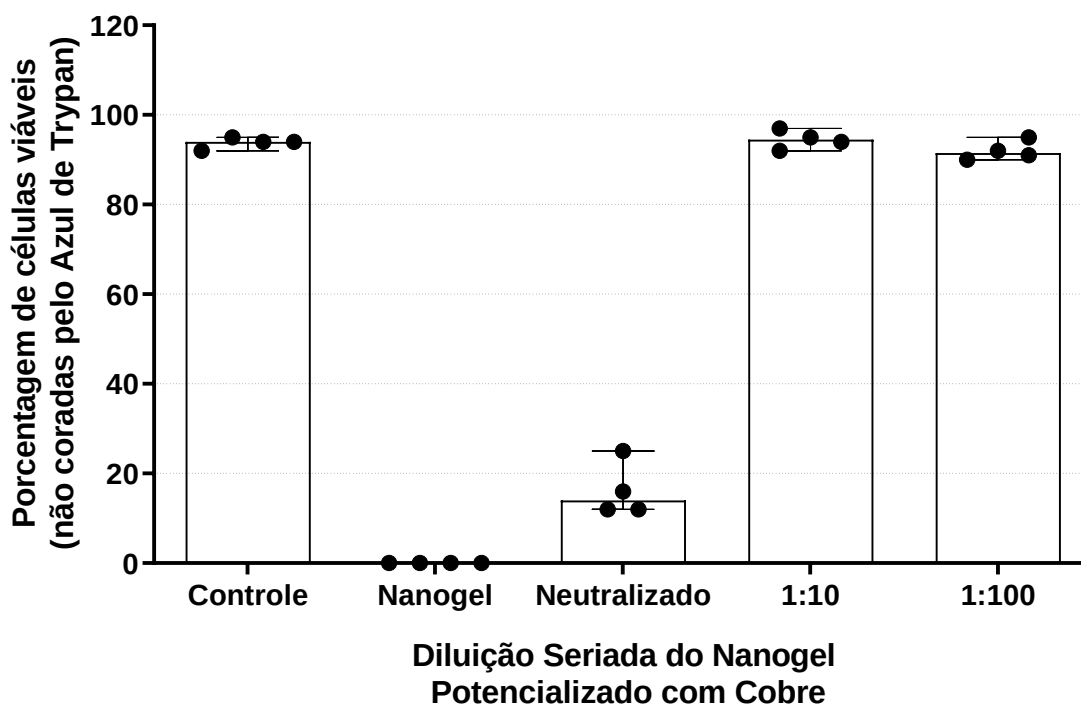


Figura 1: Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão por marcação com o Azul de Trypan: Para cada condição de tratamento com concentrações gradualmente aumentadas de Nanogel potencializado com Cobre, células viáveis e mortas (coradas) foram quantificadas em hemocítômetro com o auxílio de um microscópio de campo claro (Magnificação de 200X). O gráfico demonstra o número de células viáveis após tratamento de 1 hora com a suspensão de Nanogel não diluída, neutralizada e diluída seriadamente. Após o tratamento, as monocamadas foram acrescidas de 1 mL de meio de diluição DMEM-2, sendo em seguida incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C por 96 horas. Ao final do período, as células viáveis foram devidamente quantificadas. As suspensões indicadas no gráfico do Nanogel foram preparadas por neutralização da amostra original seguida de diluição em meio DMEM-2.

Considerações finais dos testes de citotoxicidade:

