



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Heloyza Amaral da Silva

**IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO
DE EFICÁCIA BIOCIDA DE SANEANTES PARA FINS
REGULATÓRIOS PERANTE EXIGÊNCIAS DA ANVISA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Dr. Lucas Gabriel Ribeiro

**Botucatu
2024**

Heloyssa Amaral da Silva

**IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE
AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA BIOCIDA DE SANEANTES
PARA FINS REGULATÓRIOS PERANTE EXIGÊNCIAS
DA ANVISA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a.Dr.^a Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Dr. Lucas Gabriel Ribeiro

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Silva, Heloysa Amaral da.

Implementação de metodologias de avaliação de eficácia biocida de saneantes para fins regulatórios perante exigências da ANVISA / Heloysa Amaral da Silva. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Lucas Gabriel Ribeiro

Capes: 21202010

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
2. Desinfetantes. 3. Eficácia. 4. Produtos de limpeza.

Palavras-chave: ANVISA; Biocida; Comitê Europeu de Normatização; Eficácia; Saneantes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família, especialmente meus pais Vera e Estêvão, meu irmão Gustavo, minha tia Ana Paula e meu avô Gilberto, que sempre confiaram em mim e nunca mediram esforços para que o meu caminho fosse traçado da melhor forma possível. Obrigada pela força, pelo amor incondicional e pelo melhor exemplo de profissional e cidadã que eu poderia ter. Vocês são essenciais para a concretização de todas as minhas conquistas.

Agradeço a Professora Rejane por ser muito além de minha orientadora, pela bondade, ética e empenho em todas as suas ações. Ao meu coorientador Lucas, que com todo o seu conhecimento técnico e científico nunca mede esforços para realizar as tarefas com extrema excelência e dedicação, figura pela qual eu agradeço os demais membros da Crop Labs que tanto admiro e sou grata por participar dessa jornada: Ana Paula, Aruã, Helena, Letícia, Tainara e Victor. É maravilhoso empreender e inovar diariamente com vocês.

Deixo aqui meu agradecimento e admiração aos profissionais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB), especialmente aos membros do Laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Biotecnologia Aplicada), pelo esforço e dedicação diários.

Agradeço a UNESP por todas as oportunidades oferecidas a mim, todo o conhecimento que me foi passado é o fruto mais valioso que poderia colher durante o processo da graduação e pós-graduação. Agradeço também a honra e oportunidade de aprender com todos os excelentes docentes do programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) que sempre foram motivo de estímulo e inspiração. Por último, agradeço a cidade de Botucatu por me encantar com seus Bons Ares durante todos estes anos. À cidade do meu coração que me trouxe novas perspectivas, novos pensamentos, uma nova família e inegável crescimento acadêmico, profissional e pessoal: gratidão.

RESUMO

Saneantes são produtos utilizados com a finalidade de higienização, desinfecção, desinfestação, desodorização, limpeza e conservação de ambientes, objetos e superfícies, desempenhando papel importante na promoção da saúde pública, uma vez que auxiliam na prevenção e propagação de doenças. A característica biocida de um saneante se refere à capacidade desse produto de reduzir ou eliminar bactérias, fungos, vírus e outros microrganismos viáveis, o que lhe confere característica de risco 2 perante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), envolvendo obrigatoriedade de registro para sua comercialização. Além de estudos de estabilidade e toxicidade, a determinação da eficácia biocida de saneantes desempenha um papel fundamental na regulamentação destes produtos, contribuindo com a segurança, saúde pública e preservação do meio ambiente. A implementação de metodologias validadas de verificação de eficácia biocida de saneantes se faz necessária em laboratórios prestadores deste serviço, uma vez que é de suma importância a utilização de metodologias robustas e atualizadas que estejam em conformidade com as diretrizes da ANVISA, e que reproduzam as reais condições de uso do produto testado. Desse modo, este estudo possui como objetivo a implementação de metodologias de avaliação de eficácia biocida de saneantes na empresa Crop Labs, seguindo trilha de requisitos necessários para regulamentação destes produtos de acordo com as diretrizes da ANVISA. Para isso, a padronização de métodos do Comitê Europeu de Normatização (CEN) foi realizada de acordo com a demanda de serviços recebida pela Crop Labs, considerando os campos de aplicação de cada saneante de teste. Este processo esteve vinculado com a interpretação de regulamentações complexas, a padronização do cultivo microbiológico, a adequação e implementação dos procedimentos operacionais padrões desenvolvidos, integrando os testes na demanda operacional, otimizando prazos e entrega de resultados confiáveis, reprodutíveis e de qualidade. Este trabalho representa um produto técnico significativo, atendendo não apenas às exigências regulatórias, mas também à realidade operacional da Crop Labs, uma vez que apresentou importante impacto na prestação de serviços nesta área, consolidando demanda destes serviços advinda do mercado em métodos padronizados e implementados que caminham em paralelo com a prática regulatória.

Palavras-chave: Saneantes; eficácia; biocida; ANVISA; Comitê Europeu de Normatização.

ABSTRACT

Sanitizers are products used for the purpose of sanitizing, disinfecting, pest control, deodorizing, cleaning, and preserving environments, objects, and surfaces, playing an important role in promoting public health as they assist in preventing and spreading diseases. The biocidal characteristic of a sanitizer refers to its ability to reduce or eliminate bacteria, fungi, viruses, and other viable microorganisms, which classifies it as a risk level 2 product according to the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), requiring registration for commercialization. In addition to stability and toxicity studies, determining the biocidal efficacy of sanitizers plays a fundamental role in the regulation of these products, contributing to safety, public health, and environmental preservation. The implementation of validated methodologies for assessing the biocidal efficacy of sanitizers is necessary in laboratories providing this service, as it is crucial to use robust and updated methodologies that comply with ANVISA guidelines and replicate the actual conditions of product use being tested. Thus, this study aims to implement methodologies for evaluating the biocidal efficacy of sanitizers at Crop Labs, following the necessary requirements for regulating these products according to ANVISA guidelines. To achieve this, standardization of methods from the European Committee for Standardization (CEN) was carried out based on the service demand received by Crop Labs, considering the application fields of each test sanitizer. This process involved interpreting complex regulations, standardizing microbiological cultivation, adapting and implementing developed standard operating procedures, integrating tests into operational demand, optimizing deadlines, and delivering reliable, reproducible, and quality results. This work represents a significant technical output, meeting not only regulatory requirements but also the operational reality of Crop Labs, as it had a significant impact on service provision in this area, solidifying demand for these services from the market in standardized and implemented methods that align with regulatory practice.

