

LAUDO TÉCNICO

AÇÃO VIRUCIDA DOS GERADORES DE OZÔNIO WIER



AVISO LEGAL

É vedada a utilização deste material para finalidades comerciais, publicitárias ou qualquer outra que contrarie a realidade para o qual foi concebido. É proibida sua distribuição, exibição, publicação ou divulgação, total ou parcial, dos textos, figuras, gráficos e demais conteúdos sem prévia e expressa autorização da WIER, que é detentora da propriedade intelectual nos termos da Lei n. 9.279/1996 e da Constituição Federal.

LAUDO VIRUCIDA

VÍRUS TESTADO: Coronavírus/MHS gênero Betacoronavírus (mesmo gênero e família das espécies COVID-19, MERS e SARS-CoV-1).

1. METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados em Laboratório NB-2 (Biossegurança Nível 2), seguindo recomendações da ANVISA Art.1 e Art.3 da IN 04/13 e IN 12/16. Os testes foram conduzidos pela professora Dra. Clarice Weis Arns, que assina o laudo e está ligada ao Laboratório de Virologia do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

Após transcorrido o tempo de aplicação, as placas que ficaram expostas ao gás ozônio foram recolhidas, inoculadas com células e incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas, por 5 dias. A avaliação consistiu em verificar a dose infectante para 50% dos Cultivos Celulares [TCID₅₀] por mililitro. O vírus foi expresso com log₁₀ TCID₅₀/ml a partir de método descrito por Reed Muench (1938).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os vírus são pequenos agentes infecciosos que dependem de células vivas de outros organismos para a sua replicação. Eles são compostos por genoma RNA ou DNA e circundados por uma capa de proteína codificada, chamada de capsídeo. Dos patógenos que infectaram a população humana nas últimas décadas, a maioria tem sido vírus de RNA, incluindo Ebola, SARS, MERS, Zika, vários vírus influenza e atualmente o SARS-CoV-2 (KAMPF, et al. 2020).

Uma das principais formas de transmissão de vírus, em geral, é através de superfícies contaminadas. Sendo assim, garantir um ambiente seguro, ou seja, limpo e desinfectado é essencial (KAMPF, et al. 2020).

Um estudo recente publicado por pesquisadores do Imperial College London, mostrou que o DNA viral deixado na grade de uma cama de hospital, dentro de uma sala de isolamento, se espalhou em apenas dez horas para outras 18 superfícies, incluindo maçanetas de portas, cadeiras de sala de espera, brinquedos infantis e livros em área de recreação. Esse estudo mostra até que ponto um vírus em uma gota de líquido que cai em uma cama pode se espalhar entre pessoas que tocam as superfícies (RAWLINSON, et al. 2020).

Além de fazer a higienização e a desinfecção das superfícies, é de suma importância a desinfecção do ar ambiente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e

outras autoridades de saúde enfatizam que tanto a lavagem das mãos quanto a limpeza e desinfecção de superfícies tocadas com frequência são essenciais para prevenir a disseminação de vírus.

O ozônio (O_3) é capaz de desinfetar superfícies e o ar ambiente de locais fechados. Ele funciona essencialmente destruindo as moléculas com as quais entra em contato, incluindo moléculas constituintes dos vírus, bactérias e fungos (MURRAY et al. 2008, YOUNG et al. 2020).

O ozônio pode atacar os vírus em vários pontos de sua estrutura (detalhada na Figura 1), causando danos à integridade do vírus, ao mesmo tempo em que os torna incapazes de se reproduzirem por meio da oxidação do capsídeo viral e do material genético. Embora qualquer estrutura do vírus possa ser potencialmente atacada pelo ozônio, a estrutura que possui a maioria das ligações duplas ou grupos com alta densidade eletrônica será mais vulnerável à oxidação do ozônio (TIZAoui, 2020).

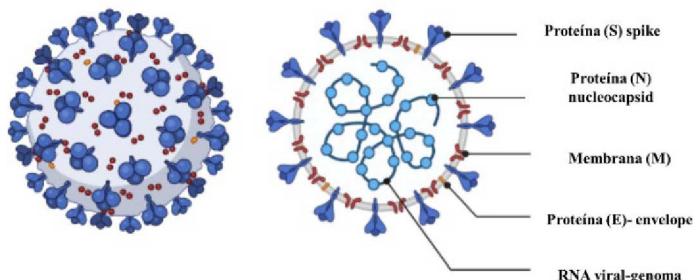


Figura 1 - Estrutura do Coronavírus¹

3. RESULTADOS

Foram realizados dois ensaios para comprovar a eficiência dos geradores de ozônio da WIER na ação virucida:

Ensaio 1: Aplicação de gás ozônio produzido pelo gerador OZmini ligado durante 30 minutos e desligado por mais 10 minutos.

Ensaio 2: Aplicação de gás ozônio produzido pelo gerador OZpro ligado durante 15 minutos e desligado por mais 10 minutos.

¹ Reprinted from "Human Coronavirus Structure", by Biorender. Disponível em: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5e99f5395fd61e0028682c01/t-5f21e90283765600b08fbe9d-human-coronavirus-structure>> Acesso em set. 2020.

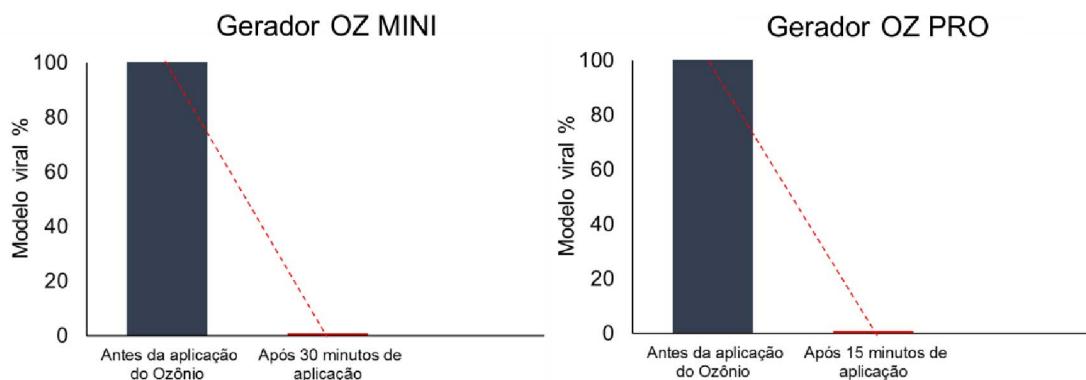


Figura 2 - Percentual de inativação viral em comparação com o controle viral não tratado com ozônio.

Os resultados obtidos demonstram que a produção do gás ozônio pelos equipamentos OZmini e OZpro em ambiente fechado e aplicado em diferentes tempos, **inativaram em 99,99%** o Coronavírus/MHS gênero Betacoronavirus (mesmo gênero e família das espécies COVID-19 e SARS-CoV-1), conforme os gráficos da Figura 2.

Esses resultados evidenciam o potencial virucida (capacidade de inativar vírus) dos geradores de ozônio da WIER.

REFERÊNCIAS

AKEY, DAVID H.; WALTON, THOMAS E. **Liquid-phase study of ozone inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus**. Applied and environmental microbiology, v. 50, n. 4, p. 882-886, 1985.

DENNIS, Robert et al. **Ozone Gas: Scientific Justification and Practical Guidelines for Improvised Disinfection using Consumer-Grade Ozone Generators and Plastic Storage Boxes**. The Journal of Science and Medicine, v. 2, n. 1, 2020.

ESLAMI, Hadi; JALILI, Mahrokh. **The role of environmental factors to transmission of SARS-CoV-2 (COVID-19)**. AMB Express, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

HIRAI, Kazuyuki et al. **Investigation of the Effective Concentration of Ozonated Water for Disinfection in the Presence of Protein Contaminants**. Biocontrol science, v. 24, n. 3, p. 155-160, 2019.

KAI-WANG, K., et al. **COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing**. Clinical Infectious Diseases, 1-25 (2020).

KAMPF, Günter, et al. **Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents**. Journal of Hospital Infection, 104.3: 246-251, 2020.

MURRAY, Byron K. et al. **Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species**. Journal of virological methods, v. 153, n. 1, p. 74-77, 2008.

LA ROSA, Giuseppina et al. **Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission**. Annali dell'Istituto superiore di sanità, v. 49, p. 124-132, 2013.

PRATHER, Kimberly A.; WANG, Chia C.; SCHOOLEY, Robert T. **Reducing transmission of SARS-CoV-2**. Science, 2020.

RAWLINSON, Stacey; CIRIC, L.; CLOUTMAN-GREEN, E. **COVID-19 pandemic—let's not forget surfaces**. Journal of Hospital Infection, v. 105, n. 4, p. 790-791, 2020.

TIZAQUI, Chedly. **Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2)**. Ozone: Science & Engineering, v. 42, n. 5, p. 378-385, 2020.

VAN DOREMALEN, Neeltje et al. **Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1**. New England Journal of Medicine, v. 382, n. 16, p. 1564-1567, 2020.

YOUNG, Suzanne et al. **Relationship Between Inactivation and Genome Damage of Human Enteroviruses Upon Treatment by UV 254, Free Chlorine, and Ozone**. Food and Environmental Virology, v. 12, n. 1, p. 20-27, 2020.

ZANARDI, I. et al. **Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity**. Current Medicinal Chemistry, v. 23, n. 4, p. 304-314, 2016.

Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 04 de julho 2020

Ao Sr.
Dr. Bruno Mena Cadorin
CEO WIER
www.wier.com.br

LAUDO VIRUCIDA GERADOR de OZÔNIO

Prezado Sr Bruno,

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

1) Produtos:

- Teste 1: aplicação de gás ozônio produzido com o gerador OZmini ligado durante 30 minutos e desligado por mais 10 minutos.
- Teste 2: aplicação de gás ozônio produzido com o gerador OZpro ligado durante 15 minutos e desligado por mais 10 minutos.

Condições do Teste:

Condições do ambiente: temperatura: 23,33 °C

Umidade relativa do ar: 59,63 %

Gerador de Gás ozônio em Ambiente Fechado de 150 cm³

2) Dados Cadastrais:

WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZONIO LTDA

Endereço:

Parque Tecnológico Alfa

Rod. José Carlos Daux, Km 01, no 600

Edifício Celta, 2o andar, sala 107

João Paulo, Florianópolis – SC

Cep 88030-000

Fone: 48 3236-5791

3) Vírus testados: CORONAVÍRUS/MHV gênero Betacoronavirus (mesmo gênero e família das espécies COVID-19, MERS e SARS-CoV-1).

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).