- As suspensões contendo a formulação do Nanogel potencializado com cobre, quando diretamente inoculadas sobre as monocamadas de células Vero apresentaram alta citotoxicidade. Contudo, não foi observada citotoxicidade quando as formulações diluídas em meio DMEM-2 foram inoculadas na mesma cultura celular. Essas diluições mimetizam as diluições seriadas realizadas durante o método de quantificação da carga viral por ensaio de placa. O teste de citotoxicidade definiu o limite de detecção de vírus SARS-CoV-2.
- As amostras de agente virucida em teste quando diluídas em meio DMEM-2 na menor proporção 1:10 não apresentaram efeito citotóxico.
- As demais diluições seriadas testadas, 1:100 e 1:1.000, não apresentaram citotoxicidade.
- A avaliação de citotoxicidade executada no presente estudo determinou que a exposição de cultura de células Vero CCL81 ao eluato neutralizado de “Nanogel potencializado com Cobre” não afeta a viabilidade celular e não compromete o método de titulação utilizado para quantificação da carga viral recuperada de SARS-CoV-2 durante o teste virucida quantitativo.
- A avaliação citotóxica do presente estudo está em conformidade com a norma internacional EN 14476.
- O resultado do teste citotóxico é considerado válido para o restante das análises deste estudo.

2.1.3. Controle de viabilidade:

Uma cultura de células Vero CCL81 foi implantada em placa de 24 poços, sendo essa **não**-infectada com o SARS-CoV-2. Essa cultura não-infectada foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C durante a realização dos testes e submetida à avaliação de viabilidade por contagem diferencial de células vivas/mortas e método de coloração com solução de Crystal Violeta, **não sendo identificado perda de viabilidade ou alteração de taxas de crescimento e/ou morte celular de culturas celulares não-infectadas durante a realização dos testes.**

2.1.4. Controle de interferência (CIT)

O controle de interferência (CIT) é medido para excluir a possibilidade de que produto residual presente no eluato tenha efeito negativo na produção viral em cultura de células testadas e, dessa forma, venha a gerar um resultado falso-positivo. Para tanto, o eluato obtido no controle CTX (seção 2.1.2) é misturado a uma suspensão celular de Vero (contendo o número de células usadas para a titulação em 1 placa de 24 poços nos ensaios) e armazenado durante 1 hora a 37°C. Em seguida, as células Vero são ressuspensas, semeadas igualmente em placas de 24 poços, e a suspensão viral estoque é titulada

nessas células. O mesmo procedimento é realizado, porém com DMEM-2 no lugar do eluato CTX, como controle experimental. Não deve haver diferença igual ou superior a 1 log₁₀ entre os títulos virais obtidos nos diferentes tratamentos para efeitos de validação do teste.

Resultado:

- Título do CIT-CTX-Nanogel: $1.50 \pm 0.30 \times 10^7$ UFP/mL (7.18 ± 0.10 log₁₀ UFP/mL)
- Título do CIT-DMEM-2: $1.73 \pm 0.32 \times 10^7$ UFP/mL (7.24 ± 0.09 log₁₀ UFP/mL)
- Controle CIT dentro do limite estabelecido na norma EN 14476, sendo considerado satisfatório.
- Controle CIT validado.

2.1.5. Controle de Neutralização.

O controle de neutralização é conduzido para definir se ingrediente ativo residual está presente após o procedimento de neutralização. O controle de neutralização garante que o ingrediente ativo não afetará o procedimento de titulação após a neutralização. São conduzidos dois testes diferentes e independentes de neutralização:

O **teste de Eficiência de Neutralização 1 (TEN-1)** é conduzido imediatamente após preparação da mistura teste (seção 1.2). Assim, após adição do SARS-CoV-2 e homogeneização, uma alíquota de 100µL da mistura é removida e imediatamente neutralizada em 900µL de solução de neutralização. Essa nova suspensão é então mantida em gelo por 30 minutos. Após incubação em gelo, as amostras neutralizadas são diluídas seriadamente e tituladas por ensaio de placa em células Vero. A mesma reação é preparada com DMEM-2 no lugar do ingrediente ativo, como controle experimental. A diferença de título viral recuperado entre o TEN-1 e o controle deve ser igual ou inferior a 0.5 log₁₀.