Keywords: Sanitizers; efficacy; biocide; ANVISA; European Committee for Standardization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana de artigos não críticos. Relação da categoria de um produto saneante e os respectivos microrganismos necessários para realizar os testes aplicáveis(4).	16
Tabela 2. Microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana de artigos críticos e semicríticos. Relação da categoria de um produto saneante e os respectivos microrganismos necessários para realizar os testes aplicáveis(5).....	17
Tabela 3. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 1650:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	22
Tabela 4. Limites básicos exigidos pela norma EN 1650:2019 para validação do teste.	22
Tabela 5. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 13624:2013. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	23
Tabela 6. Limites básicos exigidos pela norma EN 13624:2013 para validação do teste.	23
Tabela 7. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 1276:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	24
Tabela 8. Limites básicos exigidos pela norma EN 1276:2019 para validação do teste.	24
Tabela 9. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 13727:2012+A2:2015. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	25
Tabela 10. Limites básicos exigidos pela norma EN 13727:2012+A2:2015 para validação do teste.	26
Tabela 11. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14348:2005. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	27
Tabela 12. Limites básicos exigidos pela norma EN 14348:2005 para validação do teste.	27
Tabela 13. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14476:2013+A2:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando meio de cultura (DMEM) gelado como agente neutralizante.....	28
Tabela 14. Limites básicos exigidos pela norma EN 14476 para validação do teste.....	28
Tabela 15. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14561:2006. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.	32

Tabela 16. Limites básicos exigidos pela norma EN 14561:2006 para validação do teste.	32
Tabela 17. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 16777:2018. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando meio de cultura (DMEM) gelado como agente neutralizante.	33
Tabela 18. Limites básicos exigidos pela norma EN 16777:2018 para validação do teste.	33
Tabela 19. Resultados da implementação metodológica da EN 1650. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	34
Tabela 20. Resultados da implementação metodológica da EN 13624:2013. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	35
Tabela 21. Resultados da implementação metodológica da EN 1276:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	36
Tabela 22. Resultados da implementação metodológica da EN 13727. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	37
Tabela 23. Resultados da implementação metodológica da EN 14348:2005. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	38
Tabela 24. Resultados da implementação metodológica da EN 14476:2013+A2:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	39
Tabela 25. Resultados da implementação metodológica da EN 14561. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	40
Tabela 26. Campo para posterior preenchimento dos resultados da implementação metodológica da EN 16777:2018. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).	41

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de log de redução de microrganismos em metodologias do CEN de Fase 2, Passo 1.	20
Equação 2. Cálculo de log de redução viral.	21
Equação 3. Cálculo de log de redução de microrganismos em metodologias do CEN de Fase 2, Passo 2.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de ensaio de eficácia biocida de saneante seguindo metodologia EN de Fase 2, Passo 1 – Teste Na. Fonte: elaboração própria.	19
Figura 2. Ilustração de ensaio de eficácia biocida de saneante seguindo metodologia EN de Fase 2, Passo 2 – Teste Na. Fonte: elaboração própria.	29
Figura 3. Gráfico de rosca. Distribuição percentual dos serviços prestados na área de eficácia de saneantes pela Crop Labs, no ano de 2023.	42

SUMÁRIO

1.	<i>Introdução</i>	11
1.1.	<i>Saneantes</i>	11
1.2.	<i>Registro de saneantes de risco 2</i>	12
1.3.	<i>Testes de eficácia biocida</i>	13
1.4.	<i>Considerações para testes de eficácia – Métodos CEN</i>	14
2.	<i>Justificativa</i>	17
3.	<i>Objetivo</i>	18
4.	<i>Materiais e Métodos</i>	18
4.1.	<i>Metodologias Fase 2, Passo 1</i>	19
4.1.1.	<i>Avaliação de eficácia fungicida</i>	21
4.1.1.1.	<i>EN 1650</i>	21
4.1.1.2.	<i>EN 13624</i>	23
4.1.2.	<i>Avaliação de eficácia bactericida</i>	24
4.1.2.1.	<i>EN 1276</i>	24
4.1.2.2.	<i>EN 13727</i>	25
4.1.3.	<i>Avaliação de eficácia micobactericida</i>	26
4.1.3.1.	<i>EN 14348</i>	26
4.1.4.	<i>Avaliação de eficácia virucida</i>	27
4.1.4.1.	<i>EN 14476</i>	27
4.2.	<i>Metodologias Fase 2, Passo 2</i>	28
4.2.1.	<i>Avaliação de eficácia bactericida</i>	31
4.2.1.1.	<i>EN14561</i>	31
4.2.2.	<i>Avaliação de eficácia virucida</i>	32
4.2.2.1.	<i>EN 16777</i>	32
5.	<i>Resultados</i>	33
5.1.	<i>Metodologias Fase 2, Passo 1</i>	33
5.1.1.	<i>EN 1650</i>	34
5.1.2.	<i>EN 13624</i>	35
5.1.3.	<i>EN 1276</i>	36
5.1.4.	<i>EN 13727</i>	36
5.1.5.	<i>EN 14348</i>	37
5.1.6.	<i>EN 14476</i>	38

5.2.	<i>Metodologias Fase 2, Passo 2</i>	39
5.2.1.	<i>EN 14561.....</i>	39
5.2.2.	<i>EN 16777.....</i>	40
6.	<i>Discussões</i>	41
7.	<i>Conflitos de Interesse.....</i>	43
8.	<i>Referências</i>	44

1. Introdução

1.1. Saneantes

Saneantes são produtos utilizados com a finalidade de higienização, desinfecção, desinfestação, desodorização, limpeza e conservação de ambientes, objetos e superfícies (1), desempenhando papel importante na promoção da saúde pública, uma vez que auxiliam na prevenção e propagação de doenças, mantendo a higiene necessária em diversos âmbitos.

Os produtos saneantes podem ser divididos em algumas categorias, incluindo a de finalidade (1):

- Desinfetantes: utilizados para eliminar ou reduzir os microrganismos patogênicos presentes em superfícies, objetos e ambientes.
- Produtos para higiene pessoal: sabonetes líquidos, antissépticos e outros produtos utilizados para a higiene pessoal.
- Detergentes: remoção de sujeira, gordura e outras impurezas de superfícies e objetos.
- Inseticidas e repelentes: controle de pragas, como insetos, roedores e outros animais indesejados.
- Desinfetantes de água para consumo humano: ajudam a purificar a água, tornando-a segura para consumo.
- Produtos para limpeza de piscinas: manutenção da limpeza e segurança para uso da água de piscinas.
- Produtos para limpeza de ambientes hospitalares: produtos específicos para a desinfecção de ambientes hospitalares, contribuindo para a prevenção de infecções.
- Produtos para limpeza de superfícies em contato com alimentos: produtos seguros para a limpeza de superfícies que entram em contato com alimentos, como utensílios de cozinha e superfícies de preparação de alimentos.

Quanto à classificação de risco (1), os produtos saneantes são classificados como de risco 1 quando(2):

- apresentam $DL_{50}^{(*)}$ oral para ratos superior a 2000mg/kg de peso corpóreo para produtos líquidos e superior a 500mg/kg de peso corpóreo para produtos sólidos;

- o valor de pH na forma pura, à temperatura de 25°C, seja maior que 2 ou menor que 11,5;

- não apresentam características de corrosividade, atividade antimicrobiana, ação desinfestante e não sejam à base de microrganismos viáveis;

- não contenham em sua formulação um dos seguintes ácidos inorgânicos: fluorídrico (HF); nítrico (HNO₃); sulfúrico (H₂SO₄); ou seus sais que os liberem nas condições de uso do produto.

Como saneantes de risco 1 se enquadram produtos de limpeza em geral (ceras, detergentes e amaciantes, por exemplo, que demandam somente uma notificação para a sua comercialização, dispensando o processo de registro. Já produtos como água sanitária, alvejantes corrosivos e desinfetantes são exemplos de saneantes classificados como de risco 2, e necessitam de registro e aprovação da ANVISA, pois se enquadram em uma ou mais das seguintes características (2):

- apresentam DL₅₀^(*) oral para ratos superior a 2000mg/kg de peso corpóreo para produtos líquidos e superior a 500mg/kg de peso corpóreo para produtos sólidos;

- o valor de pH na forma pura, à temperatura de 25° C, seja igual ou menor que 2 ou igual ou maior que 11,5;

- apresentam características de corrosividade, atividade antimicrobiana/biocida, ação desinfestante ou sejam à base de microrganismos viáveis; ou

- contenham em sua formulação um dos seguintes ácidos inorgânicos: fluorídrico (HF); nítrico (HNO₃); sulfúrico (H₂SO₄); ou seus sais que os liberem nas condições de uso do produto.

