



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

Empresa Solicitante:

EVER STAR Têxtil Comércio e Indústria Ltda.
CNPJ: 038.904.998/0001-21
Avenida River, 2419, Anexo D
Guarulhos/SP - CEP: 07251-370
Email: contato@everstar.com.br
Celular: (011) 95604-3004
Responsável: Alfredo Sung Kim
alfredo@everstar.com.br

Referente: LAUDO eficácia a vírus em TECIDOS LAVADOS- ISO 18184

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

1. Produtos: Tecidos FABRIC SHIELD

Características: Tecido 100% Poliéster, com *tratamento de íons de prata*

AMOSTRAS:
Tecido 100% PES - Lavagem 20 Aplicação: íons de prata/hidrorepelente fluorocarbono
Tecido 100% PES - Lavagem 30 Aplicação: íons de prata/hidrorepelente fluorocarbono
Tecido 100% PES - Lavagem 40 Aplicação: íons de prata/hidrorepelente fluorocarbono



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

1.1. Lavagem dos tecidos:

Os tecidos foram lavados e secos pela empresa “Rudolf Soft Indústria Química”

TECIDOS: Método de Aplicação - Rudolf Soft

Aparelhagens: Balança Eletrônica; máquina de tingimento tipo HT e canecas da máquina de tingimento.

Materiais e Reagentes: Sabão em pó.

Procedimento: 1) Preparar uma solução 5 g/L de sabão e água destilada; 2) Quando a intenção é avaliar a solidez da cor, costurar a amostra em teste à testemunha (multifibra); 3) No caso da avaliação de acabamentos, lavar somente a amostra em teste à testemunha (multifibra); 4) Utilizando uma relação de banho 1:50, lavar as amostras a 40°C durante 30 minutos; 5) Enxaguar, secar e avaliar.

1.2. Instalação de Teste e Período de Condução do Estudo:

Os ensaios foram realizados em laboratório de Virologia, NB-2 (Biosafety Level 2), Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas- SP- Brasil. As datas abaixo representam o período em que o estudo foi conduzido.

Data chegada ao laboratório:	20/04/2022
Início do Estudo	23/04/2022
Termino do Estudo	24/05/2022

1.3. Pessoal envolvido no Estudo:

Coordenadora do Estudo	Clarice Weis Arns
Pessoal Técnico	Junko Tsukamoto e Ana Paula Moraes



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

1.4. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência do acabamento de materiais têxteis a uma solução de sabão a 40°C conforme norma DIN 54014, e testado para a atividade antiviral de “Tecidos 100% PES – após 20, 30 e 40 Lavagens” frente ao vírus Coronavírus MHV-3.

2. Vírus e Célula Utilizadas:

Vírus testados: Coronavírus cepa MHV-3 gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/Covid-19, MERS e outros).

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

3. Procedimentos experimentais:

- 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 (ISO 18184/ 2019-06-25: “Textiles — Determination of antiviral activity of textile products”).
O meio de cultura para vírus e linhagem celular foi utilizado o Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) contendo 2% a 10% de soro fetal bovino.
- b) A titulação do Coronavírus (Cepa MHV-3) 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. Após 48 hs 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.



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

- c) Preparo das células: Para os estudos virucidas foram distribuídas 100µL de célula (L929) nas microplacas de 96 orifícios com uma concentração de 1.5×10^5 células/mL células/orifício diluída em meio de cultura (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino. As microplacas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 24 hs para que ocorra aderência das células às placas.
- d) Amostras testes “**Tecidos 100% PES – após 20, 30 e 40 Lavagens**” foram tratadas conforme a metodologia e as etapas indicadas na norma ISO 18148/2019.
Resumindo: As amostras de tecido foram esterilizadas por autoclave, cortadas em tamanhos indicados, adicionadas vírus e deixado agir por 2 h. Após foi adicionado 20 mL de meio em tubos de 50mL e agitado com o misturador “Vortex” para eliminar o vírus do tecido. A suspensão foi usada no teste virucida/antiviral
- e) Concentração máxima não tóxica (CMNT)
Para a determinação das concentrações/diluições a serem utilizadas nos testes virucidas, foi necessário determinar a concentração máxima que não causa toxicidade para as células. Ou seja, definir a concentração ideal para realizar a atividade antiviral/virucida, na diluição ideal para realizar o ensaio virucida.
As células foram cultivadas (c) em microplacas de 96 orifícios e após a sua aderência foi adicionado 100 uL substância teste diluída em água dura em diferentes diluições (10^1 a 10^8), incubadas por 48 horas e o resultado é lido através de microscópio invertido.
- f) As microplacas de 96 orifícios com 100uL da suspensão dos **TECIDOS** (diferentes tempos) + vírus foram inoculadas com 100uL no sistema celular (L929) e foram incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.
- g) Os títulos foram calculados com base no método de Reed and Muench, 1938.
Os resultados são expressos em percentual inativação viral (Tabela 2) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