Cidade Universitária “ZEFERINO VAZ”, 04 de julho 2020

- b) Os testes foram realizados em quadruplicata (quatro repetições biológicas):
- 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 substância teste (gás ozônio) deve ser ativa somente contra o vírus e não às células.
 - Ensaio positivo: presença do vírus, gás ozônio e sistema celular;
 - Negativo: controle de células (apenas sistema celular, sem a presença de vírus e sem a presença de gás ozônio);
 - Controle da diluição/titulação dos vírus e cultivo celular.
 - A produção de gás ozônio foi produzido pelos equipamentos OZmini e OZpro. O ensaio foi aplicado dentro de um Ambiente Fechado de 150 cm³, na qual foram distribuídas Placas de Petri estéril (Ø 90mm x 15mm) com os vírus e submetidas a diferentes tempos.
 - O equipamento OZmini ficou ligado durante 30 minutos e desligado por mais 10 minutos. O gerador OZpro ficou ligado durante 15 minutos e desligado por mais 10 minutos
- c) Após transcorrido os tempos, placas expostas ao gás ozônio foram recolhidas, inoculadas com as células e incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 hs a 05 dias.
- d) O título dos vírus foi expresso como log₁₀TCID₅₀/ml a partir do método Reed-Muench (1938).

5) Resultados:

Tabela 1: Produção gás ozônio Equipamentos OZmini e OZpro em Ambiente Fechado de (150 cm³) e aplicado em diferentes tempos sobre Coronavírus cepa MHV-3

Gerador Ozônio/Tempo	Resultados* Coronavírus MHV-3
OZmini ligado durante 30 minutos e desligado por mais 10 minutos	Virucida*
OZpro ligado durante 15 minutos e desligado por mais 10 minutos	Virucida

* Virucida: ocorreu inativação de 99,99% dos vírus

***Tabela 2 -** 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% VIRUCIDA
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 "ZEFERINO VAZ", 04 de julho 2020

6) Conclusões:

Gás Ozônio Aparelhos OZmini e OZpro:

- OZmini ligado durante 30 minutos e desligado por mais 10 minutos inibiu 99,99% o vírus testado;
- OZpro ligado durante 15 minutos e desligado por mais 10 minutos inibiu 99.99% o vírus testado;
- Portanto, recomendamos o uso do gás ozônio produzido pelos equipamentos OZmini e OZpro em Ambiente Fechado como potencial agente virucida para o grupo Coronavírus.

Atenciosamente,



Profª Drª Clarice Weis Arns
Responsável pelo Laudo
Dpto. Genética, Evolução e Bioagentes
Instituto de Biologia - UNICAMP
13083-970 - Campinas - SP

Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 04 de julho 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 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

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)

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.





LAUDO TÉCNICO

Teste de atividade antiviral dos geradores de ozônio WIER contra SARS-CoV-2

AVISO LEGAL

É vedada a utilização desde material para finalidades comerciais, publicitárias ou qualquer outra que contrarie a realidade para o qual foi concebido. É proibida sua distribuição, exibição, publicação ou divulgação, total ou parcial, dos textos, figuras, gráficos e demais conteúdos descritos sem prévia e expressa autorização da WIER, sendo permitida somente a impressão e divulgação por clientes WIER, sem que sejam separadas as partes.

A 7x7 grid of plus signs, representing a 7x7 matrix of ones.

Rua do Albatroz, 430, Pedra Branca, Palhoça, SC, 88137-290
(48) 9 9817-0733 / (48) 3236-5791 | www.wier.com.br

LAUDO TÉCNICO VIRUCIDA

A WIER, empresa que oferece soluções inovadoras com tecnologia de Plasma Frio e Ozônio (O_3), comprova mediante estudo apresentado a seguir, a eficiência de seus equipamentos Geradores de Ozônio no combate ao novo coronavírus através da descontaminação de ambientes.

Por meio de testes encomendados pela WIER e realizados em laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3) pela Quasar Bio, empresa de base biotecnológica de pesquisa para desenvolvimento, descoberta e validação de novas soluções para controle de doenças, encabeçada pelo pesquisador Dr. Lucio Freitas Junior, constatou-se que o ozônio produzido pelos equipamentos OZmini e OZpro é altamente eficaz para **combater o vírus Sars-CoV-2 (causador da doença respiratória COVID-19)** na descontaminação de superfícies e do ar ambiente.

Os resultados foram obtidos através de uma avaliação quantitativa referente à capacidade de inativação das partículas do vírus SARS-CoV-2 pelos equipamentos da WIER. **Neste caso, o tempo de exposição utilizado nos testes para o gerador modelo OZmini foi de 25 minutos e para o modelo OZpro foi de 15 minutos.**

Os testes foram realizados em laboratório NB-3, seguindo todos os padrões de segurança, as recomendações da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e metodologias de órgãos internacionais.



1. Referencial Teórico

Os vírus são as entidades biológicas mais comuns na Terra, e existem trilhões e trilhões de vírus no mundo todo. São pequenos agentes infecciosos que dependem de células vivas de outros organismos para a sua replicação. Eles são compostos por genoma RNA ou DNA e circundados por uma capa de proteína codificada, chamada de capsídeo. Dos patógenos que infectaram a população humana nas últimas décadas, a maioria tem sido vírus de RNA, incluindo Ebola, SARS, MERS, Zika, vários vírus influenza e atualmente SARS-CoV-2 (KAMPF, et al. 2020).

Os vírus receberam mais atenção atualmente, com a disseminação do COVID-19 (síndrome respiratória aguda), doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, que se espalhou rapidamente pelo mundo. A doença já contaminou mais de 30 milhões de pessoas, levando mais de 970 mil delas a óbito.

Sabe-se que uma das principais formas de transmissão dos vírus em geral é através de superfícies contaminadas. Sendo assim, garantir um ambiente seguro, ou seja, limpo e desinfectado é essencial (KAMPE, et al. 2020).

De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras autoridades de saúde é de grande importância fazer a higienização regular e desinfecção das superfícies e do ar ambiente para prevenir a contaminação com vírus e muitos outros organismos patogênicos.

Uma forma de garantir limpeza e desinfecção do ambiente e também prevenir a disseminação dos vírus em geral, é através do uso do ozônio. O ozônio é um excelente agente oxidante e devido à sua capacidade de inativar quase todos os tipos de microrganismos, podendo ser um grande aliado no combate ao COVID-19 e de vírus em geral (YOUNG et al. 2020).



O ozônio (O_3) é capaz de desinfetar superfícies e o ar ambiente de locais fechados; a própria OMS confirmou que o ozônio é um dos desinfetantes mais eficientes para qualquer tipo de microrganismo. O ozônio funciona essencialmente destruindo as moléculas com as quais entra em contato, incluindo as constituintes dos vírus, bactérias e fungos (MURRAY et al. 2008, YOUNG et al. 2020).

O ozônio pode atacar os vírus em vários pontos de sua estrutura, conforme demonstrado na Figura 1, causando danos à integridade do vírus, ao mesmo tempo em que os torna incapazes de se reproduzirem por meio da oxidação do capsídeo viral e do material genético. Embora qualquer estrutura do vírus possa ser potencialmente atacada pelo ozônio, a estrutura que possui a maioria das ligações duplas ou grupos com alta densidade eletrônica será mais vulnerável à oxidação do ozônio (TIZAOUI, 2020).

Estrutura do Coronavírus

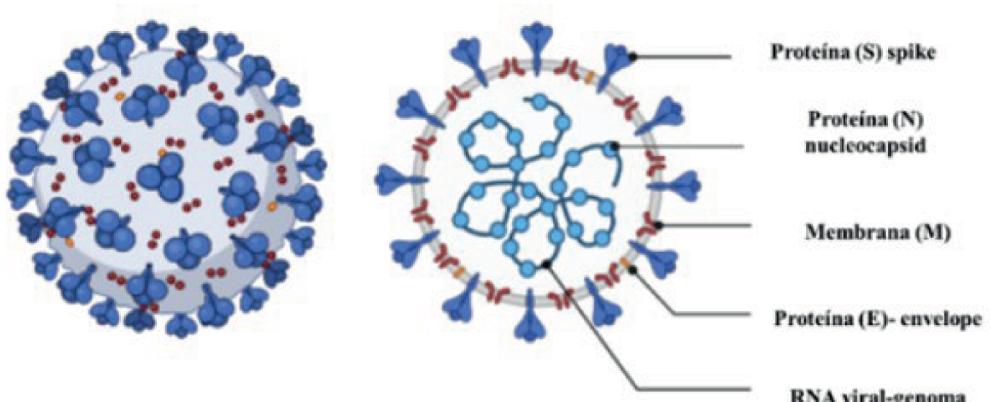


Figura 1: Estrutura do Coronavírus. Fonte: Reprinted from "Human Coronavirus Structure".

O ataque do genoma pelo ozônio também foi recentemente confirmado por Young et al. (2020), em testes utilizando dois enterovírus humanos, Coxsackievirus B5 e Echovirus 11. O ozônio e suas espécies reativas de oxigênio (ROS) são capazes de atacar o vírus em diferentes locais de sua estrutura, destruindo-o e tornando-o inativo para infectar. (MURRAY, 2008, HIRAI et al. 2019, YOUNG et al. 2020).



2. Utilização dos Geradores de Ozônio WIER

O gerador de ozônio WIER é um equipamento que transforma o oxigênio do ar em ozônio através da ação do Plasma Frio, trabalhando automaticamente após o ajuste de tempo de seu funcionamento. Sua operação é bem simples, mas demanda alguns cuidados para que o manuseio seja seguro.

Considerando um ambiente como o quarto de uma casa, por exemplo, deve-se primeiramente fechar o local (portas, janelas e outras frestas), e sinalizá-lo para impedir a entrada e permanência de pessoas e animais durante a sanitização com ozônio, pois ele é tóxico se for inalado.

Gavetas e portas de armários devem ser abertas para que o ozônio, que é um gás natural formado a partir do oxigênio do ar (O_2), possa circular em todas as superfícies, combatendo micro-organismos e odores impregnados. Testes realizados pela WIER indicam que o tempo de atuação de seus geradores varia de acordo com a altura e metragem do ambiente para alcançar um resultado preciso. Para mais informações, deve-se consultar o manual dos equipamentos.

