

RELATÓRIO 552.2021.102
Versão 02

**ESTUDO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ACORDO COM A ISO
21702:2019**

Amostras NV.796.02 e NV.797.02

Patrocinador:	D3M INDUSTRIA E COMERCIO LTDA
Endereço:	Rua Leopoldo Mertens, 1600, São Francisco, Belo Horizonte – MG, CEP 31255-200
Local de realização da pesquisa:	Núcleo Vitro Serviços Científicos Ltda. Rua da Várzea, 22, Jardim São Pedro, Porto Alegre-RS, Brasil, CEP 91040-600
Código do Produto:	NV.796.02; NV.797.02
Nome do Produto:	PLA Antiviral
Recebimento da Amostra:	11/06/2021
Emissão do Relatório:	05/07/2021

1. INTRODUÇÃO

A procura de produtos que ofereçam proteção contra agentes causadores de doenças é crescente. A mudança de hábitos e a inclusão de processos de limpeza e desinfecção rotineiros levou ao aumento a busca por novos produtos, soluções eficazes e práticas. De acordo com essa demanda, compostos com propriedades antimicrobianas vem sendo utilizados e aplicados a diversas indústrias, com o objetivo de incorporar propriedades funcionais agregando valor e qualidade aos produtos – assim promovendo bem estar e saúde ao consumidor.

Produtos com acabamentos antimicrobianos e/ou antivirais possuem características que necessitam de testes específicos para a avaliação da performance, como por exemplo, a avaliação de uma possível atividade antiviral frente à exposição do material a partículas infecciosas de vírus. Para tanto, é utilizada a ISO 21702:2019 como referência para avaliar produtos porosos e não-porosos tratados para ter atividade antibacteriano e/ou antiviral.

Agentes antivirais são produtos capazes de reduzir o número de partículas virais infecciosas que tem contato com a superfície de produtos. Este relatório apresenta os dados do experimento conduzido conforme a ISO 21702 e produziu um resultado quantitativo a fim de testar a performance antiviral do produto.

Esse estudo foi realizado com um vírus da família coronavírus, sendo membro da família do Sars-CoV-2. Os coronavírus são vírus com genoma RNA pertencentes à família Coronaviridae. A subfamília Orthocoronaviridae se divide em 4 gênero: Alfa, Beta, Gamma e Deltacoronavírus. Neste ensaio utilizamos o alfacoronavírus (CCoV), como modelo de partícula viral pertencente à família que representa um bom modelo de vírus.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial da amostra em reduzir a viabilidade viral de alfacoronavírus de acordo com a ISO 21702:2019.

3. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

As condições experimentais utilizadas são aceitas e condizentes com as metodologias aplicadas atualmente de acordo com a ISO 21702:2019.

4. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Nome da amostra	Código Interno Núcleo Vitro	Condições de Armazenamento
Natural/ sem aditivos	NV.796.02	Temperatura Ambiente
PLA Antiviral	NV.797.02	Temperatura Ambiente

5. METODOLOGIA

5.1 Cultura de células

Neste estudo foram utilizadas células VERO, mantidas em cultivo com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com adição de suplementos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e manipuladas dentro da capela de fluxo laminar. Na passagem 03 após descongelamento, as células foram distribuídas em placas próprias para cultura em monocamada.

5.2 Cultivo de vírus

Foi utilizado o alfacoronavírus (CCov- VR 809) previamente titulado, conforme cálculo apresentado a seguir. Para o ensaio, foi utilizado a concentração de vírus de 10^{5,0} partículas.

5.3 Determinação da dose de uso pelo método TCID₅₀:

$$Y = X \times 10^a$$

$$a = \sum p - 0,5$$

x= Base de diluição - Foi utilizada a base 10

Cálculo da solução estoque de vírus

Cálculo do valor de p, com base no número de replicatas da titulação de acordo com as 7 diluições na base 10.

$$a = \sum 7 - 2,0 ; a = 5,0$$

Concentração de uso no ensaio: 10^{5,0}

5.4 Preparo das amostras

Amostras **NV.796.02** e **NV.797.02**

- Condições de preparo da amostra nas condições de uso: fragmentos de 5 cm x 5 cm.

5.5 Preparo dos grupos controles

Grupo controle celular: meio de cultura suplementado;

Grupo controle viral: meio de cultura suplementado + adição de quantidade conhecida de vírus;

5.6 Análise de citotoxicidade

O grupo controle celular e os grupos NV.796.02 e NV.797.02 foram incubados em meio de cultura suplementado nas mesmas condições do ensaio com vírus para avaliar se as amostras apresentam potencial citotóxico celular. O meio de cultura foi adicionado a monocamada de células em duplicata para cada grupo. Ao final de 24 horas, foi avaliado por imagens a cultura de células dos grupos.