(*): DL₅₀ se trata de uma forma de expressar o grau de toxicidade aguda de um produto(3), indicando a dose responsável por matar 50% dos animais em questão. É expressa em miligramas por quilograma (mg/kg) de peso do corpo do animal testado.

1.2. Registro de saneantes de risco 2

A característica biocida de um saneante (1) se refere à capacidade desse produto de reduzir ou eliminar bactérias, fungos, vírus e outros microrganismos viáveis, para uso em objetos, sobre superfícies inanimadas e ambientes, em domicílios, em indústrias, em hospitais, estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde e em locais ou

estabelecimentos públicos ou privados (4), fazendo com que o ambiente ou objeto tratado obtenha carga microbiana menor do que a inicialmente observada.

Sendo produtos de risco 2, os saneantes com característica antimicrobiana devem ser registrados perante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autoridade reguladora responsável por estabelecer diretrizes e regulamentos para a avaliação e registro desses produtos no Brasil.

A RDC nº 774 de 15 de fevereiro de 2023 (4) dispõe sobre as condições para registro de saneantes com ação antimicrobiana utilizados em artigos não críticos, que se tratam de produtos de uso geral, hospitalar, em indústria alimentícia e afins ou de uso específico, e que entram em contato superficial com a pele intacta do organismo. Já a RDC nº 700 de 13 de maio de 2022 (5), dispõe sobre as condições para registro de saneantes com ação antimicrobiana em artigos críticos (utilizados em procedimentos de alto risco, que penetra em tecidos e órgãos e requer esterilização para seu uso) e artigos semicríticos (materiais que entram em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa, que requerem desinfecção de alto nível ou esterilização para seu uso).

De forma geral, o registro de um saneante com ação biocida perante a ANVISA envolve o envio de diversas documentações específicas, como autorizações de funcionamento do fabricante, dados do detentor do registro e dados específicos do produto, como nome, forma física, apresentação, fórmula completa, especificações químicas, instruções de uso e condições de armazenamento. Além de estudos de estabilidade e toxicidade, a determinação da eficácia biocida de saneantes desempenha um papel fundamental na regulamentação destes produtos, contribuindo com a segurança, saúde pública e preservação do meio ambiente.

Após uma análise documental e técnica, caso todos os requisitos sejam atendidos, a ANVISA emite o registro de saneantes de risco 2.

1.3. Testes de eficácia biocida

Para registro, os produtos com ação biocida devem comprovar sua eficácia para os fins propostos por meio de análises prévias, realizadas com o produto nas diluições e condições de uso indicadas (4). Para tal, metodologias reconhecidas internacionalmente devem ser utilizadas, como AOAC - *Association of Official Analytical Chemists* ou

métodos adotados pelo CEN - Comitê Europeu de Normatização (4). Quando não existirem métodos destas instituições, fica a cargo da Autoridade Sanitária competente analisar caso a caso.

Testes realizados conforme a AOAC “*Use Dilution Method for Testing Disinfectants*” (6) são executados mergulhando carreadores cilíndricos de aço inoxidável em microrganismos, tratando-os com o produto e, em seguida, determinando se há algum microrganismo sobrevivente após colocar os carreadores em um meio de crescimento. Os testes padrões utilizam 60 carreadores e podem testar a eficácia de um desinfetante contra diferentes organismos e em diferentes momentos, conforme necessidade comercial. O resultado obtido é qualitativo (aprovado ou não aprovado), sendo a aprovação perante a ANVISA de fase única.

Seguindo as metodologias do Comitê Europeu de Normatização (CEN), a aprovação perante a ANVISA é realizada em duas fases, sendo de Fase 1, Passo 1: Teste em suspensão com condições representativas de uso; e Fase 2, Passo 2: Teste de aplicação em carreadores, simulando o comportamento de eficácia do produto em uma superfície. Os ensaios de Fase 1 do CEN não são exigidos no processo de registro, uma vez que não englobam a utilização de substância de interferência nas condições experimentais e se tratam de testes iniciais de *screening* de eficácia.

Os métodos podem variar, desde testes preliminares básicos em suspensão, até protocolos mais complexos que simulam condições reais de aplicação do produto (7). Cada metodologia exige uma porcentagem de redução mínima de viabilidade de cada microrganismo para sua aprovação. Além disso, os métodos trazem resultados quantitativos de redução da carga microbiana, sendo de grande interesse comercial.

1.4. Considerações para testes de eficácia – Métodos CEN

Os métodos do CEN trazem condições ideais de testagem (temperatura, condições de sujidade, microrganismos alvo, tempo de exposição etc.) com o objetivo de determinar a eficácia de formulações comerciais ou substâncias ativas nas condições em que são utilizadas, e, a depender do tipo de produto e da sua aplicação, as condições podem ser modificadas e adequadas para cada produto. Detalhes específicos do produto e sua forma de uso devem ser considerados para delinear o correto ensaio de eficácia: Campo

de aplicação do produto; Tempo de exposição, concentração e temperatura; Condições de sujidade e microrganismos alvo.

I) Campo de aplicação do produto

a) **Uso hospitalar/área médica:** produtos para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com atendimento à saúde (desinfetantes hospitalares para superfícies fixas e artigos não críticos). Abrange os produtos para uso em ambientes, pisos, paredes, mobiliários e artigos (objetos, equipamentos e acessórios) utilizados exclusivamente em hospitais e estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde.

b) **Uso em indústria alimentícia e afins:** produtos destinados à utilização em locais dedicados à produção/elaboração, fracionamento ou manipulação de alimentos (sanitizantes e desinfetantes de superfícies e equipamentos que entram em contato com o alimento). Abrange os produtos para uso em objetos, equipamentos e superfícies inanimadas e ambientes onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, utilizados em cozinhas, indústrias alimentícias, laticínios, frigoríficos, restaurantes e demais locais produtores ou manipuladores de alimentos.

c) **Uso geral:** produtos para uso domiciliar e em ambientes públicos. Os produtos abrangidos nesta categoria são os desinfetantes, desodorizantes e sanitizantes, destinados exclusivamente à desinfecção, desodorização e/ou sanitização de pisos, paredes, mobiliários e outras superfícies, ambientes, sanitários e utensílios que não entrem em contato com alimentos.

d) **Uso específico:** produtos destinados a serem utilizados com fim específico, segundo as indicações do rótulo. Os produtos com ação antimicrobiana de uso específico são classificados como: desinfetante para lactários, desinfetante para piscinas, desinfetante para água de consumo humano, sanitizante/desinfetante para tecidos e roupas, sanitizante/desinfetante para roupas hospitalares.

II) Tempo de exposição, concentração do produto e temperatura do teste

A determinação de um período curto ou longo de exposição está intimamente relacionada com o uso prático do produto, bem como a sua concentração e temperatura do ambiente de aplicação.

III) Condições de sujidade e microrganismos alvo

Os ensaios devem considerar condições realistas de sujidade em relação ao uso prático do saneante, utilizando substâncias específicas de cada método (*clean/dirty conditions*) para considerar possíveis interferentes relevantes.

A determinação dos microrganismos alvo mais relevantes para as condições de uso esperadas e que representem desafios realistas para o produto no seu campo de aplicação é de suma importância, podendo ser realizada:

- a) Seguindo as diretrizes padrões do método e/ou;
- b) Seguindo indicações da ANVISA, como consta no Anexo da RDC nº 774, de 15 de fevereiro de 2023 (4) os microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana em artigos não críticos (**Tabela 1**) e/ou;
- c) Seguindo indicações da ANVISA, como consta no Anexo da RDC nº 700, de 13 de maio de 2022 (5) os microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana em artigos críticos e semicríticos (**Tabela 2**) e/ou;
- d) Seguindo *claim* de interesse do Patrocinador do Estudo para rotulagem comercial do produto.