3. Resultados dos testes

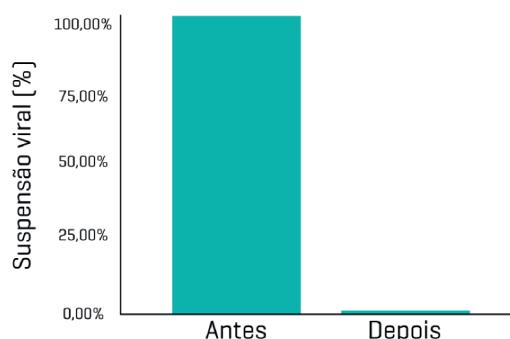
Os geradores de ozônio da WIER são equipamentos utilizados para descontaminar superfícies e o ar de ambientes. Sua ação contra as cepas do vírus SARS-CoV-2, em ambientes fechados, **foi de 99,34% para o modelo OZmini e de 99,96% para o modelo OZpro, conforme testes** realizados em laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3) pela Quasar Bio. O relatório técnico e científico que testa a atividade viral contra o vírus SARS-CoV-2 encontra-se em anexo a este documento.



O poder virucida dos geradores de ozônio WIER **contra as cepas do SARS-CoV-2** foi de **99,34%** para o modelo **OZmini** e **99,96%** para o modelo **OZpro**, comprovando sua altíssima eficácia no combate ao coronavírus.

GERADOR DE OZÔNIO OZpro

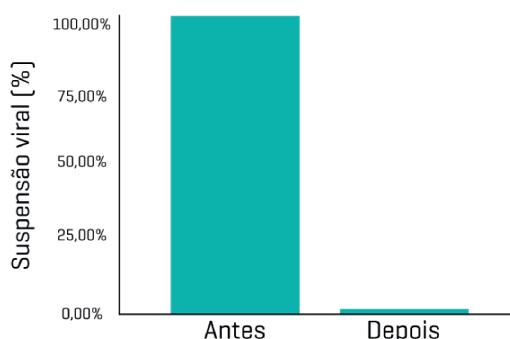
Vírus testado: SARS-CoV-2



INATIVAÇÃO: 99,96%

GERADOR DE OZÔNIO OZmini

Vírus testado: SARS-CoV-2



INATIVAÇÃO: 99,34%

4. Conclusão

Visto que houve significativa redução da capacidade de infecção viral após a exposição das Cepas de SARS-CoV-2, o novo coronavírus, aos geradores de Ozônio da WIER modelos OZmini e OZpro, conforme apresentado, com **inativação em percentual de 99,34 % para o modelo OZmini e 99,96 % para o modelo OZpro**, conclui-se que ambos os equipamentos demonstram ter a capacidade de inativar as partículas virais de SARS-CoV-2.

Dessa forma, comprova-se que os geradores de ozônio da WIER podem ser utilizados na desinfecção de superfícies e ar ambiente, no intuito de promover locais mais seguros através do combate ao vírus causador da COVID-19.



Referências Bibliográficas

- AKEY, DAVID H.; WALTON, THOMAS E. Liquid-phase study of ozone inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Applied and environmental microbiology*, v. 50, n. 4, p. 882-886, 1985.

DENNIS, Robert et al. Ozone Gas: Scientific Justification and Practical Guidelines for Improvised Disinfection using Consumer-Grade Ozone Generators and Plastic Storage Boxes. *The Journal of Science and Medicine*, v. 2, n. 1, 2020.

ESLAMI, Hadi; JALILI, Mahrokh. The role of environmental factors to transmission of SARS-CoV-2 (COVID-19). *AMB Express*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

HIRAI, Kazuyuki et al. Investigation of the Effective Concentration of Ozonated Water for Disinfection in the Presence of Protein Contaminants. *Biocontrol science*, v. 24, n. 3, p. 155-160, 2019.

KAI-WANG, K., et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 1-25 (2020).

KAMPF, Günter, et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, 104.3: 246-251, 2020.

MURRAY, Byron K. et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of virological methods*, v. 153, n. 1, p. 74-77, 2008.

LA ROSA, Giuseppina et al. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, v. 49, p. 124-132, 2013.

PRATHER, Kimberly A.; WANG, Chia C.; SCHOOLEY, Robert T. Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science*, 2020.

RAWLINSON, Stacey; CIRIC, L.; CLOUTMAN-GREEN, E. COVID-19 pandemic—let's not forget surfaces. *Journal of Hospital Infection*, v. 105, n. 4, p. 790-791, 2020.

TIZAOUTI, Chedly. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*, v. 42, n. 5, p. 378-385, 2020.

VAN DOREMALEN, Neeltje et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 16, p. 1564-1567, 2020.





YOUNG, Suzanne et al. Relationship Between Inactivation and Genome Damage of Human Enteroviruses Upon Treatment by UV 254, Free Chlorine, and Ozone. *Food and Environmental Virology*, v. 12, n. 1, p. 20-27, 2020.

ZANARDI, I. et al. Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 304-314, 2016.

Fonte da Figura: by BioRender, August 2020, retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5e99f5395fd61e0028682c01/t-5f21e90283765600b08fbe9d-human-coronavirus-structure>

A 4x7 grid of plus signs, representing a 4x7 matrix of ones.

RELATÓRIO TÉCNICO & CIENTÍFICO

TESTE DE ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA SARS-CoV-2

QUASAR BIO APOIO À SAÚDE LTDA

CNPJ: 37.702.406/0001-26

www.quasarbio.com



TECHNICAL & SCIENTIFIC REPORT

São Paulo, October 02, 2020

Research developer / Responsável pelo Estudo:

Quasar Bio Apoio à Saúde Ltda

CNPJ: 37.702.406/0001-26

Endereço: Av. Escola Politécnica, s/n, Setor Cietec, Rio pequeno

CEP: 05350-000. São Paulo – SP

Receives / Recebe:

WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZONIO LTDA

CNPJ: 13.729.366/0001-48

Endereço: Parque Tecnológico Alfa, Rod. José Carlos Daux, Km 01, nº 600

CEP: 88030-902. Florianopolis – SC

ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST SARS-CoV-2 *in vitro*

1. Study Facility / Unidade do Estudo:

Department of Microbiology / Departamento de Microbiologia

Institute of Biomedical Sciences / Instituto de Ciências Biomédicas

University of São Paulo / Universidade de São Paulo

São Paulo/SP – Brazil / Brasil

2. Test Sample Description / Descrição de Amostra Teste:

Fabricant / Fabricante: WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZONIO LTDA

Instruments / Instrumentos:

- 1) Gerador de ozônio WIER modelo OZmini.
- 2) Gerador de ozônio WIER modelo OZpro.

Description / Descrição:

- 1) Gerador de ozônio WIER modelo OZmini: for the purpose of decontamination and deodorizing of vehicles such as cars.
 - 2) Gerador de ozônio WIER modelo OZpro: for the purpose of decontamination and deodorizing of bigger local environment such as hotel bedrooms, office rooms, bus, homes and alike.
- 1) Gerador de ozônio WIER modelo OZmini: destinado à descontaminação e desodoração de veículos.

Quasar Bio Apoio à Saúde Ltda

CNPJ: 37.702.406/0001-26.

Av. Escola Politécnica, s/n, Setor Cietec, Rio pequeno,

CEP: 05350-000, São Paulo – SP. quasarbio@gmail.com

www.quasarbio.com



TECHNICAL & SCIENTIFIC REPORT

- 2) Gerador de ozônio WIER modelo OZpro: destinado à descontaminação e desodorização de ambientes maiores como quartos de hotel, salas de escritório, interior de ônibus, residências e afins.

3. Tested virus / Vírus testado

SARS-CoV-2 (HIAE-02: SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA, GenBank Accession No. MT126808.1)¹

SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS-CoV-2) - strain of coronavirus that causes coronavirus disease 2019 (COVID-19), the respiratory illness responsible for the COVID-19 pandemic.

CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE 2 (SARS-CoV-2) - cepa de coronavírus que causa doença coronavírus 2019 (COVID-19), a doença respiratória responsável pela pandemia de COVID-19.

4. Abstract / Resumo

An adaptation of the ISO 18184² ("Textiles — Determination of antiviral activity of textile products") Standard Method and published study³ were used as references for a quantitative method to evaluate the instrument's ability to inactivate the SARS-CoV-2 virus particles in contaminated surfaces (textile samples), in the exposure time of 25 minutes and 15 minutes, to the instruments "Gerador de ozônio WIER modelo OZmini" and "Gerador de ozônio WIER modelo OZpro", respectively, followed by a sample resting time of 10 minutes inside the instruments turned off.

Uma adaptação da norma padrão ISO 18184² ("Textiles — Determination of antiviral activity of textile products") e um artigo científico publicado³ foram utilizadas como referências

¹ Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, Malta FM, de Araujo GG, Monteiro CO, et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network [Submitted]. Mem Inst Oswaldo Cruz E-pub: 08 Jul 2020. doi: 10.1590/0074-02760200342.

² ISO 18184 ("Textiles — Determination of antiviral activity of textile products") <https://www.iso.org/standard/71292.html>

³ Tremiliosi, G. C., Simoes, L. G. P., Minozzi, D. T., Santos, R. I., Vilela, D. C. B., Durigon, E. L., Machado, R. R. G., Medina, D. S., Ribeiro, L. K., Rosa, I. L. V., Assis, M., Andrés, J., Longo, E., & Freitas-Junior, L. H. (2020). Ag nanoparticles-based antimicrobial polycotton fabrics to prevent the transmission and spread of SARS-CoV-2. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2020.06.26.152520>

para o método quantitativo de avaliação da capacidade do instrumento de inativar as partículas do vírus SARS-CoV-2 em amostra de superfície (tecido poroso) contaminado, em um intervalo de exposição de 25 minutos e 15 minutos, para os instrumentos "Gerador de ozônio WIER modelo OZmini" e "Gerador de ozônio WIER modelo OZpro", respectivamente, seguido de um tempo de 10 minutos de descanso da amostra dentro do instrumento desligado.

5. Methodology / Metodologia

The tests are carried out in the laboratory NB-3 (Biosafety Level 3), following the recommendations of ANVISA and the methods described in the normative:

Os ensaios são realizados em laboratório NB-3 (Biosafety Level 3) seguindo as recomendações da ANVISA e metodologias descritas na norma:

- 1) Adaptation of ISO 18184 "Textiles — Determination of antiviral activity of textile products". Samples of 100% cotton textile embedded in a suspension containing SARS-CoV-2 particles according to the Normative, for the direct exposure to the inner instrument environment "Gerador de ozônio WIER modelo OZmini" and "Gerador de ozônio WIER modelo OZpro" turned on, aiming at quantification of virucidal activity of the instrument against SARS-CoV-2.
- 2) Adaptação da ISO 18184 "Textiles — Determination of antiviral activity of textile products". Foram preparadas amostras de tecido 100% algodão embebidas em suspensão de partículas virais de SARS-CoV-2 de acordo com a Norma, para exposição direta a atmosfera interna dos instrumentos "Gerador de ozônio WIER modelo OZmini" e "Gerador de ozônio WIER modelo OZpro" ligados, com intuito de quantificar a atividade virucida dos intrumentos contra SARS-CoV-2.