O **teste de Eficiência de Neutralização 2 (TEN-2)** é conduzido para definir a segurança de neutralização do ingrediente ativo, uma vez que esses componentes podem apresentar ação virucida muito rápida, mesmo no “tempo zero”, imediatamente após o contato. Para determinar a eficiência do procedimento de neutralização, a mistura teste é preparada com o ingrediente ativo, porém sem adição do vírus SARS-CoV-2. Em seguida, a mistura é homogeneizada em vórtex sendo iniciado o tempo de exposição de 2 minutos. Ao fim do intervalo, uma alíquota de 100µL da mistura é neutralizada em 900µL de solução de

neutralização. A essa mistura neutralizada é adicionada 20µL do estoque de SARS-CoV-2, seguido de 10 segundos de agitação em vórtex. Essa solução inoculada com o SARS-CoV-2 é então diluída seriadamente e titulada em células Vero. A mesma reação é preparada com DMEM-2 no lugar do ingrediente ativo, como controle experimental. A diferença de título viral recuperado entre o TEN-2 e o controle deve ser igual ou inferior a 0.5 log10.

Resultados:

- Teste de Eficiência de Neutralização TEN-1:

Carga viral de SARS-CoV-2 recuperada na mistura controle: $1.33 \pm 0.32 \times 10^6$ UFPs
($6.12 \pm 0.12 \log_{10}$ UFPs)

Carga de SARS-CoV-2 recuperada no TEN-1 (Nanogel): $7.33 \pm 3.51 \times 10^5$ UFPs
($5.87 \pm 0.28 \log_{10}$ UFPs)

- Teste de Eficiência de Neutralização TEN-2

Carga viral de SARS-CoV-2 recuperada no controle: $1.90 \pm 0.60 \times 10^5$ UFPs
($5.28 \pm 0.17 \log_{10}$ UFPs)

Carga de SARS-CoV-2 recuperada no TEN-2 (Nanogel): $2.23 \pm 1.02 \times 10^5$ UFPs
($5.35 \pm 0.27 \log_{10}$ UFPs)

Considerações finais sobre os testes de eficiência de neutralização:

- As diferenças nas cargas virais de SARS-CoV-2 recuperadas após realização dos testes de eficiência de neutralização TEN-1 e TEN-2 em comparação com os controles experimentais são inferiores a 0.5 log10.

- Controle de Neutralização adequadamente validado em acordo com a norma EN 14476.

2.1.6. Controle experimental com solução virucida referência - Glutaraldeído a 0.125%

Para garantir a eliminação de SARS-CoV-2 durante os testes, foi realizado um controle experimental no qual a suspensão viral foi tratada com solução referência de glutaraldeído a 0.125%. O tempo de contato entre solução e vírus no teste foi de 2 minutos.

Resultados:

- Não houve detecção de placas de lise viral tratamento da suspensão viral com solução de glutaraldeído a 0.125%.

3. TESTE VIRUCIDA QUANTITATIVO COM “NANOGEL POTENCIALIZADO COM COBRE”:

Esta seção descreve os resultados encontrados no teste virucida quantitativo em suspensão com as suspensões do agente teste NANOGE L potencializado com Cobre. Para o teste, 100µL do estoque viral de SARS-CoV-2 (Carga viral aproximada esperada após titulação igual 1.5×10^6 UFPs ou 6.18 log10) foi inoculado nas misturas em teste na presença de substância de interferência, conforme descrito na seção 1.2. Em seguida, aguardou-se os tempos de contato definidos no estudo, seguidos de neutralização e titulação das amostras por ensaio de placa em células Vero, como descrito em detalhes anteriormente.

Resultados:

3.1. Dados não tratados da recuperação total de SARS-CoV-2 após inoculação do vírus em suspensão com o material virucida NANOSEL POTENCIALIZADO COM COBRE em teste, bem como na suspensão controle com meio de diluição DMEM-2. Os números apresentados representam as cargas virais totais em UFP/mL de SARS-CoV-2 recuperadas após procedimento detalhado no texto. Os números aqui apresentados são representativos de 2 testes realizados independentemente.

Tabela 3: Recuperação de SARS-CoV-2 após exposição ao “Nanogel” na presença de substância de interferência.

