

Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de junho de 2021

Empresa Solicitante:

Ozoxx - ozonioterapias
Rua Chile, número 1306, Jardim Alvorada
CEP: 87033-370
Maringá/PR

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Referente: Laudo Eficácia a Vírus em Equipamento OZOXX AR

Vimos por meio desta enviar a V.Sa. o laudo de testes de eficácia a vírus realizados neste laboratório.

1. Produto: Equipamento OZOXX AR

Equipamento gerador de gás ozônio para descontaminação de ar e ambiente.



Data dos testes no equipamento: 26/05/2021

Data resultado: 24/06/2021



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de junho de 2021

2. Condições experimentais

Temperatura do ensaio	22 °C +/- 1 °C
Concentração do produto	Gas O ₃ sobre 100DICT ₅₀ de Vírus
Controle de citotoxicidade	Teste <i>in vitro</i> na linhagem celular para a "Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD)", para definir a concentração que não causa toxicidade às células.
Controle de neutralização	DMEM + 5% soro fetal bovino a 4 °C
Controle virucida	Formaldeído a 0,7%.
Temperatura de incubação	37 °C + 5% de atmosfera de CO ₂ .
Tempo de incubação	48h após período de adsorção do vírus a célula permissiva.

3. Vírus testados: Coronavírus cepa MHV-3, Gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/COVID19 e MERS)

Vírus-procedência	Linhagens Celulares
Coronavírus MHV-3 Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp; GenBank (MW620427), Garcia, et al, 2021.	L929 NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

4. Metodologia:

- 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 com adaptações pertinentes.
O meio de cultura para vírus e linhagens celulares foi utilizado o Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco® contendo 2% a 10% de soro fetal bovino.
- A titulação do Coronavírus (Cepa MHV) foi realizada de acordo com método DICT₅₀ (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 2×10^5 células/orifício, contados através do equipamento *Cell Counter R1, Olympus*. Para a adsorção do vírus, foi incubado por 1 hora a 37°C em incubadora com 5% de CO₂. Após este período foram



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de junho de 2021

acrescentados 100 µL de meio DMEM com 10% nas microplacas e incubada a 37°C em Estufa com 5% de CO₂.

Após 48 horas de incubação 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.

- a) O **Equipamento Gerador de Ozônio OZOXX-AR** ficou ligado 5 minutos para estabilização do equipamento antes de realizar os testes. O ensaio antiviral foi realizado dentro de uma câmara de Biossegurança. Pacas de Petri contendo Coronavírus Cepa MHV-3 (com 100 DICC/mL) com meio de cultura DMEM foram deixadas agir por 5, 15 e 30 minutos sob exposição de Ozônio ligado, e mais 20 minutos com o equipamento desligado. Após transcorrido os respectivos tempos, as placas de Petri foram recolhidas, lacradas e congeladas a -80°C até o momento do uso.
- b) A placas foram descongeladas e testadas:
- d.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 Ozônio deve ser ativa somente contra o vírus e não às células.
- d.2) As placas foram submetidas a avaliação quanto a inibição ou não do vírus, a saber: Cada suspensão (Vírus + Diferentes amostras e tempo de contato) foi pipetada 100 µL em microplacas, homogeneizadas e diluídas.
- Em seguida 100 µL da célula (L929) foi pipetada sobre a suspensão e incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.
- c) Após 48 horas de incubação as placas foram lidas através de Microscópio Invertido na busca do Efeito Citopático característico do vírus 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/Controles:

- Negativo: controle celular (2x10⁵ células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostras teste. Controle de vírus: Titulação de vírus (10¹ a 10¹⁰) e cultura de células em meio DMEM
- Teste positivo: presença de vírus, cada amostra teste e linhagem celular em meio DMEM.
- Controle virucida: Formaldeído a 0,7% e linhagem celular em meio DMEM.
- Controle Citotoxicidade: controle celular (2x10⁵ células/mL) em meio DMEM, sem vírus e com amostras teste.



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de junho de 2021

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>

5. Resultados:

Tabela 2- Resultado do Teste de citotoxicidade

Célula	O título da diluição mais alto que não mostra toxicidade à célula hospedeira
L929	10^{-1}

Tabela 3. Resultados do título viral e controle virucida Formaldeído a 0,7% ($\log_{10}TCID_{50}/ml$).

Vírus	Título Viral	Controle virucida (Formaldeído a 0,7%)
Coronavirus MHV-3	8,25	2,00

Tabela 4. Ação do Equipamento "Gerador de Ozônio OZOXX AR" sobre Coronavírus (MHV-3) e tempos de ação.

Equipamento Gerador de Ozônio OZOXX AR	Tempos de contato	Coronavírus-MHV Resultados em percentual de atividade (Tabela 1)	Teste <i>in vitro</i> Citotoxicidade Celular L929
Equipamento de O3 OZOXX-AR ligado	5 minutos	99% de atividade virucida	10^1
	15 minutos	99,9% de atividade virucida	
	30 minutos	99,9% de atividade virucida	
Equipamento de O3 OZOXX-AR desligado	20 minutos	99% de atividade virucida	10^1



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



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de junho de 2021

6. Conclusões:

- Considerando que houve inativação de até 99,9% da contaminação viral é possível concluir que o **equipamento Gerador de Ozônio OZOXX-AR** foi eficaz na destruição de partículas virais.
- Portanto, os resultados do equipamento **Gerador de Ozônio OZOXX-AR**, poderá ser recomendado para o combate ao grupo Coronavírus (incluindo a COVID-19), e assim auxiliar na eliminação de Coronavírus no ar/ambiente.
- O equipamento ligado e mais 20 minutos desligado inativou 99% o Coronavírus testado.
- A emissão de Ozônio do equipamento em contato com as células L929 (sem vírus) *in vitro* mostrou que o equipamento OZOXX foi pouco tóxico às células testadas, ou seja, foi tóxico somente até a diluição 10^1 .

Profa Dra Clarice Weis Arns (Matricula Unicamp 224626)
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



Cidade Universitária “ZEFERINO VAZ”, 27 de junho 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

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)

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

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

Garcia AB, de Moraes AP, Rodrigues DM, Gilioli R, de Oliveira-Filho EF, Durães-Carvalho R, et al. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. Microbiology Resource Announcements. 2021;10:e00248-21

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.