The tests are performed in biological duplicate, being:

- a) Positive Control - viral suspension with the presence of 100% cotton textile non-exposed to the instrument;
- b) Test Sample - viral system with the presence of 100% cotton textile exposed to the instrument;
- c) Negative Control - used to discard artifacts from the RT-PCR reaction.

Os ensaios são realizados em duplicata biológica, sendo:

- a) Controle Positivo – suspensão viral com a presença de tecido de 100% algodão não exposto ao instrumento;
- b) Amostra Teste – sistema viral com a presença de tecido 100% algodão exposto ao instrumento;

TECHNICAL & SCIENTIFIC REPORT

c) Controle Negativo - utilizado para descartar artefatos da reação de RT-PCR.

6. Results / Resultados

Table 1 shows the number of viral genome copies of the control non-exposed textile sample embedded with viral solution, and test textile sample embedded with viral solution and exposed to the instrument in the contact time of 25 minutes for "Gerador de ozônio WIER modelo OZmini", and 15 minutes for "Gerador de ozônio WIER modelo OZpro". With the result of the number of copies of each sample, the viral inactivation effect of each instrument on the infected textiles samples is calculated, using the non-exposed sample as control.

Table 1. Copies per mL of SARS-CoV-2 at different days of experiment to both instruments

Sample Identification	Experiment 1		Experiment 2		Incubation time	
	Humidity 56.22 %RH Temperature 19.74 °C		Humidity 64.75 %RH Temperature 23.68 °C			
	Copies/mL (SARS-CoV-2)	Viral Inactivation (%)	Copies/mL (SARS-CoV-2)	Viral Inactivation (%)		
Gerador de ozônio WIER modelo OZmini						
Positive Control - viral suspension with the presence of 100% cotton textile non-exposed to the instrument	2.83 E+07	-	2.38 E+07	-	25 min of exposure + 10 min of rest	
Test Sample - viral suspension with the presence of 100% cotton textile exposed to the instrument	2.16 E+04	99.92	1.57 E+05	99.34		
Negative Control - used to discard artifacts from the RT-PCR reaction	Not Detected		Not Detected			
Gerador de ozônio WIER modelo OZpro						

Quasar Bio Apoio à Saúde Ltda
CNPJ: 37.702.406/0001-26.

Av. Escola Politécnica, s/n, Setor Cietec, Rio pequeno,
CEP: 05350-000, São Paulo – SP. guasarbio@gmail.com
www.quasarbio.com

Positive Control - viral suspension with the presence of 100% cotton textile non-exposed to the instrument	5.77 E+07		4.91 E+07		15 min of exposure + 10 min of rest
Test Sample - viral suspension with the presence of 100% cotton textile exposed to the instrument	1.73 E+04	99.97	1.97 E+04	99.96	
Negative Control - used to discard artifacts from the RT-PCR reaction	Not detected		Not Detected		

A Tabela 1 mostra o número de cópias do meio de controle com amostra de tecido embebida em suspensão viral mas não exposta ao instrumento, e amostra de tecido embebida em suspensão viral e exposta ao instrumento, no intervalo de tempo de 25 minutos para o Gerador de ozônio WIER modelo OZmini, e 15 minutos para o Gerador de ozônio WIER modelo OZpro. Com o resultado do número de cópias de cada amostra, é calculado o efeito de inativação viral de cada instrumento sobre as amostras de tecido infectado, usando a amostra não exposta ao instrumento como controle.

Tabela 1. Cópias por mL de SARS-CoV-2 em diferentes dias de experimento para os dois instrumentos

Identificação da Amostra	Experimento 1		Experimento 2		Tempo de incubação	
	Humidade 56.22 %RH Temperatura 19.74 °C		Humidade 64.75 %RH Temperatura 23.68 °C			
	Cópias/mL (SARS-CoV-2)	Inativação Viral (%)	Cópias/mL (SARS-CoV-2)	Inativação Viral (%)		
Gerador de ozônio WIER modelo OZmini						
Controle Positivo - suspensão viral com a presença de tecido de 100% algodão não	2.83 E+07	-	2.38 E+07	-	25 min de exposição + 10 min de	

exposto ao instrumento					descanso
Amostra Teste – suspensão viral com a presença de tecido de 100% algodão exposto ao instrumento	2.16 E+04	99.92	1.57 E+05	99.34	
Controle Negativo – utilizado para descartar artefatos da reação de RT-PCR	Não Detectado		Não Detectado		
<i>Gerador de ozônio WIER modelo OZpro</i>					
Controle Positivo – suspensão viral com a presença de tecido de 100% algodão não exposto ao instrumento	5.77 E+07	-	4.91 E+07	-	
Amostra Teste – suspensão viral com a presença de tecido 100% algodão exposto ao instrumento	1.73 E+04	99.97	1.97 E+04	99.96	15 min de exposição + 10 min de descanso
Controle Negativo – utilizado para descartar artefatos da reação de RT-PCR	Não Detectado		Não Detectado		

7. Conclusion / Conclusão

Ozone generator instrument/ Instrumento gerador de ozônio:

Fabricant / Fabricante: WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZONIO LTDA
 Instruments / Instrumentos:

- 1) Gerador de ozônio WIER modelo OZmini.
- 2) Gerador de ozônio WIER modelo OZpro

Quasar Bio Apoio à Saúde Ltda
 CNPJ: 37.702.406/0001-26.
 Av. Escola Politécnica, s/n, Setor Cietec, Rio pequeno,
 CEP: 05350-000, São Paulo – SP. quasarbio@gmail.com
www.quasarbio.com



TECHNICAL & SCIENTIFIC REPORT

Considering that there was a reduction in the capacity of viral infection after the exposure to the tested instruments, it is possible to conclude that the product **Gerador de ozônio WIER modelo OZmini** and **Gerador de ozônio WIER modelo OZpro** as described above, were effective for the reduction of viral particles by inactivation in percentage of 99.34% and 99.96%, respectively, considering the inactivation of the viral particles on the surface and, therefore, the instruments demonstrate the capacity of inactivate most of SARS-CoV-2 viral particles by the contact time of 25 minutes and 15 minutes of exposure, respectively.

*Considerando que houve redução da capacidade de infecção viral após a exposição aos instrumentos testados, pode-se concluir que os instrumentos **Gerador de ozônio WIER modelo OZmini** e **Gerador de ozônio WIER modelo OZpro**, como descritos acima, foram eficazes para a redução de partículas virais por inativação em percentual de 99.34% e 99.96%, respectivamente, considerando a inativação de partículas virais na superfície testada e, portanto, os instrumentos demonstram ter capacidade de inativar a maior parte das partículas virais SARS-CoV-2 pelo tempo de contato a partir de 25 minutos e 15 minutos de exposição, respectivamente.*

Prepared and Reviewed by / Preparado e Revisado por:

Dr. Lúcio Freitas Júnior:

Local and Date / Local e Data: SAO PAULO 02/10/2020

Reviewed by / Revisado por:

Prof. Dr. Édison L. Durigon:

Local and Date / Local e Data: SAO PAULO 02/10/2020

Quasar Bio Apoio à Saúde Ltda

CNPJ: 37.702.406/0001-26.

Av. Escola Politécnica, s/n, Setor Cietec, Rio Pequeno,
CEP: 05350-000, São Paulo – SP. quasarbio@gmail.com
www.quasarbio.com



WIER
GERADORES DE OZÔNIO

› LAUDO TÉCNICO

Ensaio Virucida & Quantitativo
Equipamento utilizado: Gerador de Ozônio OZpro - WIER

O gerador de ozônio OZPro destina-se à descontaminação e desodorização de ambientes fechados. Por conta disso, todos os testes foram realizados nestas mesmas condições.

Para comprovar o potencial do gerador de ozônio **OZpro e da Tecnologia WIER na eliminação de vírus**, foram utilizados dois diferentes modelos de vírus infecciosos:

VÍRUS NÃO ENVELOPADOS

Adenovírus
Humano -2

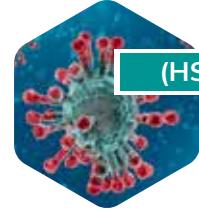


(HAdV-2)

Neste tipo de vírus, o capsídeo viral (estrutura que protege o genoma do vírus) que normalmente tem composição protéica, não se encontra envolvido pelo envelope. Tende a ter maior resistência à ação do ozônio e outros oxidantes. Exemplos de vírus não envelopados: Poliovírus (Poliomielite), Adenovírus (conjuntivite).

VÍRUS ENVELOPADOS

Herpes Simplex
Vírus tipo -1

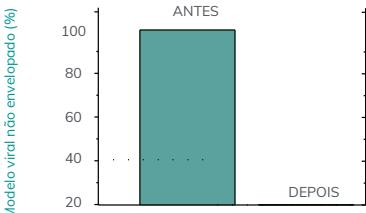
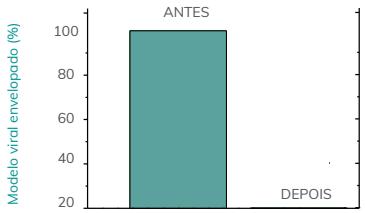


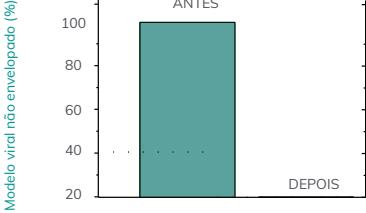
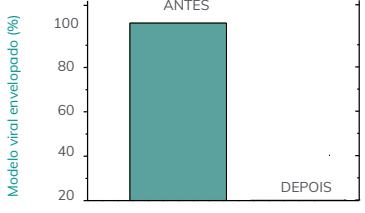
(HSV-1)

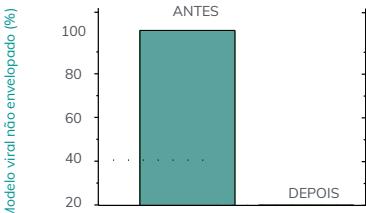
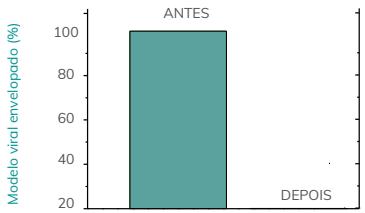
Trata-se de um tipo de vírus que possui uma camada de proteção externa (normalmente de composição lipídica), chamada de envelope, além do capsídeo viral que protege o genoma do vírus (DNA ou RNA). Exemplos de vírus envelopados: SARS-CoV (SARS), Mers-CoV (MERS) e SARS-CoV-2 (COVID-19).