Resultado preliminar de exposição do SARS-CoV-2 ao "Nanogel Antisséptico com Cobre"		minutos				horas		
	Tempo de contato →	1	2	10	60	8	16	24
	Replicata técnica ↓							
SARS-CoV-2 Controle	#1	2400000	2000000	1600000	1100000	800000	350000	85000
	#2	1600000	1900000	1200000	1500000	750000	110000	70000
	#3	1500000	1100000	2100000	1200000	600000	95000	150000
SARS-CoV-2 + Nanogel Antisséptico com Cobre	#1	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD
	#2	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD
	#3	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD	ALD

Tabela 3: Dado não tratado da recuperação de SARS-CoV-2 após exposição ao "Nanogel potencializado com Cobre". Teste virucida em suspensão em acordo com a Norma Internacional Europeia EN14476:2013 + A2:2019. Números da recuperação de SARS-CoV-2 infeccioso (viável) após ensaio de placa em células Vero CCL81. Os números apresentados indicam a quantidade total de unidades formadoras de placa, ou UFPs, recuperadas em cada condição testada. Os números finais estão representados em triplicatas, sendo representativos de 2 testes virucidas realizados independentemente. Limite de detecção definido pelo teste de citotoxicidade 100 UFPs. **ALD = SARS-CoV-2 infeccioso não detectado, ou abaixo do limite de detecção.**

Resultados (Continuação):

Tabela 4: Recuperação de SARS-CoV-2 em log10 médio após exposição ao “Nanogel”.

Log10 médio da recuperação de SARS-CoV-2 após exposição ao "Gel Antisséptico com Nanocobre"	Tempo de contato →	minutos				horas		
		1	2	10	60	8	16	24
SARS-CoV-2 Controle		6,26	6,22	6,21	6,10	5,86	5,27	5,01
SARS-CoV-2 + Gel Antisséptico com Nanocobre		2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Tabela 4: log10 médio de recuperação de UFPs do SARS-CoV-2 após exposição ao “Nanogel potencializado com Cobre”. Como não foram detectadas UFPs de SARS-CoV-2 após exposição ao Nanogel, os números representam em log10 médio o limite de detecção da técnica definido pelo ensaio de citotoxicidade, ou seja, 2 log10.

Tabela 5: Fator de redução da carga viral de SARS-CoV-2 em log10 médio após exposição ao Nanogel potencializado com Cobre.

	Tempo de contato →	minutos				horas		
		1	2	10	60	8	16	24
Fator de Redução da Carga viral de SARS-CoV-2 em log10		4,26	4,22	4,21	4,10	3,86	3,27	3,01

Tabela 5: Representação em log 10 do fator de redução da carga viral de SARS-CoV-2 após exposição ao Nanogel potencializado com Cobre. Um fator de redução superior a 4 log10 corresponde a uma redução da carga viral superior a 99.99%.

5 – CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DO TESTE:

O teste empregado no presente estudo é considerado válido, ou aceitável, quando os critérios de validação listados abaixo são satisfeitos:

1. A suspensão viral em teste possui concentração suficiente que permita a determinação de pelo menos 4.0 log₁₀ de título viral.
✓ Aprovado.
2. A citotoxicidade do produto testado não afeta a viabilidade da cultura celular hospedeira nas diluições das suspensões em teste necessárias para demonstrar 4.0 log₁₀ de fator de redução da carga viral.
✓ Aprovado.
3. O Efeito Citopático (ECP) induzido pelo vírus é claramente distinguível do efeito citotóxico produzido pelo produto em teste nos controles de citotoxicidade e interferência, quando presente.
✓ Aprovado.
4. Não é detectado infecção acidental de vírus no controle de viabilidade.
✓ Aprovado.
5. As diferenças de títulos virais encontradas nos controles de neutralização TEN-1 e TEN-2 e nos controles experimentais são iguais ou inferiores a 0.5 log₁₀.
✓ Aprovado.
6. A diferença de título observada no controle de interferência é igual ou inferior a 1.0 log₁₀.
✓ Aprovado
7. O fator de redução viral observado para o agente virucida de referência é superior a 4 log₁₀.
✓ Aprovado



