

RAPPORTO VIRUCIDA - LINEA DI PRODOTTI VERDEPIU / NOOIL

Il rapporto è stato presentato all'Università UNICAMP, uno dei migliori in Brasile. Il Dr. Clarisse che firma il rapporto è a capo del laboratorio. Ha 6 dottorati, uno compreso in Europa.

Rapporto sul test di efficacia virucida contro Coronavirus.

Alla cortese attenzione:

GFB Green Facilities Brasil

1) Prodotto:

LINEA DI PRODOTTI VERDEPIU / NOOIL

- 1/1 - 100% del campione disponibile.
- 1/2 - 50% del campione disponibile.
- 1/4 - 25% del campione disponibile.
- 1/9 - 11,11% del campione disponibile.

2) Nome campione: Linea VerdePiu / Nooil

3) Virus testato: ceppo di CORONAVIRUS del genere MHV-3 Betacoronavirus (stesso genere del SARS-1-CoV, SARS-2-CoV, MERS e altri),

4) Procedura sperimentale:

a) I test sono stati eseguiti in laboratorio NB-2 (livello di biosicurezza 2) a seguito delle raccomandazioni di ANVISA Art. 1 e Art. 3 di IN 04/13 e IN 12/16 e metodologie descritte nelle norme (EN14476: 2019, ASTM E1053 - 11 e Robert Koch Institute -RKI) e obbedendo a Good Laboratory Practices (GLP).

b) I test sono stati eseguiti in quadruplicato biologico:

- positivo (presenza di virus, con l'uso di disinfettante e sistema cellulare);
- controllo cellulare negativo (solo sistema cellulare, senza presenza di virus e senza la presenza di disinfettanti);
- controllo della diluizione / titolazione del virus e della coltura cellulare.

c) La miscela di Virus e VerdePiu / Linha Nooil è stata soggetta a differenze concentrazioni e quindi inoculato in una cellula permissiva (L929).

d) La titolazione del coronavirus (ceppo MHV-3) è stata eseguita secondo il metodo DICT50 (Dosi infettive di colture di tessuti del 50%). Diluizioni sequenziali del virus nella base 10 Sono stati eseguiti 96 fori sterili in quadruplicato in micropiastre.

I seguenti erano stati aggiunti L929 cellule con una concentrazione da 1,5 a 3,0 x 10⁴ cellule / vetrino.

Dopo 48 h controllato l'effetto citopatico (ECP) dell'infezione virale, rispetto al controllo cellulare e controllo virale.

e) Micropiastre con Linea VerdePiu / Nooil (diverse diluizioni), virus e sistema cellulare (L929) sono stati incubati a 37 ° C in una serra con il 5% di CO₂ per 48 ore.

f) I titoli sono stati calcolati utilizzando il metodo Spearman & Karber (Miller & Ulrich, 2001).

g) I risultati sono espressi in percentuale di inattivazione virale rispetto a controllo virale (titolo del virus) non trattato.

5) Risultati:

Tabella 1 - Risultati dei test con Coronavirus (Cepa MHV-3) e diverse diluizioni al prodotto "VerdePiu / Linha Nooil"

Risultato inattivazione in Percentuale *

(Tavolo 2) Concentrazioni di coronavirus del prodotto (ceppo MHV-3)

Linea "VerdePiu / Nooil"

1 / 1- 100% del campione disponibile. 99,99%

1 / 2- 50% del campione disponibile. 99,99%

1/4 - 25% del campione disponibile. 99,99%

1/9 - 11,11% del campione disponibile. 99,99% **

** Questa concentrazione ha mostrato bassa citotossicità cellulare in vitro.

Tabella 1 - Risultati dei test con Coronavirus (Cepa MHV-3) e diverse diluizioni al prodotto "VerdePiu / Linha Nooil"

* Tabella 2 - I risultati sono espressi in percentuale di inattivazione virale rispetto a controllo virale non trattato:

Registro riduzione Riduzione / riduzione del fattore di riduzione percentuale

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>

6. Conclusioni:

Il prodotto analizzato ha mostrato attività virucida.

- Considerando che il 99,99% della contaminazione virale è stata inattivata, si può concludere che il prodotto VerdePiu / Linha Nooil è stato efficace e pertanto consigliamo a diverse concentrazioni, come agente virucida per i virus nel gruppo Coronavirus.

Prof. Dr. Clarice Weis Arns

Responsabile del rapporto

Professore, Dipartimento di Biochimica, Laboratorio di Termodinamica delle Proteine Istituto di Biologia, Università di Stato di Campinas (UNICAMP) Città universitaria Zeferino Vaz, Rua Campinas, 13083-862, SP, Brasile Monteiro Lobato, 255

Biografia

Clarice Weis Arns ha conseguito il dottorato di ricerca e ha lavorato presso il Dipartimento di genetica, Laboratorio di virologia animale, Evoluzione e bioagenti, Istituto di biologia, Università statale di Campinas (UNICAMP), Università cittadina Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, Brasile.

Bibliografia consultata:

ANVISA - Ministero della sanità / Agenzia nazionale di sorveglianza della salute

ISTRUZIONE NORMATIVA N. 4, DEL 2 LUGLIO 2013

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/int0004_02_07_2013.html

ANVISA - ISTRUZIONE NORMATIVA N. 12, DELL'11 OTTOBRE 2016 ANVISA.