Tabela 1. Microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana de artigos não críticos. Relação da categoria de um produto saneante e os respectivos microrganismos necessários para realizar os testes aplicáveis(4).

Categoria	Microrganismos
Desinfetantes de uso geral	<i>S. choleraesuis</i> e <i>S. aureus</i>
Desinfetante/Sanitizante de uso específico para roupas	
Desinfetante da Indústria alimentícia e afins	
Desodorizantes	
Sanitizantes	<i>E. coli</i> , <i>S. choleraesuis</i> e <i>S. aureus</i>
Sanitizante de Indústria alimentícia e afins	
Uso específico Desinfetante para lactários	<i>S. choleraesuis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>
Desinfetante Hospitalar para superfície fixa e artigo não crítico	
Uso específico Desinfetante/sanitizante para roupas hospitalares	
Uso específico Desinfetante para água de consumo humano	<i>Enterococcus faecium</i> e <i>E. coli</i>
Uso específico para desinfecção de hortifrutícolas	
Desinfetante para piscinas	

Tabela 2. Microrganismos empregados para avaliação da atividade antimicrobiana de artigos críticos e semicríticos. Relação da categoria de um produto saneante e os respectivos microrganismos necessários para realizar os testes aplicáveis(5).

Categoria	Microrganismos
Desinfetantes de nível intermediário	<i>S. aureus</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. bovis</i>
Desinfetante de alto nível	<i>S. aureus</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. massiliense</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. sporogenes</i>
Esterilizante	<i>B. subtilis</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>M. massiliense</i>

Legenda: Um desinfetante de nível intermediário: destrói bactérias vegetativas, micobactérias, maioria dos vírus e fungos em um período comprovado. Um desinfetante de alto nível: um produto que destrói todos os microrganismos em um período comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos. Esterilizante: produto com a capacidade de destruir todas as formas de vida microbiana, em um período comprovado, incluindo os esporos bacterianos. (5)

A implementação de metodologias validadas de verificação de eficácia biocida de saneantes se faz necessária em laboratórios prestadores deste serviço, uma vez que é de suma importância a utilização de metodologias robustas e atualizadas que estejam em conformidade com as diretrizes da ANVISA, e que reproduzam as reais condições de uso do produto testado.

2. Justificativa

A eficácia biocida dos saneantes é um pilar fundamental na validação e aprovação regulatória, assegurando a eliminação ou redução da carga microbiana ou viral. Métodos não validados e não alinhados com as exigências da ANVISA podem resultar em avaliações imprecisas, rejeição perante os órgãos reguladores e até mesmo na comercialização ilegal de produtos de qualidade duvidosa, sem eficácia ou segurança comprovadas.

A correta implementação de metodologias padronizadas e precisas na avaliação da eficácia biocida de saneantes é crucial. Isso não apenas assegura a conformidade com as exigências regulatórias da ANVISA, mas também promove a segurança do consumidor e a proteção ambiental. Essa abordagem está em total consonância com o

compromisso da Instalação de Teste Crop Labs e atende às demandas do mercado, reforçando um posicionamento de referência na indústria.

3. Objetivo

Implementar metodologias de avaliação de eficácia biocida de saneantes em laboratório privado, seguindo trilha de requisitos necessários para regulamentação destes produtos de acordo com as diretrizes da ANVISA, realizando estudos de validação para garantir precisão e confiabilidade das metodologias implementadas.

4. Materiais e Métodos

A implementação das metodologias de avaliação de eficácia biocida de saneantes foi realizada de acordo com a demanda de serviços recebida pela empresa privada (Instalação de Teste) Crop Labs, considerando o campo de aplicação do produto testado na seleção do método do Comitê Europeu de Normatização (CEN) adequado.

De forma geral, todas as metodologias envolvem a exposição de um produto a um inóculo inicial padronizado do microrganismo alvo, nas condições em suspensão (Fase 2, Passo 1) ou em carreadores que simulam a aplicação real em superfícies inertes (Fase 2, Passo 2). O tempo de exposição é realizado em condições específicas de sujidade (*clean/dirty conditions*), de concentração do composto ativo e temperatura, a depender das particularidades de cada saneante. O número de microrganismos viáveis é observado ao final da incubação, o que possibilita uma análise quantitativa da eficácia biocida de cada produto.

A identificação e composição dos produtos testados foram mantidas em sigilo como forma de manutenção da integridade das informações confidenciais do Patrocinador de cada estudo realizado. As metodologias foram realizadas de forma independente umas das outras, conduzidas não necessariamente com os mesmos produtos, seguindo demanda de serviços da empresa.

4.1. Metodologias Fase 2, Passo 1

As metodologias do CEN Fase 2, Passo 1 são testes quantitativos realizados em suspensão, diferindo dos testes Fase 1 pela utilização de substâncias de interferência (*clean/dirty conditions*) para simulação de condições reais de sujidade. A Figura 1 abaixo ilustra um ensaio genérico de eficácia biocida seguindo uma metodologia EN Fase 2, Passo 1.

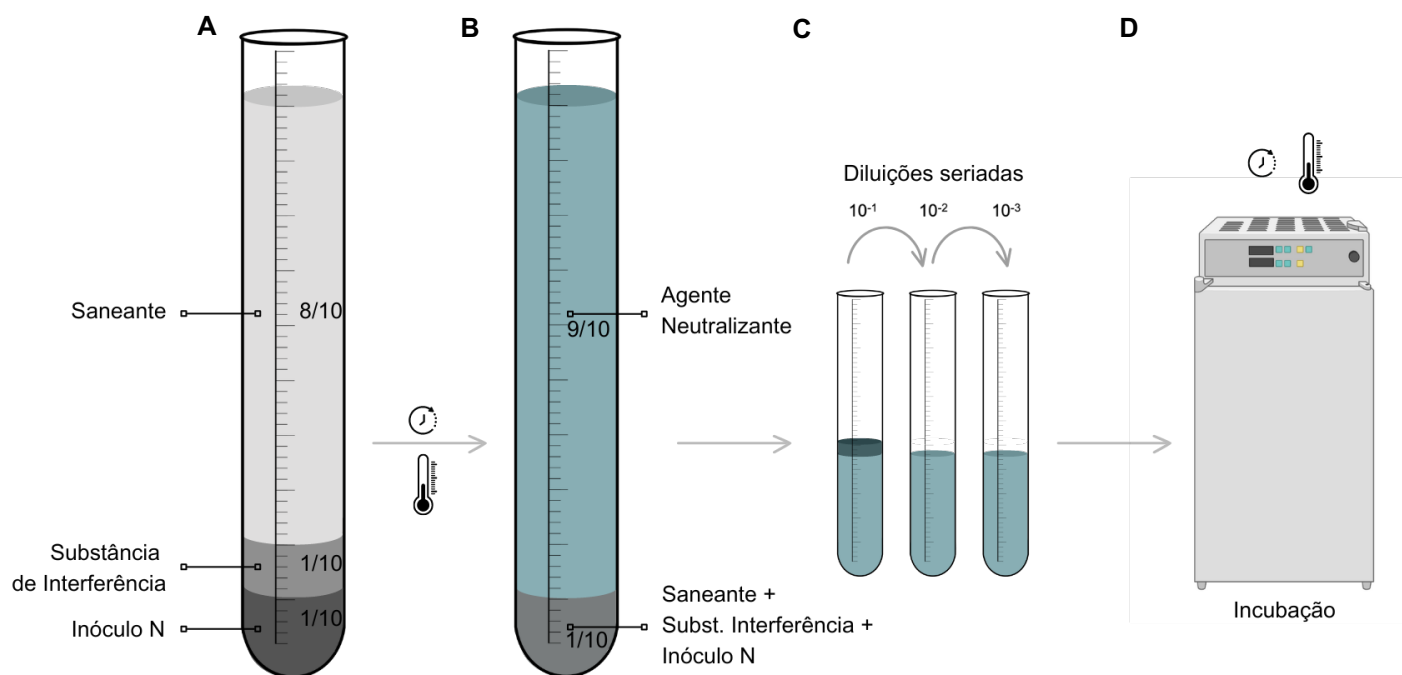


Figura 1. Ilustração de ensaio de eficácia biocida de saneante seguindo metodologia EN de Fase 2, Passo 1 – Teste Na. Fonte: elaboração própria.