Os testes evidenciam o potencial virucida (capacidade de inativar vírus) contra ambos os modelos virais, com **resultados que chegam a 99,99% de eficácia na inativação**.

O potencial de ação virucida se estende também para outros tipos virais tanto **envelopados** quanto **não envelopados**, podendo variar de acordo com a identidade do vírus.

GERADOR DE OZÔNIO OZpro (5cm)	
VÍRUS NÃO ENVELOPADO	VÍRUS ENVELOPADO
Adenovírus Humano-2 Respiratório (HAdV-2)	Herpes Simplex Vírus tipo-1 Cepa KOS (HSV-1)
	
INATIVAÇÃO: 99,9%	INATIVAÇÃO: 99,99%

GERADOR DE OZÔNIO OZpro (30cm)	
VÍRUS NÃO ENVELOPADO	VÍRUS ENVELOPADO
Adenovírus Humano-2 Respiratório (HAdV-2)	Herpes Simplex Vírus tipo-1 Cepa KOS (HSV-1)
	
INATIVAÇÃO: 99%	INATIVAÇÃO: 99,99%

GERADOR DE OZÔNIO OZpro (60cm)	
VÍRUS NÃO ENVELOPADO	VÍRUS ENVELOPADO
Adenovírus Humano-2 Respiratório (HAdV-2)	Herpes Simplex Vírus tipo-1 Cepa KOS (HSV-1)
	
INATIVAÇÃO: 99%	INATIVAÇÃO: 99,99%

É vedada a utilização desde material para finalidades comerciais, publicitárias ou qualquer outra que contrarie a realidade para o qual foi concebido. É proibida sua distribuição, exibição, publicação ou divulgação, total ou parcial, dos textos, figuras, gráficos e demais conteúdos descritos sem prévia e expressa autorização da WIER, sendo permitida somente a impressão e divulgação por clientes WIER, sem que sejam separadas as partes.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Laboratório de Virologia Aplicada
Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas
Ação de Extensão Sigpex: 201917940

Florianópolis, 01 de Abril de 2020.

À WIER Tecnologia Plasma e Ozônio LTDA

Contato: Bruno Mena Cadorin, PhD

Cidade: Florianópolis-SC, Brasil

Ensaio: Virucida - Quantitativo

Modelos virais: Adenovírus humano tipo 2 (respiratório) e Herpes Vírus Humano tipo 1

Pesquisadora responsável: Dra. Gislaine Fongaro

Responsável Técnico: Dr. Mário Steindel

Especificação do produto testado

Trata-se de Tecnologia de Plasma Frio - Ozônio em equipamento OZpro (Produção de ozônio: 20 g/h Potência: 100W).

Especificação das condições do teste:

Os testes virucidas foram realizados à 5 cm, 30 cm e 60 cm do equipamento gerador de ozônio, em câmara fechada, à 23±2°C, no tempo fixo de 60 minutos de exposição, contra modelos virais não envelopados (Adenovírus Humano respiratório do tipo 2 – HAdV-2) e envelopado (Herpes Simplex Vírus tipo-1 – Cepa KOS - (HSV-1).

Os resultados encontram-se descritos abaixo:

60 min de exposição)

Identificação	Redução (%)	
	Adenovírus humano-2	Herpesvírus Humano-1
OZpro 5 cm	99,9%	99,99%
OZpro 30 cm	99%	99,99%
OZpro 60 cm	99%	99,9%

NR: Não houve redução

Todos os ensaios foram repetidos independentemente em triplicatas

Metodologia:

- Ensaio Virucida

Vírus infecciosos (Adenovírus Humano-2 Respiratório (HAdV-2) e Herpes Simplex Virus tipo-1 – Cepa KOS (HSV-1) previamente titulados por Ensaio de Placa de Lise (Protocolo Laboratório de Virologia Aplicada) foram diluídos seriadamente na base 10 (6 Log₁₀ até 1 Log₁₀ Unidades Formadoras de Placa/mL) tratados durante 30 minutos com as respectivas concentrações das substâncias em teste. O controle viral não foi tratado.

Após o tratamento, as suspensões virais foram inoculadas em células permissivas - A549 para HAdV-2 e em células Vero para HSV-1 – por até 72 h, verificando-se o efeito citopático da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral. Os resultados são expressos em percentual de inativação viral em comparação com o controle viral não tratado (1, 2, 3).

Onde:

- 1 Log de inativação = 90%
- 2 Logs de inativação= 99%
- 3 Logs de inativação=99,9% ...

As confirmações das concentrações virais inibidas com os respectivos agentes testados foram realizadas por meio de ensaio de placa lise para HSV-1⁽⁴⁾ e HAdV-2⁽⁵⁾.

1. Ekblad, M.; Bergström, T.; Banwell, M.G.; Bonnet, M.; Renner, J.; Ferro, V.; Trybala, E. Anti-Herpes Simplex Virus Activities of two novel Disulphated Cyclitols. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, V. 17, N. 2, P. 97-106, 2006.
2. Page, M. A., J. L. Shisler, And B. J. Mariñas. Kinetics of Adenovirus Type 2 Inactivation with Free Chlorine. *Water Res.* 43:2916-2926, 2009.
3. J. M. Vaughn,T* Y. S. Chen, K. Lindburg, And D. Morales. Inactivation of Human and Simian Rotaviruses by Ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2218-2221 Vol. 53, No. 9, 1987.
4. Simões CMO, Amoros M, Girre L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytoth Res* 21: 317-325, 1999.
5. Cromeans, T.L., Lu, X., Erdman, D.D., Humphrey, C.D., Hill, V.R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. *Journal of Virological Methods*, v.151, p.140-145, 2008.

Laboratório de Virologia Aplicada – LVA

Contatos: gislaine.fongaro@ufsc.br

+55 (49) 99825- 6993 ou (48) 3721-2957



Dra. Gislaine Fongaro

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Centro de Ciências Biológicas (CCB)
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP)
Laboratório de Virologia Aplicada



Prof Dr. Mario Steindel

Dept de Microbiologia, Imunologia
e Parasitologia - CCB - UFSC

CRBio03 004687
ART 2018/17989

++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++
++



LAUDO TÉCNICO

HOTEL E MOTEL

GERADOR DE OZÔNIO
OZpro

AVISO LEGAL

É vedada a utilização deste material para finalidades comerciais, publicitárias ou qualquer outra que contrarie a realidade para o qual foi concebido. É proibida sua distribuição, exibição, publicação ou divulgação, total ou parcial, dos textos, figuras, gráficos e demais conteúdos sem prévia e expressa autorização da WIER, que é detentora da propriedade intelectual nos termos da Lei n. 9.279/1996 e da Constituição Federal.

LAUDO TÉCNICO OZpro

AMOSTRAGEM: MOTEL

Analises Microbiológicas - Método RODAC® (Superfícies) e *M Air T*® *Millipore Air Test (Ar Ambiente)*

Para comprovar o potencial e a eficiência dos geradores de ozônio WIER foram feitos testes para avaliação microbiológica de superfícies e do ar ambiente. O objetivo principal do monitoramento microbiano é obter estimativas representativas da carga biológica do meio em questão, antes e após a aplicação do Ozônio.

1. METODOLOGIA:

Todas as amostragens e análises contidas neste laudo foram realizadas pelo laboratório de microbiologia ControlBio, localizado na cidade de São Paulo/SP e encomendadas pela WIER Tecnologia Plasma e Ozônio, localizada na cidade de Florianópolis/SC. A WIER, por intermédio de sua equipe técnica, acompanhou todas as coletas das amostragens.

1.1 Metodologia para análise de superfícies (RODAC®):

O método utilizado foi o da Replicação de Organismos Diretamente em Ágar após Contato (RODAC®). O mesmo consiste em placas de detecção e contagem de organismos replicados, segundo a *United States Pharmacopeia* (USP) e *Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments* (USP).

Esse método fundamenta-se em uma avaliação quantitativa das superfícies, onde placas contendo meio de cultura previamente preparadas foram encostadas diretamente sobre as superfícies analisadas, exercendo uma suave pressão com os dedos sobre o centro da placa para garantir o contato com toda a superfície. Essa amostragem é feita antes e após a aplicação do ozônio, de acordo com os tempos estipulados para cada equipamento.

Por fim, o material foi armazenado pelo laboratório de microbiologia Controlbio, onde as placas foram incubadas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), conforme ISO 14698: 2004.

1.2 Metodologia para ar ambiente - Equipamento M Air T® (Millipore Air Test):

O método de sedimentação consiste em expor placas de Petri contendo os meios de cultura de escolha no ambiente a ser estudado, de forma que as partículas dispersas no ar sofram sedimentação forçada através da sucção pelo aparelho coletor M Air T®. O tempo de exposição das placas é padronizado para que o volume coletado de amostragem do ar seja de 250 litros, segundo exigência da metodologia aplicada *U.S. Pharmacopeia/National Formulary (USP 40/NF 35, 2017)*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

Segundo um estudo realizado por pesquisadores da Universidade de Houston/Texas (EUA) em quartos de hotel trouxe um resultado interessante a respeito da contaminação. Uma variedade de superfícies foi amostrada e foram testados os níveis de bactérias aeróbias totais e a contaminação bacteriana por coliformes (fecal) em cada uma das superfícies do ambiente.

Embora fossem esperadas amostras mais contaminadas em locais como o vaso sanitário e a pia do banheiro, eles também encontraram altos níveis de contaminação bacteriana em locais inusitados como no controle remoto da TV e no interruptor da lâmpada de cabeceira. O grau de contaminação microbiana do ar e das superfícies reflete um risco potencial de doença que aumenta proporcionalmente com a densidade dos microrganismos e a presença de espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas (ZEMKE *et al.*, 2015; KLINE *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2020).

As bactérias podem aderir a uma grande variedade de superfícies, incluindo vidros, metais e muitos polímeros diferentes, bem como a outras bactérias e células eucarióticas, através da formação de biofilmes que podem

ser prejudiciais tanto para a saúde humana quanto para a indústria. Elas têm um papel em muitas doenças como infecções do trato urinário, sistema respiratório, pele, oftalmológicas, entre outras infecções sistêmicas, além da incrustação biológica e corrosão de superfícies (TUSON; WEIBEL, 2013; BERNE *et al.*, 2018).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, ressalta-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp.* e *Enterococcus faecium*. Como exemplos de bactérias patogênicas pode-se citar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Desta forma, se não houver uma higienização efetiva em intervalos regulares, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento microbiano e formação de biofilmes (SILVA JR., 2005).

Uma forma de prevenir a proliferação de bactérias e a formação de biofilmes é através da aplicação de ozônio na desinfecção de ambientes e superfícies. O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidrila de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Assim, haverá ruptura das células e extravasamento de íons entre os meios, resultando na morte do microrganismo (KHADRE *et al.*, 2001).

