



Cidade Universitária, 19 de outubro de 2020

**Dados do Fornecedor:**

INCOCRYL Ind. e Comercio  
tintas Ltda  
Rua Jacinto Gonçalves, 254  
Jd São Jorge – São Paulo, SP - Cep: 05568-240

**Referente: LAUDO VIRUCIDA VERNIZ**

**1. Produto:**

**REVITARE NANO IS-47** Acetinado 18 L Ref: IS47  
Verniz de Proteção Inteligente  
Nano Prata (dispersão coloidal de prata)  
lote: 082006B Fabricação: 25/08/2020

**2. Vírus testado: Coronavírus cepa MHV, Gênero *Betacoronavírus*** (mesmo gênero e família dos SARS-CoV1, SARS-CoV-2/Covid19, MERS).

Vírus	Linhagem Celular
Coronavírus cepa MHV3	Célula: L929 NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

**3. Metodologia:**

- 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: INTERNATIONAL STANDARD ISO- BS ISO 21702:2019 (First edition 2019-05-27): “Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces” e do Instituto Robert Koch – RKI) e obedecendo as Boas Práticas de Laboratório (BPL).  
O meio de cultura para vírus e linhagens celulares foram utilizados o Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) contendo 2% a 10% de soro fetal bovino.
- b) A titulação do Coronavírus (Cepa MHV) foi realizada de acordo com método DICT<sub>50</sub> (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  $2 \times 10^5$  células/orifício. Após 48 horas verifica-se o efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral. Os títulos foram calculados com base no método de Reed and Muench, 1938.
- c) A primeira etapa dos ensaios foi realizar a “Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)” nas diferentes células testadas, para determinar a concentração que não



Cidade Universitária, 19 de outubro de 2020

causa toxicidade para as células. Pois a substancia teste deve ser ativa somente contra o vírus e não às células.

- d) Amostra de Tinta **REVITARE NANO IS-47** foi diluída em 5% de água e preparada em 4 repetições em placas de Petri estéreis que recebeu vírus ( $100\text{DICT}_{50}$ ) cobrindo o inóculo. Após a amostra ter sido inoculada, as placas de Petri foram fechadas com a tampa e incubadas sob leve agitação (incluindo as amostras de teste não tratada), incubadas a  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  com umidade relativa não inferior a 90% por 24 horas.
- e) Após o período de incubação de 24 horas as amostras foram colhidas e tratadas.
- 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) 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/controles:

- Negativo: controle celular ( $2 \times 10^5$  células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostras teste.
- Controle de vírus: Titulação de vírus ( $10^1$  a  $10^{12}$ ) e cultura de células em meio DMEM
- Teste positivo: presença de vírus, cada amostra teste e linhagem celular em meio DMEM.

**\*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 Atividade
1	10	90%
2	100	99%
3	1000	99,9%
4	10.000	99,99% virucida
5	100.000	99,999% virucida
6	1.000,000	99,9999% virucida

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

Cidade Universitária, 19 de outubro de 2020

#### 4. Resultados

**Tabela 1** - Resultados dos ensaios com Coronavírus (Cepa MHV) e diferentes tempos de contato com as amostras de REVITARE NANO IS-47

Produtos/características	Tempo de contato	Resultado inativação em Percentual* (tabela 1) Coronavírus	Citotoxicidade Celular <i>in vitro</i> Linhagem celular L929
REVITARE NANO IS-47	1 minuto	(99,9%)	Sem toxicidade
Acetinado 18 L_	5 minutos	Virucida (99,99%)	Sem toxicidade
Verniz de Proteção Inteligente	10 minutos	Virucida (99,99%)	Toxicidade baixa
Nano Prata (dispersão coloidal de prata)	24 horas	Virucida (99,99%)	Toxicidade baixa

#### 5. Conclusões:

- Considerando que houve inibição de 99,99% em relação ao Coronavírus testado, pode-se concluir que:
- O produto **REVITARE NANO IS-47** foi eficaz para a inativação de partículas virais, e, portanto, recomendamos o uso como potencial agente virucida para Coronavírus semelhante ao COVID-19.
- O resultado da avaliação da citotoxicidade *in vitro* mostrou que o produto não foi tóxico as células nos tempos de 1 e 5 minutos.



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Clarice Weis Arns  
(ID Lattes: 8635038112182716)



Cidade Universitária, 19 de outubro de 2020

### 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/>

### INTERNATIONAL STANDARD ISO- BS ISO 21702:2019 (First edition 2019-05-27): “Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces”

**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

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 LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493–497.