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", 20 maio, 2020.

Ao Sr.
Vivaldo Mason Filho
Diretor
MyOzone®
Rua Arlindo Bozi, Ch Sto Antonio
CEP: 13915-294 Jaguariúna-SP

Referente: **Laudo eficácia virucida: ÁGUA E NEVOA OZONIZADA**

Prezado Sr Vivaldo,

Vimos por meio desta enviar a V.Sa. o laudo do teste de eficácia no combate a vírus.

1) **Produto: MyOzone®**

Características do Equipamentos: gera um produto de limpeza sustentável tudo-em-um, nas próprias instalações do cliente, utilizando apenas água e eletricidade.

Não nocivo à saúde e nem ao meio ambiente, sem armazenamento, sem diluição, sem geração de lixo nem resíduos. Solução multiuso, desodorizadora e desinfetante uso geral.

Tecnologia 1: Névoa fria ozonizada produzida por ultrassom
Modelo do Equipamento: N10
Medição de residual de gás ozônio na névoa: 0ppm
Concentração de ozônio incorporado na névoa: 50ppm já diluído
Produção de névoa: 5 Litros por hora ou 83mg/minuto
Tamanho da gotícula de água ozonizada: <5 micras
Concentração de ozônio na saída do gerador de ozônio: 35mg/L
Vazão de oxigênio na entrada do gerador de ozônio: 2LPM

Tecnologia 2: Água Ozonizada produzida por equipamento de microbolha
Modelo do Equipamento: MB10
Concentração de ozônio incorporado na névoa: 50ppm já diluído
Vazão do bico nebulizador: 60ml/h
Concentração de ozônio na saída do gerador de ozônio: 35mg/L
Vazão de oxigênio na entrada do gerador de ozônio: 2LPM

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

Laudo eficácia virucida: ÁGUA E NEVOA OZONIZADA

Condições do Teste:

- Água + Ozônio
- Nuvem ozonizada para aspersão e nebulização.
- Ambos foram testados quanto a citotoxicidade nas células de linhagem *in vitro.*

2) **Vírus testados:** CORONAVÍRUS/MHV gênero Betacoronavirus (características semelhantes ao COVID-19, MERS e SARS
    - Os Coronavírus pertencem a família Coronaviridae, da subfamília *Orthocoronaviridae* se dividem em quatro gêneros: *Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus*.

Gênero *Betacoronavirus*: neste gênero temos as espécies COVID19, MHV-3 (murino), HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARSr-CoV e MERS-CoV.

3) **Empresa:**

MYOZONE INDÚSTRIA DE GERADORES DE OZÔNIO EIRELI
CNPJ: 17.876.787/0001-52
Inscrição Estadual: 395.051.792.124
Rua Arlindo Bozi, 170 Jaguariúna-SP
CEP: 13.915-294
Telefone: (19) 3937-6464

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

Laudo eficácia virucida: ÁGUA E NEVOA OZONIZADA

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 (obedecendo as Boas Práticas de Laboratório-BPL), metodologias descritas nas normas (EN14476:2015, ASTM E1053 – 11 e do Instituto Robert Koch – RKI).

b) Os testes foram realizados em quatro repetições (quadruplicata):

- 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 causa toxicidade para as células. Pois a substancia teste (água e ozônio) deve ser ativa somente contra o vírus e não às células.
- Ensaio positivo: presença do vírus, água + ozônio e NÉVOA ozonizada e sistema celular;
- Negativo: controle de células (apenas sistema celular, sem a presença de vírus e sem a presença de água + ozônio);
- Controle da diluição/titulação dos vírus e cultivo celular.
- A mistura vírus e **ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA** foi submetida a diferentes tempos de contato (10, 15 e 20 segundos; 0,5, 1, 2 e 5 minutos).

c) As placas com **ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA** + sistema celular foram inoculadas a 37ºC em Estufa com 5% de CO_2 durante 48 hs a 05 dias.

d) O título dos vírus foi expresso como $log_{10}TCID_{50}$/ml a partir do método Reed-Muench

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

Laudo eficácia virucida: ÁGUA E NEVOA OZONIZADA

5) Resultados:

A infecção/contaminação para o VÍRUS (Coronavírus-strain MHV-3) foi de INIBIDA para ambos produtos **ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA** quando aplicado na forma PURA e por 10 SEGUNDOS de contato.

6) Conclusões:

- A mistura "ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA" **não apresentou toxicidade à linhagem celular testada, portanto, não causaram danos as células vivas *in vitro*;**
- Considerando que o houve inibição da contaminação viral, pode-se concluir que as misturas **ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA** foram eficazes para a inativação/destruição de partículas virais, e, portanto, recomendamos o uso na forma PURA como potencial agente virucida para o vírus testados;
- Em relação a "redução de infectividade viral" a mesma foi 99,99% para Coronavírus;

- O tempo de contato mostrou ser ativo a partir de 10 SEGUNDOS para o vírus testado.

- Portanto, recomendamos o uso do **ÁGUA E NÉVOA OZONIZADA** como potencial agente virucida para todos os vírus do grupo Coronavírus pelo tempo de contato de 10 SEGUNDOS.

Atenciosamente,

Prof Dra Clarice Weis Arns
Responsável pelo Ensaio e Laudo

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 20/05/2020

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

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)

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.

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

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, 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.