3. RESULTADOS:

Foram realizados testes em uma suíte de motel na cidade de São Paulo (SP), para verificar a eficiência do gerador de ozônio **OZpro** na desinfecção de superfícies pelo método RODAC®.

Primeiramente, foi realizada uma amostragem antes da aplicação do ozônio (ponto zero) e após 30 e 60 minutos de aplicação do gerador de ozônio **OZpro**.

Para a análise do ar ambiente pelo método de sedimentação, foi feita uma amostragem do ar através da sucção pelo aparelho coletor M Air T® antes da aplicação do ozônio (ponto zero) e após 30 e 60 minutos de aplicação.

Conforme dados demonstrados no gráfico da Tabela 1, a aplicação do ozônio reduz em 89% o número de colônias bacterianas presentes nas superfícies, diminuindo de 36 UFC/25cm² para 4 UFC/25cm².

Para os fungos totais, houve uma redução de 84% no número de colônias, de 42 UFC/cm² para 7 UFC/cm², com 60 minutos de uso do gerador.

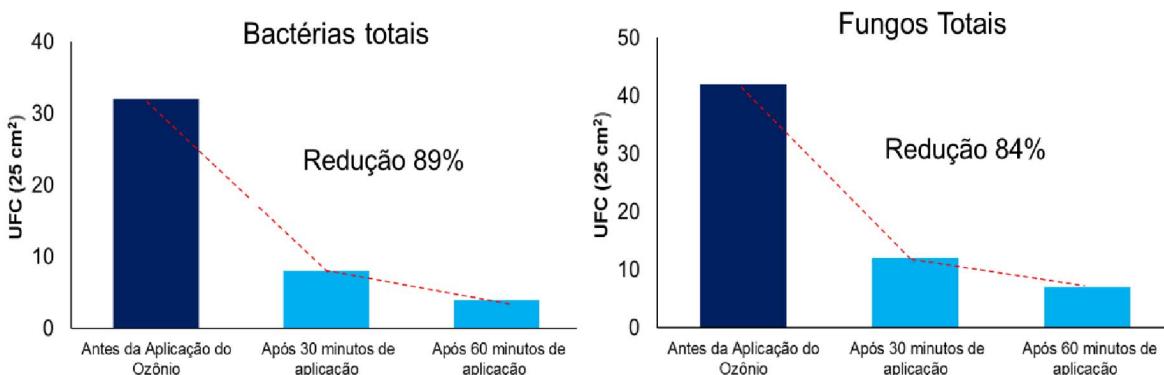


Tabela 1 - Metodologia RODAC® para análise de superfícies com o uso do equipamento OZpro.

Para ar ambiente, observa-se nos resultados dos testes apresentados na Tabela 2, uma redução de 90% das colônias bacterianas. Antes da aplicação, elas eram de 168 UFC/m³. Após, houve uma diminuição para 16 UFC/m³, com 60 minutos de uso do gerador de ozônio. Para fungos totais ocorreu uma redução de 76%, ou seja, de 320 UFC/m³ para 76 UFC/m³ após 60 minutos de uso do gerador de ozônio.

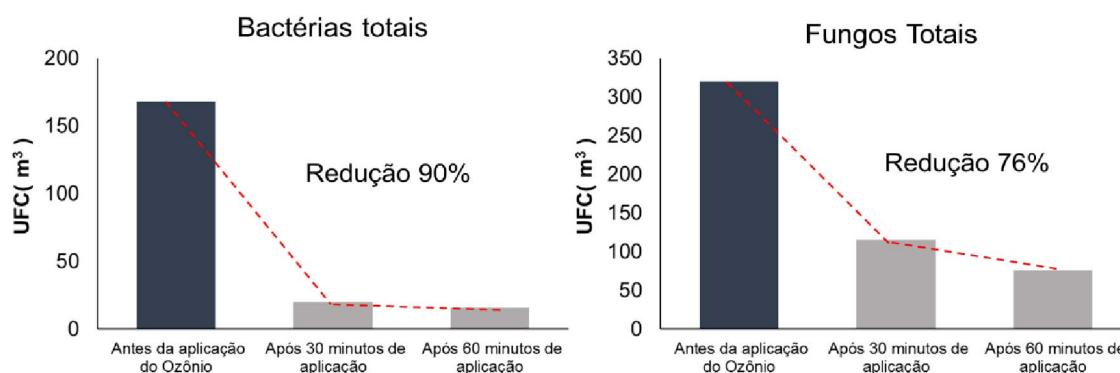


Tabela 2 - Análise de ar ambiente com o uso do equipamento OZpro.

Além de inativar os microrganismos presentes na superfície e no ar, o alto poder oxidante do gás ozônio auxilia no controle da reprodução de colônias e

proliferação de fungos e ácaros. Sua poderosa ação oxidante pode inibir bactérias e fungos, além de desodorizar o ambiente.

A descontaminação por ozônio também tem a vantagem de penetrar efetivamente em cada parte do ambiente, incluindo locais de difícil acesso através de uma limpeza manual (utilizando líquidos convencionais).

Os resultados obtidos com esses testes comprovam a eficiência do uso do gerador de ozônio **OZpro** na redução e inativação de fungos e bactérias nas superfícies e do ar ambiente do quarto de motel. A atividade antimicrobiana do O₃ gerado pelos equipamentos foi efetiva para todas as áreas investigadas, com registros de redução significativa do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após o uso.

REFERÊNCIAS

BERNE, Cecile et al. **Bacterial adhesion at the single-cell level**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 10, p. 616-627, 2018.

BOTTONE, Edward J. **Bacillus cereus, a volatile human pathogen**. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. **Biofilm formation from milk in contact with raw material: virulence factors involved**. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FU, Xi et al. **Continental-Scale Microbiome Study Reveals Different Environmental Characteristics Determining Microbial Richness, Composition, and Quantity in Hotel Rooms**. *Msystems*, v. 5, n. 3, 2020.

ISMAÏL, Rached et al. **Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature**. *International journal of environmental research and public health*, v. 10, n. 11, p. 6169-6183, 2013.

KIM, Jin-Gab; YOUSEF, Ahmed E.; DAVE, Sandhya. **Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review**. *Journal of food protection*, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KLINE, Sheryl Fried et al. **How Clean Are Hotel Rooms? Part II: Examining the Concept of Cleanliness Standards**. 2015.

KOMANAPALLI, I. R.; LAU, B. H. S. **Inactivation of bacteriophage k, Escherichia coli, and Candida albicans by ozone**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 766-769, 1998.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. ***Aspergillus fumigatus* – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?** PLOS Pathogens, v. 9, n. 12, p. 1-4, 2013.

KWON-CHUNG, Kyung J.; SUGUI, Janyce A. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013.

LI, CHIH-SHAN; WANG, Yu-Chun. **Surface germicidal effects of ozone for microorganisms.** Aiha Journal, v. 64, n. 4, p. 533-537, 2003.

LI, C. S., WANG, Y. C. **Inactivation Effects of Airborne Ozone for Bioaerosols.** *J. Environ. Heal.*, submitted.2005.

MATHÉ, Lotte; VAN DIJCK, Patrick. **Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms.** Current genetics, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.

MONROE, D. **Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms.** Plos Biology. Vol 5, Issue 11., e 307. November, 2007.

PELCZAR Jr., J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, vol. I, 2a ed., São Paulo, Makron Books. (1997).

RAMPLING, A.; WISEMAN, S.; DAVIS, L.; HYETT, A.P.; WALBRIDGE, A.N.; **Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J. Infect. Soc., v. 49, p. 109-116. 2001.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.** 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação.** 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

TUSON, Hannah H.; WEIBEL, Douglas B. **Bacteria–surface interactions.** Soft matter, v. 9, n. 17, p. 4368-4380, 2013.

USP, **Microbial Evaluation and Classification of Clean Rooms and Clean Zones - In Process Revision**, Pharm Forum. 18(5), 1992: 4042-4054.

USP, **Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments**, USP 35 vol. 1 2012a, 2012: pp. 697-707.

VARTOUKIAN, Sonia R.; PALMER, Richard M.; WADE, William G. **Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria.** FEMS microbiology letters, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.

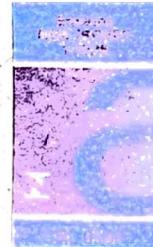
VLAMAKIS, Hera et al. **Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way.** Nature Reviews Microbiology, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013.

WICKRAMANAYAKE, G. B. **Disinfection and sterilization by ozone**. In: BLOCK, S. S. (Ed.). Disinfection and sterilization and preservation. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p. 182-190.

WINN Jr. W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, G. W. **Koneman – Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. texto e atlas coloridos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ZEMKE, Dina Marie V. et al. **Hotel cleanliness: will guests pay for enhanced disinfection?**, International Journal of Contemporary Hospitality Management, 2015.





REBLAS
ANALÍTICO



Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA
Vej o escopo no site da ANVISA
<http://www.anvisa.gov.br/reblas/biotecnologia/controlebio>

**RELATÓRIO DE ENSAIO N°98310/2020A
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIE**

São Paulo, 03 de Junho de 2020.

WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZÔNIO LTDA.	Via José Carlos Daux, km.01 - Rod. SC 401 600 - Ed. Celta
Solicitante: Diego Vitti	CEP 88030-000 - Florianópolis - SC

Material: Superfície(s)	Equipamento Teste: OZ PRO	
Condições de coleta: Amostragem direta em placa Rodac	Data de entrada: 29/05/2020	Hora de entrada: 19:30
Condições de transporte: t. ambiente	Responsável pela amostragem: Controlbio	

N.º da Amostra	Local da amostragem/Tempo de aplicação	Pesquisa de bactérias UFC/25cm ²	Pesquisa de fungos UFC/25cm ²
OS 98310/01	Harmony Motel Suite 30 - Estrutura de Madeira da Cama Antes da Aplicação do Ozônio	36	42
OS 98310/02	Harmony Motel Suite 30 - Porta do Frigobar Após 30 minutos da Aplicação do Ozônio	8	12
OS 98310/03	Harmony Motel Suite 30 - Mesa Oriental Após 60 minutos da Aplicação do Ozônio	4	7
Limite de Quantificação do Método		1UFC/25cm ²	1 UFC/25cm ²

UFC: Unidade Formadora de Colônia; NR: Não realizado, Não Referido

Metodologia: Segundo <1116> U.S. PHARMACOPEIA- USP 42 NF 37, 2019.