Resumo:

- Negativo: controle celular (2×10^5 células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostra 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 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%
5	100.000	99,999%
6	1.000,000	99,9999%

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



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

4. Resultados

Tabela 2 - Resultados dos ensaios em “**Tecidos 100% PES em diferentes vezes de lavagens**” em relação atividade virucida com Coronavírus (Cepa MHV-3), diferentes tempos de contato, porcentagem de inativação e citotoxicidade celular.

AMOSTRAS	TEMPO e RESULTADO com Coronavírus	Teste Citotoxicidade
Tecido 100% PES - Lavagem 20	01 min.: 99% de inativação do vírus	1 min.: não tóxico
	05 min.: 99,9% de inativação do vírus	5 min.: não tóxico
	10 min.: 99,9% de inativação do vírus	10 min.: não tóxico
Tecido 100% PES - Lavagem 30	01 min.: 90% de inativação do vírus	1 min.: não tóxico
	05 min.: 99% de inativação do vírus	5 min.: não tóxico
	10 min.: 99,9% de inativação do vírus	10 min.: não tóxico
Tecido 100% PES - Lavagem 40	01 min.: 90% de inativação do vírus	1 min.: não tóxico
	05 min.: 99% de inativação do vírus	5 min.: não tóxico
	10 min.: 99% de inativação do vírus	10 min.: não tóxico

5. Conclusões:

- As amostras “**Tecido 100% PES – com 20 e 30 Lavagens**” mostraram inibição de 99% a 99,9% para o grupo Coronavírus.
- As amostras “**Tecido 100% PES – com 40 Lavagens**” mostraram inibição de 99% para o grupo Coronavírus.
- Os “**Tecidos 100% PES**” em contato com células em multiplicação não apresentaram atividade citotóxica nas diferentes diluições.

Profª Drª Clarice Weis Arns
(Responsável pelo laudo)



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

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://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/>

ISO 18184/ 2019-06-25: “Textiles — Determination of antiviral activity of textile products”

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.



Cidade Universitária, 25 de maio de 2022

ANEXOS:

Aparelhos utilizados:

- Cabines de biossegurança nível II e III
- Geladeiras
- Biofreezer - 80 °C
- Biofreezer -150 °C
- Incubadoras de CO₂
- Agitador (misturador Vortex)
- Cell Counter
- Medidor de pH
- Microscópio Invertido (Olympus, tipo CK 30)
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG)
- Banho-maria
- Medidor pH

vidrarias e pequenos itens de produto

- Pipetas descartáveis, ajustáveis e de volume fixo (Eppendorf AG)
- Microplacas de 96 poços Polysterol (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Frasco de cultura celular
- Tubos de ensaio selados
- Pipetas mono e multicanais (Eppendorf)
- Filtros descartáveis

Meio de cultura e reagentes

- Solução de antibióticos (penicilina-estreptomicina).
- Estoque de vírus conservado em -80°C
- Soro fetal de Bovino
- Solução de formaldeído 1,4%
- Água bidest. (Sistema de água ultrapura Sartorius)
- PBS (Invitrogen, artigo nº 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, artigo no. CA-2153)
- Eritrócitos de ovelha.
- Albumina
- Solução de tripsina versene 0,25%
- DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media): DMEM 9,6 g, Trishidroximetilaminometano (Tris) 2,4% 50 mL, Bicarbonato de sódio 2,0 g, H₂O ultrapura q.s.p. 1000 mL.
- Meio de congelamento de células;
- DMSO- Dimetilsulfóxido-10% e Soro fetal bovino 90%)