<https://alimentosconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-12-2016-anvisa/>

<https://alimentosconsultoria.com.br/instrucao-normativa-in-no-50-de-3-de-dezembro-de-2019-anvisa/>

BS EN 16777: 2018: disinfettanti chimici e antisettici. Test quantitativo superficiale non poroso senza azione meccanica per la valutazione dell'attività virucida dei disinfettanti chimici utilizzati nell'area medica

BS EN 14476: 2013 + A2: 2019

Integrazione della rettifica di agosto 2019

Disinfettanti chimici e antisettici -Test di sospensione quantitativa per la valutazione di attività virucida nell'area medica - Metodo di prova e requisiti (Fase 2 / Fase 1)

BS EN 16777: 2018: disinfettanti chimici e antisettici. Test quantitativo superficiale non poroso senza azione meccanica per la valutazione dell'attività virucida dei disinfettanti chimici utilizzati nell'area medica

DIN EN 14476: 2015. Disinfettanti chimici e antisettici. virucida

test di sospensione quantitativa per disinfettanti chimici e antisettici utilizzati nella medicina umana. Metodo e requisiti di prova [fase 2, passaggio 1].

Bruxelles 2015, commissione per la normalizzazione CEN-Européen.

Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann, Birte Bischoff, Daniel Todt, Eike Steinmann,

Joerg Steinmann, Florian H. H. Brill e Jochen Steinmann

Valutazione dell'efficacia virucida delle salviette disinfettanti con un metodo di prova simulazione di condizioni pratiche

Resistenza antimicrobica e controllo delle infezioni (2019) 8: 121

<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-4>

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann

Persistenza di coronavirus su superfici inanimate e loro inattivazione con agenti biocidi

Journal of Hospital Infezione 104 (2020) 246e251

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701

JEFF MILLER e ROLF ULRICH

Sull'analisi delle funzioni psicometriche: il metodo Spearman - Kärber

Perception & Psychophysics 2001, 63 (8), 1399-1420

Rabenau HF, Schwebke I, Blumel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A,

Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P.

Linee guida dell'Associazione tedesca per il controllo delle malattie da virus (DVV) e.V. e il Robert Koch-Institute (RKI) per testare disinfettanti chimici per l'efficacia contro i virus nell'uomo medicinale. Versione del 1 ° dicembre 2014.

Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2015; 58: 493-5050



Cidade Universitária, 23 de junho de 2020

Recebe:

GFB Green Facilities Brasil

Laudo TESTE VIRUCIDA – VERDEPIU/ LINHA PRODUTOS NOOIL

Vimos por meio desta enviar a V.Sa. o laudo sobre teste de eficácia a vírus (virucida).

1) Produto:

VERDEPIU / LINHA PRODUTOS NOOIL

- 1/1 – 100% da amostra disponibilizada.
- 1/2 – 50% da amostra disponibilizada.
- 1/4 – 25% da amostra disponibilizada.
- 1/9 – 11,11% da amostra disponibilizada.

2) Empresa solicitante:

Nome da Amostra: VerdePiu / Linha Nooil
GFB Green Facilities Brasil Ltda

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

4) 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 obedecendo as Boas Práticas de Laboratório (BPL).
- b) Os testes foram realizados em quadruplicata biológica:
 - positivo (presença dos vírus, com o uso do desinfetante e sistema celular);
 - negativo controle de células (apenas sistema celular, sem a presença dos vírus e sem a presença dos desinfetantes);
 - controle da diluição/titulação dos vírus e cultivo celular.



Cidade Universitária, 23 de junho de 2020

- c) A mistura do vírus e do **VerdePiu / Linha Nooil** foi submetida a diferentes concentrações, e a seguir foram inoculadas em célula permissiva (L929).
- d) A titulação do Coronavírus (Cepa MHV-3) foi realizada de acordo com método $DICT_{50}$ (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 células L929 com uma concentração de $1,5$ a $3,0 \times 10^4$ células/orifício. Após 48 hs verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.
- e) As microplacas com **VerdePiu / Linha Nooil** (diferentes diluições), vírus e sistema celular (L929) foram incubadas a $37^{\circ}C$ em Estufa com 5% de CO_2 durante 48 hs.
- f) Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Miller & Ulrich, 2001).
- g) Os resultados são expressos em **percentual inativação viral** em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

5) Resultados:

Tabela 1 - Resultados dos ensaios com Coronavírus (Cepa MHV-3) e diferentes diluições relação ao produto “VerdePiu / Linha Nooil”

GFB Green Facilities Brasil Ltda		Resultado inativação em Percentual* (tabela 2)
Produto	Concentrações	Coronavírus (Cepa MHV-3)
VerdePiu / Linha Nooil	1/1 – 100% da amostra disponibilizada.	99,99%
	1/2 – 50% da amostra disponibilizada.	99,99%
	1/4 – 25% da amostra disponibilizada.	99,99%
	1/9 – 11,11% da amostra disponibilizada.	99,99% **

** Esta concentração mostrou baixa citotoxicidade Celular *in vitro*.



Cidade Universitária, 23 de junho de 2020

***Tabela 2** - 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>

6) Conclusões:

O produto analisado mostrou atividade virucida.

- Considerando que houve inativação de 99,99% da contaminação viral, pode-se concluir que o produto **VerdePiu/ Linha Nooil** foi eficaz, e portanto, recomendamos nas diferentes concentrações, como gente virucida para os vírus do grupo Coronavírus.

Atenciosamente,

Prof Dra Clarice Weis Arns
Responsável pelo Laudo



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



Cidade Universitária, 23 de junho de 2020

Bibliografia Consultada:

ANVISA - Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 2 DE JULHO DE 2013

http://bvsmis.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

JEFF MILLER and ROLF ULRICH

On the analysis of psychometric functions: **The Spearman–Kärber method**

Perception & Psychophysics 2001, 63 (8), 1399-1420

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