Observação: Este ensaio tem seu valor restrito somente à(s) amostra(s) entregue(s) a CONTROLBIO. O presente documento de resultado(s) de ensaio(s), foi emitido em uma via original, respondendo o Laboratório, apenas pela veracidade desta via.

Diretora Técnica	Gerente de Laboratório
Maria José Silveira CRBio.: 18.008-01	Paula de Maio Trezza CRBio.: 43.933/01-D

Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda.

Rua Com. Elias Assi, 645 - Caxingui - CEP 05516-000 - São Paulo - SP

Laboratório de Ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025

sob número CRL 0545, escopo disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0545.pdf>

Visualize os ensaios habilitados na ANVISA/REBLAS em www.controlbio.com.br

NBR ISO/IEC
17025

WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZÔNIO LTDA

RELATÓRIO DE ENSAIO N°98314/2020A
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO AR

São Paulo, 03 de Junho de 2020.

Endereço: Via José Carlos Daux, km 01 - Rod. SC 401 600 - Ed. Celta - CEP 88030-000 - Florianópolis - SC

Material: Ar ambiente Localidade: Harmony Motel

Data da amostragem: 29/05/2020

Equipamento Teste: OZ PRO

Data de entrada: 29/05/2020

Hora da entrada: 19:30

Responsável pela amostragem: Controlbio

Método de amostragem:

Equipamento utilizado: M Air T - Millipore Air Test

Volume amostrado: 250 Litros

Período de incubação: 3 dias para bactérias e 5 dias para fungos

Temperatura: 30-35°C (bactérias) e 20-25°C (fungos)

Localidade	Tempo de aplicação	AERÓBIOS TOTais			% de redução	Fungos
		Bactérias	UFC/m ³	% de redução		
Suite 30	Antes da Aplicação do Ozônio	168		0,00%	320	0,00%
Suite 30	30' da Aplicação do Ozônio	20		88,10%	116	63,75%
Suite 30	60' da Aplicação do Ozônio	16		90,48%	76	76,25%
Limite de Quantificação do método		1 UFC/m³				

Metodologia: U.S. PHARMACOPEIA/ NATIONAL FORMULARY - USP 40/NF 35, 2017; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica, 2013; Organização Mundial de Saúde "WHO Technical Report Series, No. 961, 2011- annex 6- Good Manufacturing Practices for Sterile Products".

Observação: Este ensaio tem seu valor restrito somente á(s) amostra(s) entregue(s) a CONTROLBIO. O presente documento de resultado(s) de ensaio(s), foi emitido em uma via original, respondendo o Laboratório, apenas pela veracidade desta via.

Diretora Técnica	Maria José Silveira CRBio : 1830391	Gerente de Laboratório	Paula de Maio Trezza CRBio : 43.93301-D
------------------	--	------------------------	--

Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda.
Rua Com. Elias Assi, 645 - Carangui - CEP 05516-000 - São Paulo - SP
Laboratório de ENSAIO acreditado pela Cogni de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número CRL 0545, escopo disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/fabricantes/tabelas/CRU0545.pdf>
Visualize os ensaios habilitados na ANVISA/REBLAS em www.confrbio.com.br

++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++++++
++
++



LAUDO TÉCNICO

VEÍCULOS

GERADOR DE OZÔNIO
OZpro

AVISO LEGAL

É vedada a utilização deste material para finalidades comerciais, publicitárias ou qualquer outra que contrarie a realidade para o qual foi concebido. É proibida sua distribuição, exibição, publicação ou divulgação, total ou parcial, dos textos, figuras, gráficos e demais conteúdos sem prévia e expressa autorização da WIER, que é detentora da propriedade intelectual nos termos da Lei n. 9.279/1996 e da Constituição Federal.

LAUDO TÉCNICO OZpro

AMOSTRAGEM: VEÍCULO

Analises Microbiológicas - Método RODAC® (Superfícies) e M Air T®

Millipore Air Test (ar ambiente)

Para comprovar o potencial e a eficiência dos geradores de ozônio WIER foram feitos testes para avaliação microbiológica de superfícies e do ar ambiente. O objetivo principal do monitoramento microbiano é obter estimativas representativas da carga biológica do meio em questão, antes e após a aplicação do Ozônio.

1. METODOLOGIA:

Todas as amostragens e análises contidas neste laudo foram realizadas pelo laboratório de microbiologia ControlBio, localizado na cidade de São Paulo/SP e encomendadas pela WIER Tecnologia Plasma e Ozônio, localizada na cidade de Florianópolis/SC. A WIER, por intermédio de sua equipe técnica, acompanhou todas as coletas das amostragens.

1.1 Metodologia para análise de superfícies (RODAC®):

O método utilizado foi o da Replicação de Organismos Diretamente em Ágar após Contato (RODAC®). O mesmo consiste em placas de detecção e contagem de organismos replicados, segundo a *United States Pharmacopeia* (USP) e *Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments* (USP).

Esse método fundamenta-se em uma avaliação quantitativa das superfícies, onde placas contendo meio de cultura previamente preparadas foram encostadas diretamente sobre as superfícies analisadas, exercendo uma suave pressão com os dedos sobre o centro da placa para garantir o contato com toda a superfície. Essa amostragem é feita antes e após a aplicação do ozônio, de acordo com os tempos estipulados para cada equipamento.

Por fim, o material foi armazenado pelo laboratório de microbiologia Controlbio, onde as placas foram incubadas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), conforme ISO 14698: 2004.

1.2 Metodologia para ar ambiente - Equipamento M Air T® (Millipore Air Test):

O método de sedimentação consiste em expor placas de Petri contendo os meios de cultura de escolha no ambiente a ser estudado, de forma que as partículas dispersas no ar sofram sedimentação forçada através da sucção pelo aparelho coletor M Air T®. O tempo de exposição das placas é padronizado para que o volume coletado de amostragem do ar seja de 250 litros, segundo exigência da metodologia aplicada *U.S. Pharmacopeia/National Formulary (USP 40/NF 35, 2017)*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

Um estudo realizado pelo Prof. Dr. Ron Cutler, da Universidade de Queen Mary, em Londres, chegou a uma conclusão peculiar analisando amostras do ambiente interno de carros e de banheiros públicos. Em média, existem 700 bactérias e organismos vivos diferentes nos volantes de veículos para cada 6,45 cm², o que equivale a quase 10 vezes o número de espécimes encontrados em assentos de banheiros públicos. De acordo com esse estudo, o carro pode se transformar em um lugar bastante propício para a transmissão de muitas doenças (GOŁOFIT-SZYMCZAK *et al.*, 2019).

Uma variedade de contaminantes microbiológicos podem ser transmitidos pelo ar dentro dos veículos através de minúsculas gotículas ou partículas de poeira invisíveis a olho nu. Estes são os chamados bioaerossóis, que consistem em microbiota dispersa no ar, sendo compostos por fungos, bactérias, algas, vírus, cistos de protozoários e outros.

A exposição a bioaerossóis, principalmente os fúngicos, tem sido associada a uma série de efeitos prejudiciais à saúde, como por exemplo, o

aparecimento de asma em bebês e adultos. Destaca-se também manifestações respiratórias alérgicas como rinite, sinusite, pneumonia, onicomicose, infecções oculares, do trato respiratório e urinário; irritações em mucosas e pele e até fungemias, provocadas pela exposição de indivíduos sensíveis aos propágulos e metabólicos toxigênicos desses microrganismos (JAAKKOLA *et al.*, 2010; KARVALA *et al.*, 2010; GIBERT, STEPHENS, 2018).

Dessa forma, quando não higienizado de forma correta e regular, o seu carro pode se tornar um potencial incubador para colônias de bactérias e fungos e se transformar em um lugar bastante propício para a transmissão de doenças (GIBERT, STEPHENS, 2018).

Uma forma de prevenir a proliferação de bactérias e a formação de bioaerossóis é através da aplicação de ozônio na desinfecção de ambientes e superfícies. O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidrila de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Assim, haverá ruptura das células e extravasamento de íons entre os meios, resultando na morte do microrganismo (KHADRE *et al.*, 2001).

3. RESULTADOS:

Foram realizados testes em um veículo de passeio (modelo Ford KA, placa FUP2549) para verificar a eficiência do gerador de ozônio **OZpro** na desinfecção das superfícies pelo método RODAC®.

Primeiramente, foi realizada uma amostragem antes da aplicação do ozônio (ponto zero) sobre o painel do lado do motorista, após 10 minutos de aplicação uma segunda amostragem do banco do motorista e após 20 minutos de aplicação a terceira amostragem do assento do passageiro do veículo.

Para a análise do ar ambiente, foi realizada uma amostragem do interior do veículo antes da aplicação do ozônio (ponto zero) e após 10 minutos e 20 minutos de aplicação com o gerador **OZpro**.

Os resultados, apresentados na Tabela 1, mostram uma redução na contagem de microrganismos (UFC) para fungos totais após a aplicação do

gerador de ozônio. Foi observada uma redução de 97% no número de fungos totais presentes nas superfícies analisadas, ou seja, de 36 UFC/25cm² para 1 UFC/25cm² com 20 minutos de uso do equipamento. Para os fungos presentes no ar houve uma redução 82%, de 224 UFC/m³ para 40 UFC/m³ com 20 minutos de uso do gerador **OZpro**, como poder ser visto na Tabela 2.

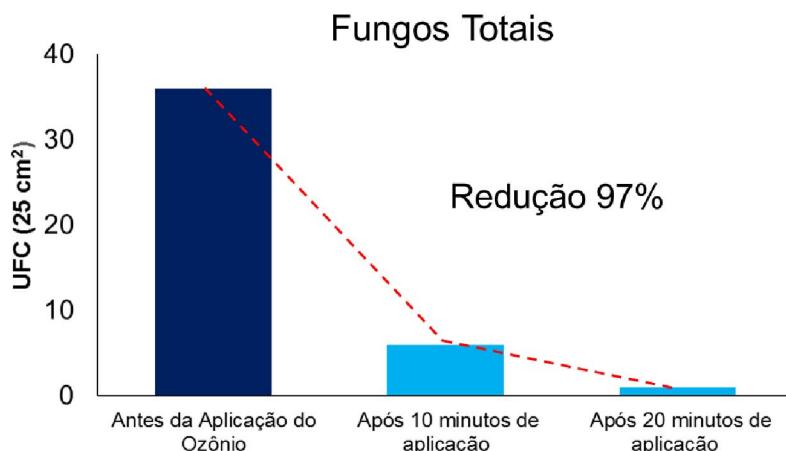


Tabela 1 - Metodologia RODAC® para análise de superfície com uso do equipamento OZpro

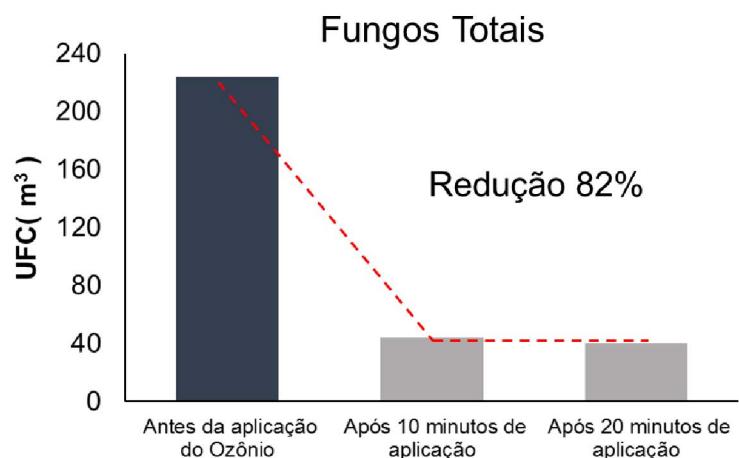


Tabela 2 - Análise do ar ambiente no interior do veículo com uso do equipamento OZpro

Além de inativar os microrganismos presentes na superfície e no ar, o alto poder oxidante do gás ozônio auxilia no controle da reprodução de colônias e proliferação de fungos e ácaros. Sua poderosa ação oxidante pode inibir bactérias e fungos, além de desodorizar o ambiente.