Uma parte de suspensão de microrganismos (Inóculo N) é adicionada a uma parte da substância de interferência, e a oito partes do saneante a ser testado (A). Uma parte desta solução, mantida a uma temperatura específica durante um tempo de contato pré-determinado, é transferida para nove partes de um agente neutralizante responsável por cessar o contato dos compostos ativos do saneante com o microrganismo utilizado, interrompendo a ação do produto no tempo de exposição proposto (B). O conteúdo final é homogeneizado e diluído em série (C) para posterior incubação durante o período e temperatura adequados para o desenvolvimento do microrganismo alvo (D). A diluição seriada viabiliza a verificação dos resultados em cenários de baixa e alta concentração

microbiana pós exposição ao produto testado, refletindo alta ou baixa eficácia biocida, respectivamente.

No caso de testes de eficácia bactericida, micobactericida e fungicida, o conteúdo recuperado após a neutralização (B) e diluído em série (C) passa pelo processo de semeadura em placas de ágar adequadas para o cultivo do microrganismo de teste, e os resultados após o período de incubação (D) são determinados pela contagem macroscópica de colônias de microrganismos viáveis recuperados após a exposição ao produto saneante. Considerando a contagem de colônias e os fatores de diluição, é realizado o cálculo do título microbiano de cada grupo analisado em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Fora o *Teste Na* que avalia a eficácia biocida do saneante (Figura 1), em paralelo, grupos de validação experimental são conduzidos para garantir que o ensaio atenda a certos critérios de aceitabilidade: o grupo de validação A valida as condições experimentais escolhidas e verifica ausência de qualquer efeito letal nas condições de teste, uma vez que o mesmo teste é conduzido, utilizando água ou *hard water*. O grupo de validação B verifica a ausência de toxicidade do agente neutralizante utilizado na interrupção da ação biocida do saneante, e o grupo de validação C valida o método de diluição-neutralização utilizado. Cada um dos grupos de validação, bem como o inóculo microbiano utilizado nos testes, possui limites básicos que devem ser alcançados para que o teste de eficácia biocida do saneante se apresente como válido perante as exigências do método EN.

O cálculo de eficácia bactericida, micobactericida e fungicida de um saneante é realizado pela equação a seguir:

Equação 1. Cálculo de log de redução de microrganismos em metodologias do CEN de Fase 2, Passo 1.

$$\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$$

Onde:

- R é a redução microbiana;
- N_0 é o inóculo em UFC/mL no tempo imediato de inoculação do saneante (corresponde a $N/10$);
- N_a é a quantidade de microrganismos viáveis em UFC/mL após período de exposição ao saneante.

No caso de testes de eficácia virucida, o conteúdo recuperado após a neutralização (B) e diluído em série (C), é transferido para placas previamente cultivadas com células aderentes, hospedeiras do agente viral utilizado no teste, o que possibilita a identificação da viabilidade viral após a exposição ao saneante analisado. A determinação quantitativa da atividade virucida do produto é realizada de acordo com a metodologia TCID₅₀ (*Median Tissue Culture Infectious Dose*), com avaliação, por microscopia, dos efeitos citopáticos nas células causados pelos vírus viáveis remanescentes. O título viral é determinado pelo efeito citopático observado em 50% das culturas inoculada, considerando as diluições virais realizadas na célula hospedeira, resultando em um valor de TCID₅₀/mL. O mesmo ensaio é realizado utilizando uma solução não virucida (Tampão Fosfato Salino/PBS) como grupo controle branco para determinação da eficácia virucida do saneante por meio do cálculo de redução. Uma solução de formaldeído sabidamente virucida é utilizada como controle positivo de eficácia.

O cálculo de eficácia virucida de um saneante é realizado pela equação a seguir:

Equação 2. Cálculo de log de redução viral.

$$\lg R = \lg N_B - \lg N_a$$

Onde:

- R é a redução viral;
- N_B é o título viral (TCID₅₀/mL) após a exposição do inóculo ao Controle Branco;
- N_a é o título viral (TCID₅₀/mL) após o tempo de exposição do inóculo ao saneante de teste.

Para todos os testes, são exigidas reduções logarítmicas mínimas para reconhecimento da eficácia biocida do saneante perante os requisitos da norma.

4.1.1. Avaliação de eficácia fungicida

4.1.1.1. EN 1650

A EN 1650 (8) se trata de um método em suspensão, fase 2, passo 1, para testagem de eficácia fungicida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área alimentícia, industrial, doméstica e institucional, excluindo áreas e situações em que a desinfecção é clinicamente indicada.

De acordo com a EN 1650:2019 “*Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1)*” o produto deve demonstrar ao menos 4 logs de redução para reconhecimento da sua eficácia fungicida [tópico 5.9 “*Interpretation of results*”](8).

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 1650, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 3. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 1650:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
1 min	Clean conditions Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Sporothrix brasiliensis</i> (IAL 6913)	Ágar Batata Dextrose, 24-26°C, 72 horas

Tabela 4. Limites básicos exigidos pela norma EN 1650:2019 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL
Inóculo N_0	$1,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL
Inóculo N_v	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo N_{v0}	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação B	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação C	$\geq 0,5 \times N_{v0}$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão fúngica utilizada no Teste Na; N_0 a suspensão fúngica no momento da inoculação no Teste Na ($N_0=N/10$); N_v se trata da suspensão do inóculo utilizada nas validações experimentais A, B e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); N_{v0} a suspensão de validação no momento da inoculação em A, B e C ($N_{v0}=N_v/10$).

4.1.1.2. EN 13624

A EN 13624 (9) se trata de um método em suspensão, fase 2, passo 1, para testagem de eficácia fungicida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica.

De acordo com a EN 13624:2013 “*Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1)*” o produto deve demonstrar ao menos 4 logs de redução em até 60 minutos para reconhecimento da sua eficácia fungicida [tópico 5.9.3 “*Fungicidal activity for surface disinfection products*”](9).

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 13624, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 5. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 13624:2013. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
60 min	<i>Clean conditions</i> Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout (ATCC 10231)	Ágar Sabouraud Dextrose, 28°C , 48 horas

Tabela 6. Limites básicos exigidos pela norma EN 13624:2013 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL
Inóculo N_0	$1,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL
Inóculo N_v	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo N_{v0}	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Inóculo N_{vB}	$3,0 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^5$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação B	$\geq 0,5 \times N_{v0}$ e $\geq 0,0005 \times N_{vB}$
Validação C	$\geq 0,5 \times N_{v0}$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão fúngica utilizada no Teste Na; N_0 a suspensão fúngica no momento da inoculação no Teste Na ($N_0 = N/10$); N_v se trata da suspensão do

inóculo utilizada nas validações experimentais A e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); Nv_0 a suspensão de validação no momento da inoculação em A, e C ($Nv_0 = Nv/10$); NvB se trata da suspensão do inóculo utilizada na validação experimental B (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-2} de N).