5.7 Análise de atividade antiviral

A alíquota de vírus foi diluída em meio de cultivo celular e os fragmentos das amostras (NV.796.02 e NV.797.02) foram dispostos em placas de Petri estéreis. Foi inoculado 0,4 mL da solução de vírus previamente preparada sobre cada amostra que foi coberta com filme plástico e incubada por 15 e 30 minutos, em condições estéreis de trabalho. Após contabilizados os tempos de exposição (contato direto), a alíquota foi recuperada e separada em novo tubo, finalizando o contato com a amostra. Esta amostra serviu como primeiro ponto da diluição seriada, que quantifica a atividade. O grupo controle viral foi realizado da mesma forma sem ter contato com nenhum fragmento de amostra. Após, foi inoculado em monocamada de células em quadruplicata para cada grupo para avaliação da multiplicação viral.

5.8 Análise dos resultados

O cultivo celular inoculado foi avaliado conforme mudanças de morfologia, que são caracterizadas pelo efeito citopatogênico (ECP) causado pelos vírus em teste. É realizada a comparação do grupo controle celular (sem vírus) com o grupo controle viral e grupos NV.796.02 e NV.797.02 para avaliar a presença de replicação viral através de captura de imagens e comparação com titulação viral realizada, que demonstra a redução do número de partículas virais infecciosas

em logaritmos. O resultado é expresso em redução de logaritmos da quantidade de partículas virais, e transformado em valores de referência conforme preconizado na ISO 21702:2019.

6. RESULTADOS

6.1 Análise da citotoxicidade

Para a avaliação da titulação viral, é necessário que também seja realizada a avaliação de potencial citotóxico das amostras. Para isso, é avaliado a monocamada da cultura bem como a morfologia das células. Foi observado uma monocamada confluyente e o estabelecimento da morfologia em todos os grupos na diluição 1:10.

6.2 Análise da atividade antiviral

O vírus avaliado causa alterações na morfologia celular que são denominadas como efeito citopatogênico. Através desse efeito, é possível analisar e quantificar a presença de multiplicação viral em cada grupo. A partir da identificação da titulação viral de cada grupo, é realizado o cálculo do valor de atividade antiviral (R), sendo:

$$R = U_t - A_t$$

R = valor da atividade antiviral

U_t = média logarítmica do grupo da amostra controle;

A_t = média logarítmica do grupo da amostra com tratamento antiviral;

A partir desses cálculos, foram observados os seguintes resultados para a amostra NV.797.02 nos diferentes pontos de tempo avaliados (Tabela 1):

Vírus avaliado: Alfacoronavírus (CCov – VR809)			
Amostra	Tempo de contato	R	Porcentagem
NV.797.02	15 minutos	1,67	97,8%
	30 minutos	2,0	99,0%

Tabela 2. Resultados da titulação viral de CCov após o tempo de contato avaliado com os resultados de R e a relação em porcentagem de redução viral.

A redução de 2,0 logaritmos na titulação viral causado pelo grupo NV.797.02 apresentou atividade antiviral que está relacionado a redução de 99,0% de partículas virais do CCov após 30 minutos de contato.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que:

- A amostra NV.797.02 reduziu 1,67 logaritmos ($R = 1,67$) estando relacionado a redução de 97,8% de partículas virais após 15 minutos de contato;
- A amostra NV.797.02 reduziu 2,0 logaritmos ($R = 2,0$) estando relacionado a redução de 99,0% de partículas virais após 30 minutos de contato;

8. PARECER

No estudo intitulado “**ESTUDO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ACORDO COM A ISO 21702:2019**” referente ao produto **PLA Antiviral**, código **NV.797.02**, enviado pelo patrocinador **D3M INDUSTRIA E COMERCIO LTDA** pode-se concluir que:

O produto PLA Antiviral, código NV.797.02, possui atividade antiviral.

Este relatório se destina exclusivamente à **Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde** e ao uso interno da empresa **D3M INDUSTRIA E COMERCIO LTDA**. Nenhuma informação deste relatório pode ser divulgada em quaisquer veículos de comunicação sem autorização por escrito do autor.

9. NOTAS

Os resultados aqui descritos são aplicáveis somente à(s) amostra(s) testada(s), nas condições e concentrações avaliadas neste estudo.

Os resultados apresentados são exclusivamente obtidos de testes *in vitro*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B. et al. Biologia molecular da célula. Artmed: 6ª edição. 2017.
- Carlucci, et al. Antiherpetic activity and mode of action of natural cargeenans of diverse structural types. Antiviral Research: 1999: 93-102.
- ISO 21702:2019 –Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces.
- Su, et al. Modes of antiviral action of chemical portions and constituents from woad root extract against influenza virus A FM1. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2016.
- Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. Emerg Infect Dis. 2006;12(3):492–4.
- Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Vol. 357, Lancet. Elsevier Limited; 2001. p. 1513–8.

11. ASSINATURA

Diretor responsável pela Núcleo Vitro:

Bibiana Franzen Matte

Bibiana Franzen Matte, PhD
CRO 23877