A descontaminação por ozônio também tem a vantagem de penetrar efetivamente em cada parte do veículo, incluindo locais de difícil acesso através de uma limpeza manual (utilizando líquidos convencionais).

Diante dos resultados obtidos com esses testes, comprovamos a eficiência do uso do gerador de ozônio **OZpro** na redução e inativação de fungos e bactérias nas superfícies e ar do interior de veículos. A atividade antimicrobiana do O₃ gerado pelos equipamentos da WIER foi efetiva para todas as áreas investigadas, com registros de redução significativa do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após o uso.

REFERÊNCIAS

- BERNE, Cecile et al. **Bacterial adhesion at the single-cell level**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 10, p. 616-627, 2018.
- BOTTONE, Edward J. **Bacillus cereus, a volatile human pathogen**. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. **Biofilm formation from milk in contact with raw material: virulence factors involved**. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.
- GILBERT, Jack A.; STEPHENS, Brent. **Microbiology of the built environment**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 11, p. 661-670, 2018.
- GOŁOFIT-SZYMczak, Małgorzata; STOBnicka-Kupiec, Agata; GÓRNY, Rafał L. **Impact of air-conditioning system disinfection on microbial contamination of passenger cars**. *Air Quality, Atmosphere & Health*, v. 12, n. 9, p. 1127-1135, 2019.
- GRUMACH, A.S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu. (2001).
- ISMAÏL, Rached et al. **Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature**. *International journal of environmental research and public health*, v. 10, n. 11, p. 6169-6183, 2013.

JAAKKOLA, Jouni JK; HWANG, Bing-Fang; JAAKKOLA, Maritta S. **Home dampness and molds as determinants of allergic rhinitis in childhood: a 6-year, population-based cohort study.** American journal of epidemiology, v. 172, n. 4, p. 451-459, 2010.

KARVALA, Kirsi et al. **New-onset adult asthma in relation to damp and moldy workplaces.** International archives of occupational and environmental health, v. 83, n. 8, p. 855-865, 2010.

KIM, Jin-Gab; YOUSEF, Ahmed E.; DAVE, Sandhya. **Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review.** Journal of food protection, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KOMANAPALLI, I. R.; LAU, B. H. S. **Inactivation of bacteriophage k, Escherichia coli, and Candida albicans by ozone.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 49, n. 6, p. 766-769, 1998.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. **Aspergillus fumigatus – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?** PLOS Pathogens, v. 9, n. 12, p. 1-4, 2013.

KWON-CHUNG, Kyung J; SUGUI, Janyce A. **Aspergillus fumigatus—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?** PLoS Pathog, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013.

LI, CHIH-SHAN; WANG, Yu-Chun. **Surface germicidal effects of ozone for microorganisms.** Aiha Journal, v. 64, n. 4, p. 533-537, 2003.

LI, C. S., WANG, Y. C. **Inactivation Effects of Airborne Ozone for Bioaerosols.** J. Environ. Heal., submitted.2005.

MATHÉ, Lotte; VAN DIJCK, Patrick. **Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms.** Current genetics, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JUNIOR, S.A.S.; BERND, L.A.G.; DI GESU, G. **Fungos Anemófilos e Sensibilização em Indivíduos Atópicos em Porto Alegre.** Rev. Inst. Medicina Tropical. vol 44, n. 5, p. 269-272, 2002.

MONROE, D. **Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms.** Plos Biology. Vol 5, Issue 11, e 307. November, 2007.

PASTUSZKA, J. S. et al. **Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia,** Poland. Atmospheric Environment, v.34, n.3, p.3833-3842, 2000.

PELCZAR Jr., J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, vol. I, 2a ed., São Paulo, Makron Books. (1997).

RAMPLING, A.; WISEMAN, S.; DAVIS, L.; HYETT, A.P.; WALBRIDGE, A.N.; **Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. J. Infect. Soc., v. 49, p. 109-116. 2001.

ROOS, C. et al. **Studies on fungal and bacterial population of air-conditioned environments**. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 47, p. 827-835, set. 2004

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

TUSON, Hannah H.; WEIBEL, Douglas B. **Bacteria–surface interactions**. Soft matter, v. 9, n. 17, p. 4368-4380, 2013.

USP, **Microbial Evaluation and Classification of Clean Rooms and Clean Zones - In Process Revision**, Pharm Forum. 18(5), 1992: 4042-4054. G X P

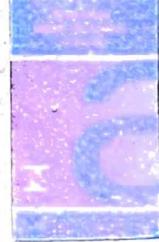
USP, **Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments**, USP 35 vol. 1 2012a, 2012: pp. 697-707.

VARTOUKIAN, Sonia R.; PALMER, Richard M.; WADE, William G. **Strategies for culture of 'unculturable'bacteria**. FEMS microbiology letters, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.

VLAMAKIS, Hera et al. **Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way**. Nature Reviews Microbiology, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013.

WICKRAMANAYAKE, G. B. **Disinfection and sterilization by ozone**. In: BLOCK, S. S. (Ed.). *Disinfection and sterilization and preservation*. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p. 182-190.

WINN Jr. W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, G. W. **Koneman – Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. texto e atlas coloridos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

**REBLAS**Instituto Analítico Habilitado pela ANVISA
<http://inmetro.gov.br/reblas/analisis/005.htm>

Clique no escopo no site da ANVISA:

<http://inmetro.gov.br/reblas/analisis/005.htm>**RELATÓRIO DE ENSAIO N°98309/2020A
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIE**

São Paulo, 03 de Junho de 2020.

WIER TECNOLOGIA PLASMA E OZÔNIO LTDA.	Via José Carlos Daux, km 01 - Rod. SC 401 600 - Ed. Celta
Solicitante: Diego Vitti	CEP 88030-000 - Florianópolis - SC

Material: Superfície(s)	Equipamento Teste: OZ PRO	
Condições de coleta: Amostragem direta em placa Rodac	Data de entrada: 28/05/2020	Hora de entrada: 12:00
Condições de transporte: t. ambiente	Responsável pela amostragem: Controlbio	

N.º da Amostra	Local da amostragem/Tempo de aplicação	Pesquisa de fungos UFC/25cm ²
OS 98309/01	Painel lado do Motorista Veículo Ford KA FUP2549 Antes da Aplicação do Ozônio	36
OS 98309/02	Encosto Banco do Motorista Veículo Ford KA FUP2549 Após 10 minutos da Aplicação do Ozônio	6
OS 98309/03	Assento do Passageiro Veículo Ford KA FUP2549 Após 20 minutos da Aplicação do Ozônio	1
Limite de Quantificação do Método		1 UFC/25cm ²

UFC: Unidade Formadora de Colônia; NR: Não realizado, Não Referido

Metodologia: Segundo <1116> U.S. PHARMACOPEIA- USP 42 NF 37, 2019.**Observação:** Este ensaio tem seu valor restrito somente à(s) amostra(s) entregue(s) a CONTROLBIO. O presente documento de resultado(s) de ensaio(s), foi emitido em uma via original, respondendo o Laboratório, apenas pela veracidade desta via.

Diretora Técnica	Gerente de Laboratório
Maria José Silveira CRBio.: 18993-01	Paula de Maio Trezza CRBio.: 43.933/01-D

Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda.

Rua Com. Elias Assi, 645 - Caxingui - CEP 05516-000 - São Paulo - SP

Laboratório de Ensaio acreditado pela Cgore de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025

sob número CRL 0645, escopo disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0545.pdf>Visualize os ensaios habilitados na ANVISA/REBLAS em www.controlbio.com.br

RELATÓRIO DE ENSAIO N°998355/2020A
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO AR

São Paulo, 03 de Junho de 2020.

Endereço: Via José Carlos Daux, km 01 - Rod. SC 401 600 - Ed. Celta - CEP 88030-000 - Florianópolis - SC

Material: Ar ambiente

Localidade: Veículo

Data da amostragem: 28/05/2020

Equipamento Teste: OZ PRO

Data de entrada: 28/05/2020

Hora da entrada: 16:00

Responsável pela amostragem: Controlbio

Método de amostragem:

Equipamento utilizado:

M Air T - Millipore Air Test

250 Litros

3 dias para bactérias e 5 dias para fungos

30-35°C (bactérias) e 20-25°C (fungos)

Localidade	Tempo de aplicação	Contagem de Fungos	
		UFC/m ³	% de redução
Ford KA - FUJP 2549	Antes da Aplicação do Ozônio	224	0,00%
Ford KA - FUJP 2549	10' da Aplicação do Ozônio	44	80,36%
Ford KA - FUJP 2549	20' da Aplicação do Ozônio	40	82,14%
Limite de Quantificação do método		1 UFC/m ³	

Metodologia: U.S. PHARMACOPEIA/ NATIONAL FORMULARY - USP 40/NF 35, 2017; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica, 2013; Organização Mundial de Saúde "WHO Technical Report Series, No. 961, 2011- annex 6- Good Manufacturing Practices for Sterile Products".

Observação: Este ensaio tem seu valor restrito somente à(s) amostra(s) entregue(s) a CONTROLBIO. O presente documento (e resultados) de ensaio(s), foi emitido em uma via original, respondendo o Laboratório, apenas pela veracidade desta via.

Diretora Técnica

Maria José Silveira
CRBio-18/09/01

Gerente de Laboratório

Paula de Maio Trezza
CRBio-43.933/01-D