4.1.2. Avaliação de eficácia bactericida

4.1.2.1. EN 1276

A EN 1276 (10) se trata de um método em suspensão fase 2, passo 1, para testagem de eficácia bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área alimentícia, industrial, doméstica e institucional, excluindo áreas e situações em que a desinfecção é clinicamente indicada.

De acordo com a EN 1276:2019 “*Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional área – Test method and requirements (phase 2, step 1)*” o produto deve demonstrar ao menos 5 logs de redução para reconhecimento da sua eficácia bactericida [tópico 5.9 “*Interpretation of results*”](10).

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 1276, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 7. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 1276:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
15 min	Clean conditions Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Clostridium difficile</i> Isolado clínico	Ágar Sangue de <i>C. difficile</i> , 37°C , 48-72h, anaerobiose

Tabela 8. Limites básicos exigidos pela norma EN 1276:2019 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/mL
Inóculo N_0	$1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL

Inóculo N_v	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo N_{v0}	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação B	$\geq 0,5 \times N_{v0}$ e $\geq 0,0005 \times N_{vB}$
Validação C	$\geq 0,5 \times N_{v0}$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão bacteriana utilizada no Teste Na; N_0 a suspensão bacteriana no momento da inoculação no Teste Na ($N_0=N/10$); N_v se trata da suspensão do inóculo utilizada nas validações experimentais A, B e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); N_{v0} a suspensão de validação no momento da inoculação em A, B e C ($N_{v0}=N_v/10$).

4.1.2.2. EN 13727

A EN 13727 (11) se trata de um método em suspensão, fase 2, passo 1, para testagem de eficácia bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica.

De acordo com a EN 13727:2012+A2:2016 “*Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1)*” o produto deve demonstrar ao menos 5 logs de redução para reconhecimento da sua eficácia bactericida [tópico 5.9 “Interpretation of results” (11)].

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 13727, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 9. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 13727:2012+A2:2015. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
60 min	<i>Clean conditions</i> Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Clostridium difficile</i> Isolado clínico	Ágar Sangue de <i>C. difficile</i> , 37°C , 48-72h, anaerobiose

Tabela 10. Limites básicos exigidos pela norma EN 13727:2012+A2:2015 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/mL
Inóculo N_0	$1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL
Inóculo N_v	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo N_{v0}	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Inóculo N_{vB}	$3,0 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^5$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação B	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação C	$\geq 0,5 \times N_{v0}$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão bacteriana utilizada no Teste Na; N_0 a suspensão bacteriana no momento da inoculação no Teste Na ($N_0=N/10$); N_v se trata da suspensão do inóculo utilizada nas validações experimentais A e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); N_{v0} a suspensão de validação no momento da inoculação em A, B e C ($N_{v0}=N_v/10$); N_{vB} se trata da suspensão do inóculo utilizada na validação experimental B (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-2} de N).

4.1.3. Avaliação de eficácia micobactericida

4.1.3.1. EN 14348

A EN 14348 (12) se trata de um método em suspensão, fase 2, passo 1, para testagem de eficácia micobactericida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica.

De acordo com o EN 14348:2005 “*Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension teste for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants – Test methods and requirements (phase 2, step 1)*” o produto deve demonstrar ao menos 4 logs de redução em até 60 minutos para reconhecimento da sua eficácia micobactericida [tópico 5.9.2 “*Mycobactericidal activity*”](12).

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 14348, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 11. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14348:2005. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
30 min	Clean conditions Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. massiliense (IAL 2473)	Ágar Middlebrook, 37°C, 24 horas

Tabela 12. Limites básicos exigidos pela norma EN 14348:2005 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^9$ UFC/mL
Inóculo N_0	$1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/mL
Inóculo N_v	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo N_{v0}	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação B	$\geq 0,5 \times N_{v0}$
Validação C	$\geq 0,5 \times N_{v0}$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão utilizada no Teste Na; N_0 a suspensão no momento da inoculação no Teste Na ($N_0 = N/10$); N_v se trata da suspensão do inóculo utilizada nas validações experimentais A, B e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); N_{v0} a suspensão de validação no momento da inoculação em A, B e C ($N_{v0} = N_v/10$).

4.1.4. Avaliação de eficácia virucida

4.1.4.1. EN 14476

A EN 14476 (13) se trata de um método em suspensão de fase 2, passo 1, para testagem de eficácia virucida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica.

Para que o item de teste seja considerado eficaz contra vírus envelopados de acordo com a EN 14476, ele deve ser capaz de causar uma redução de pelo menos 4 logs na carga viral, o que significa que o desinfetante deve ser capaz de inativar 99,99%

do vírus em questão. Uma vez que um desinfetante é aprovado com uma redução de pelo menos 4 logs na carga viral do Vaccinia virus, isso sugere que ele tem a capacidade de inativar eficazmente uma ampla gama de vírus envelopados, incluindo aqueles listados no Anexo A da norma EN 14476 e outros da mesma categoria.

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 14476, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 13. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14476:2013+A2:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando meio de cultura (DMEM) gelado como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
10 min	Clean conditions Albumina Bovina 0,3g/L	Vaccinia virus AATCC VR-1549	Células Vero 81 ATCC CCL-81 DMEM 10% 37°C, 5% CO ₂

Tabela 14. Limites básicos exigidos pela norma EN 14476 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	Suficientemente elevado para verificação de 4 logs de redução
Teste N _B	$(\lg N - \lg N_B) < 1,0$
Controle Negativo	Sem título viral
Controle Positivo (Formaldeído)	$2,0 \leq (\lg N_B - \lg CP) \leq 4,0$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão utilizada no Teste Na; N_B o teste conduzido com Tampão Fosfato Salino (PBS); Controle Negativo são as células hospedeiras sem aplicação do inóculo viral; Controle Positivo (CP) é a solução de formaldeído em concentração 0,7% v/v.

4.2. Metodologias Fase 2, Passo 2

As metodologias do Comitê Europeu de Normatização (CEN) Fase 2, Passo 2 são testes quantitativos em que o inóculo de microrganismo, juntamente com a substância interferente para simulação de condições de sujidade, é aplicado em superfícies inertes que mimetizam a própria superfície ou carreadores de microrganismos reais. A figura

abaixo ilustra um ensaio genérico de eficácia biocida seguindo uma metodologia EN Fase 2, Passo 2.