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Imunofarmacologia
Av. Antônio Carlos, 6627
31270-901 Belo Horizonte - MG - Brasil
Fone/Fax: +55 31 3409- 2651



Resumo final dos resultados:

- Pesquisador responsável: Dr. Mauro Martins Teixeira
- Responsável técnico: Dr. Leonardo Camilo de Oliveira CRBio: 123133/04-D
- Referência técnica: Norma internacional EN 14476:2013 + A2:2019

Material virucida testado	Virucida contra o SARS-CoV-2	Fator de Redução da Carga Viral
Nanogel antisséptico potencializado com Cobre	Sim	Superior a 4 log10 Superior a 99.99%

- O teste realizado atingiu os parâmetros de controle estabelecidos na norma EN 14476:2013 + A2:2019.

Conclusões finais:

Tomando-se como referência a norma internacional EN 14476, o agente testado é aprovado no Teste Virucida Quantitativo em Suspensão quando é observado Fator de Redução da carga viral igual ou superior a 4 log10. Quando testado como descrito o agente **“Nanogel Potencializado com Cobre”** foi validado como virucida contra o SARS-CoV-2 em acordo com os padrões da norma EN 14476:2013 + A2:2019. As conclusões expostas aqui são baseadas em dados observados cientificamente.

Data da aprovação do estudo: 14/04/2022

Prof. Mauro Martins Teixeira
Professor of Immunology
mmtex@icb.ufmg.br
+55 31 99994-5133

Leonardo Camilo de Oliveira
Postdoctoral Research Scientist
leonardocamilo.oliveira@yahoo.com.br
+ 55 31 98975-3029

Referências:

1. Annual Book of ASTM Standards, Section 11 Water and Environmental Technology Volume 11.05 Pesticides, Antimicrobials, and Alternative Control Agents; Environmental Assessment; Hazardous Substances and Oil Spill Response, E1053-11.
2. Annual Book of ASTM Standards, Section 11 Water and Environmental Technology Volume 11.05 Pesticides, Antimicrobials, and Alternative Control Agents; Environmental Assessment; Hazardous Substances and Oil Spill Response, E1482-12.
3. U.S. Environmental Protection Agency, Registration Division, Office of Pesticide Programs, Draft Protocol “Protocol for Sterilization of Porous and Non-Porous Surfaces within Sealed Enclosures using Vaporized Hydrogen Peroxide”.
4. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines, OCSPP 810.2000: General Considerations for Uses of Antimicrobial Agents, September 4, 2012.
5. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines, OCSPP 810.2200: Disinfectants for Use on Hard Surfaces – Efficacy Data Recommendations, September 4, 2012.
6. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. Lennette, E.H., Lennette, D.A. and Lennette, E.T. editors. Seventh edition, 1995.
7. Blackwell, J.H., and J.H.S. Chen. 1970. Effects of various germicidal chemicals on HEP-2 cell culture and Herpes simplex virus. J. AOAC 53:1229-1236.
8. Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann et al. Evaluation of the Virucidal Efficacy of Disinfectant Wipes with a Test Method Simulating Practical Conditions. Antimicrob Resist Infect Control. 2019. doi: 10.1186/s13756-019-0569-4.
9. S Gemein, J Gebel, B Christiansen et al. Interlaboratory Reproducibility of a Test Method Following 4-field Test Methodology to Evaluate the Susceptibility of Clostridium Difficile Spores. J Hosp Infect. 2019. 103(1):78-84. doi: 10.1016/j.jhin.2019.04.011.

10. ASTM E2967-15. Standard test method for assessing the ability of pre-wetted towelettes to remove and transfer bacterial contamination on hard, non-porous environmental surfaces using the Wiperator. West Conshohocken 2015, PA ASTM International 2015.

11. ISO 21702:2019. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces. ICS: 83.080.01. Plastics in general. 2019.

12. Araujo D.B., Machado R.R.G., Amgarten D.E. *et al.* SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020. doi: 10.1590/0074-02760200342.

13. BS EN 14476:2013+A2:2019. 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). EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2019.