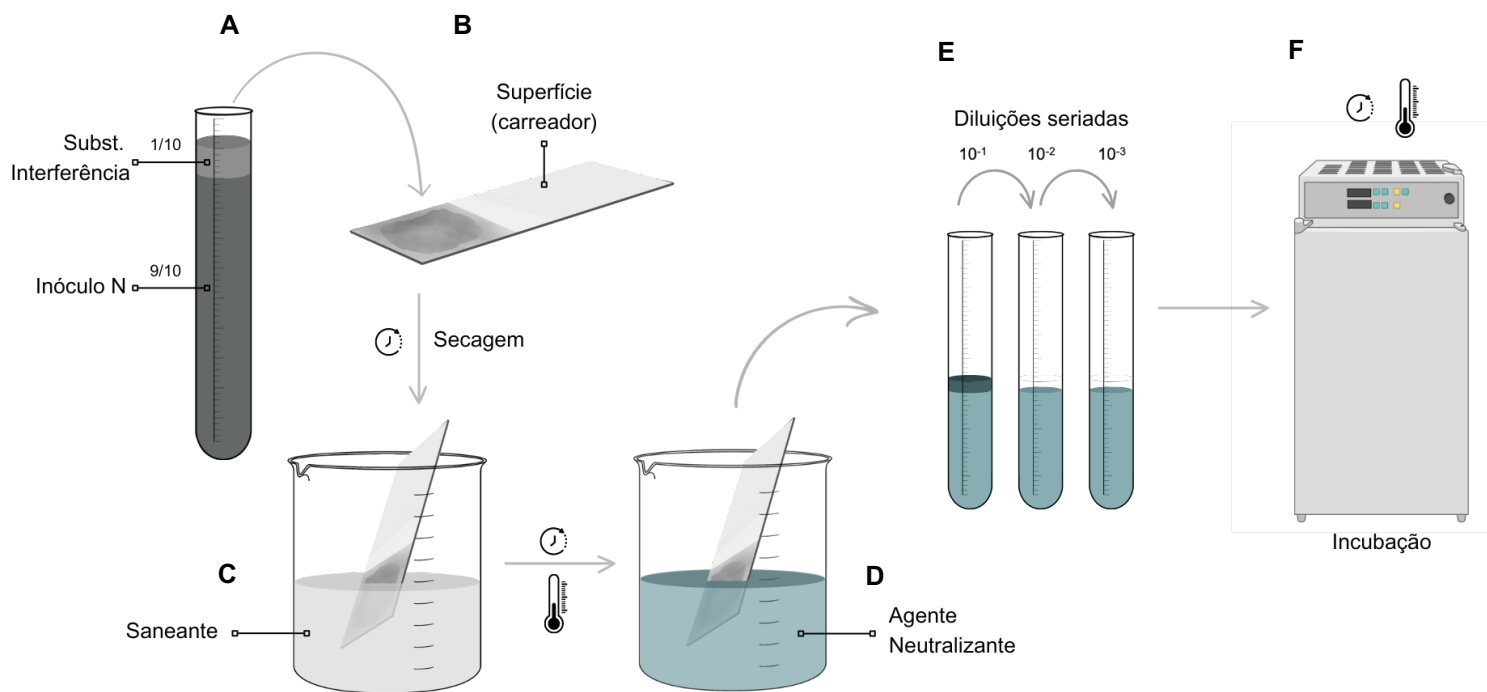


Figura 2. Ilustração de ensaio de eficácia biocida de saneante seguindo metodologia EN de Fase 2, Passo 2 – *Teste Na*. Fonte: elaboração própria.

Nove partes de suspensão de microrganismos (Inóculo N) são adicionadas a uma parte da substância de interferência (A) para deposição de um volume desta solução na superfície de teste, um carreador inerte de vidro, metálico ou de outra composição (B). O carreador intencionalmente contaminado é seco e exposto ao saneante de teste pela temperatura e período de interesse (C). Após a exposição, o carreador é transferido para recipiente contendo o agente neutralizante para lavagem e recuperação de microrganismos viáveis remanescentes após a exposição ao produto de teste (D). O conteúdo final é homogeneizado e diluído em série (E) para posterior incubação durante o período e temperatura adequados para o desenvolvimento do microrganismo alvo (F). A diluição seriada viabiliza a verificação dos resultados em cenários de baixa e alta concentração microbiana pós exposição ao produto testado, refletindo alta ou baixa eficácia biocida, respectivamente.

No caso de testes de eficácia bactericida, o conteúdo recuperado após a neutralização (D) e diluído em série (E), passa pelo processo de semeadura em placas de ágar adequadas para o cultivo da bactéria teste, e os resultados após o período de incubação (F) são determinados pela contagem macroscópica de colônias viáveis recuperadas após a exposição ao produto saneante. Considerando a contagem de colônias e os fatores de diluição, é realizado o cálculo de título bacteriano de cada grupo analisado em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Além do Teste Na que avalia a eficácia biocida do saneante (Figura 2), em paralelo, grupos de validação experimental são conduzidos para garantir que o ensaio atenda a certos critérios de aceitabilidade: o grupo de validação A valida as condições experimentais escolhidas e verifica ausência de qualquer efeito letal nas condições de teste, uma vez que o mesmo teste é conduzido, utilizando água ou *hard water*. O grupo de validação B verifica a ausência de toxicidade do agente neutralizante utilizado na interrupção da ação biocida do saneante, e o grupo de validação C valida o método de diluição-neutralização utilizado. Cada um dos grupos de validação, bem como o inóculo microbiano utilizado nos testes, possui limites básicos que devem ser alcançados para que o teste de eficácia biocida do saneante se apresente como válido perante as exigências do método EN.

O cálculo de eficácia bactericida, de um saneante em superfície é realizado pela equação a seguir:

Equação 3. Cálculo de log de redução de microrganismos em metodologias do CEN de Fase 2, Passo 2.

$$\lg R = \lg N_w - \lg N_a$$

Onde:

- R é a redução microbiana;
- N_w é a quantidade de microrganismos viáveis em UFC/mL após o teste de exposição de um Controle Branco (água/*hard water*) ao carreador intencionalmente contaminado;
- N_a é a quantidade de microrganismos viáveis em UFC/mL no carreador intencionalmente contaminado após período de exposição ao saneante.

No caso de testes de eficácia virucida em carreadores, o conteúdo recuperado após a neutralização (D) e diluído em série (E), é transferido para placas previamente cultivadas com células aderentes, hospedeiras do agente viral utilizado no teste, o que

possibilita a identificação da viabilidade viral após a exposição ao saneante analisado. A determinação quantitativa da atividade virucida do produto é realizada de acordo com a metodologia TCID₅₀ (*Median Tissue Culture Infectious Dose*), com avaliação, por microscopia, dos efeitos citopáticos nas células causados pelos vírus viáveis remanescentes. O título viral é determinado pelo efeito citopático observado em 50% das culturas inoculada, considerando as diluições virais realizadas na célula hospedeira, resultando em um valor de TCID₅₀/mL. O mesmo ensaio é realizado utilizando uma solução não virucida (Controle Branco – N_B) como controle para determinação da eficácia virucida do saneante por meio do cálculo de redução. Uma solução de gluteraldeído sabidamente virucida é utilizada como Controle Positivo (CP) de eficácia. O cálculo para redução virucida nestes testes são realizados pela equação 2, apresentada no tópico de Fase 2, Passo 1.

4.2.1. Avaliação de eficácia bactericida

4.2.1.1. EN14561

A EN 14561 (14) se trata de um método em carreadores de fase 2, passo 2, para testagem de eficácia bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica. Como carreadores inertes, são utilizadas lâminas de vidro (15mm x 60mm x 1mm) com região de superfície fosca para a aplicação do inóculo.

De acordo com o EN14561:2006 “*Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2)*” o produto deve demonstrar ao menos 5 logs de redução em até 60 minutos para reconhecimento da sua eficácia bactericida [tópico 5.9.2 “*Bactericidal activity*”](14).

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 14561, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 15. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 14561:2006. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando Caldo Neutralizante D/E como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
60 min	Clean conditions Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Choleraesuis (INCQS nº 00028 - ATCC 10708)	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> , 37°C , 24 horas

Tabela 16. Limites básicos exigidos pela norma EN 14561:2006 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	$1,5 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^9$ UFC/mL
Teste Nw	$\geq 1,5 \times 10^7$ UFC/mL $\leq 0,05 \times N$ (ou $\lg Nw \leq (\lg N - 1,3)$)
Inóculo Nv	$3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL
Inóculo Nv_0	$3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL
Validação A	$\geq 0,5 \times Nv_0$
Validação B	$\geq 0,5 \times Nv_0$
Validação C	$\geq 0,5 \times Nv_0$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão utilizada no Teste Na; Nw é o teste conduzido em água/hard water como controle branco. Nv se trata da suspensão do inóculo utilizada nas validações experimentais A, B e C (cerca de $\frac{1}{4}$ da diluição 10^{-4} de N); Nv_0 a suspensão de validação no momento da inoculação em A, B e C ($Nv_0 = Nv/10$).

4.2.2. Avaliação de eficácia virucida

4.2.2.1. EN 16777

A EN 16777 (15) se trata de um método em carreador de fase 2, passo 2, para testagem de eficácia virucida de desinfetantes químicos e antissépticos com aplicação na área médica. Como carreadores inertes, são utilizadas discos metálicos de aço inoxidável (2cm x 1,5mm) para aplicação do inóculo.

Para que o item de teste seja considerado eficaz contra o vírus testado, de acordo com a EN 16777, ele deve ser capaz de causar uma redução de pelo menos 4 logs na carga viral, o que significa deve ser capaz de inativar 99,99% do vírus em questão.

Para o ensaio de implementação metodológica da EN 16777, foram adotadas as seguintes especificações, de acordo com solicitação do Patrocinador do Estudo:

Tabela 17. Especificações determinadas pelo Patrocinador do Estudo, utilizadas no ensaio de implementação metodológica da EN 16777:2018. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando meio de cultura (DMEM) gelado como agente neutralizante.

Tempo de exposição	Condições de exposição	Microrganismo alvo	Condições de cultivo
1 min	<i>Clean conditions</i> Albumina Bovina 0,3g/L	<i>Adenovirus</i> AATCC VR-5	Células HeLa DMEM 10% 37°C, 5% CO ₂

Tabela 18. Limites básicos exigidos pela norma EN 16777:2018 para validação do teste.

Grupo	Limite básico
Inóculo N	Suficientemente elevado para verificação de 4 logs de redução
Teste N _B	$(\lg N - \lg N_B) < 1,0$
Controle Negativo	Sem título viral
Controle Positivo (Glutaraldeído)	$2,0 \leq (\lg N_B - \lg CP) \leq 3,5$

Legenda: Inóculo N se trata da suspensão utilizada no Teste N_A; N_B o teste conduzido com Tampão Fosfato Salino (PBS); Controle Negativo são as células hospedeiras sem aplicação do inóculo viral; Controle Positivo (CP) é a solução de glutaraldeído a 125ppm.

5. Resultados

5.1. Metodologias Fase 2, Passo 1

Os resultados das implementações dos métodos são apresentados abaixo com a determinação do percentual de redução dos microrganismos em logs e porcentagem para cada item de teste analisado. Valores representados de acordo com a média das replicatas tituladas pós protocolo experimental.

5.1.1. EN 1650

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com a suspensão fúngica no momento da inoculação (N_0), verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 1 minuto de exposição em temperatura ambiente apresentou, frente a *S. brasiliensis*, apresentou redução de 4,02 logs, correspondendo a eficácia fungicida de 99,991%, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (8). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 1.

Tabela 19. Resultados da implementação metodológica da EN 1650. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Cepa: <i>Sporothrix brasiliensis</i>				
1 minuto de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	9,50x10 ¹	1,98	Validado
	B	8,50x10 ¹	1,92	Validado
	C	1,10x10 ²	2,04	Validado
Inóculo de Teste	N	4,90x10 ⁷	7,69	Validado
	N₀	4,90x10 ⁶	6,69	Validado
Inóculos de Validação	N_v	4,90x10 ²	2,69	Validado
	N_{v0}	4,90x10 ¹	1,69	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	4,67x10 ²	2,67	Não se aplica
Atividade fungicida do Saneante (sigiloso)	Redução em log ₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	4,02		99,991%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Teste Na).

5.1.2. EN 13624

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com a suspensão fúngica no momento da inoculação (N_0) na tabela abaixo, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 60 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou, frente a *C. albicans*, redução de 4,04 logs, correspondendo a eficácia fungicida de 99,991%, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (9). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 1.

Tabela 20. Resultados da implementação metodológica da EN 13624:2013. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Cepa: <i>Candida albicans</i>				
60 minutos de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	1,05x10 ³	3,02	Validado
	B	1,10x10 ⁴	4,04	Validado
	C	2,50x10 ³	3,40	Validado
Inóculo de Teste	N	1,55x10 ⁷	7,19	Validado
	N₀	1,55x10 ⁶	6,19	Validado
Inóculos de Validação	N_v	1,55x10 ³	3,19	Validado
	N_{v0}	1,55x10 ²	2,19	Validado
	N_{vB}	1,55x10 ⁵	5,19	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	<1,40x10 ²	<2,15	Não se aplica
Atividade fungicida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	4,04		99,991%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (*Na*).

5.1.3. EN 1276

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com a suspensão bacteriana no momento da inoculação (N_0) na tabela abaixo, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 15 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou redução de 0,81 logs, sem eficácia bactericida significativa, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (10). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 1.

Tabela 21. Resultados da implementação metodológica da EN 1276:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Cepa: <i>Clostridium difficile</i>				
15 minutos de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	8,00x10 ²	2,90	Validado
	B	1,55x10 ³	3,19	Validado
	C	1,55x10 ³	3,19	Validado
Inóculo de Teste	N	1,50x10 ⁸	8,17	Validado
	N ₀	1,50x10 ⁷	7,17	Validado
Inóculos de Validação	Nv	8,95x10 ²	2,95	Validado
	Nv ₀	8,95x10 ¹	1,95	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	2,30x10 ⁶	6,36	Não se aplica
Atividade bactericida do Saneante (sigiloso)	Redução em log ₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	0,81		84,61%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

5.1.4. EN 13727

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com a suspensão bacteriana no momento da inoculação (N_0) na tabela

abaixo, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 60 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou, frente a *C. difficile*, redução de 1,22 logs - eficácia bactericida de 94,0%, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (11). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 1.

Tabela 22. Resultados da implementação metodológica da EN 13727. O método foi realizado em temperatura ambiente (20±2°C).

Cepa: <i>Clostridium difficile</i>				
60 minutos de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	1,40x10 ³	3,15	Validado
	B	1,00x10 ³	3,00	Validado
	C	9,50x10 ²	2,98	Validado
Inóculo de Teste	N	2,00x10 ⁸	8,30	Validado
	N₀	2,00x10 ⁷	7,30	Validado
Inóculos de Validação	N_v	1,01x10 ³	3,00	Validado
	N_{v0}	1,01x10 ²	2,00	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	1,20x10 ⁶	6,08	Não se aplica
Atividade bactericida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	1,22		94,0%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

5.1.5. EN 14348

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com a suspensão bacteriana no momento da inoculação (*N₀*) na tabela abaixo, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 30 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou redução de 4,07 logs de *M. massiliense* – 99,991%

de eficácia micobactericida, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (12). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 1.

Tabela 23. Resultados da implementação metodológica da EN 14348:2005. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Cepa: <i>Mycobacterium massiliense</i>				
30 minutos de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	4,50x10 ²	2,65	Validado
	B	2,50x10 ²	2,40	Validado
	C	3,00x10 ³	3,48	Validado
Inóculo de Teste	N	4,71x10 ⁹	9,67	Validado
	N₀	4,71x10 ⁸	8,67	Validado
Inóculos de Validação	N_v	1,30x10 ³	3,11	Validado
	N_{v0}	1,30x10 ²	2,11	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	4,05x10 ⁴	4,61	Não se aplica
Atividade micobactericida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	4,07		99,991%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

5.1.6. EN 14476

Considerando a apresentação dos resultados na tabela abaixo em percentual de redução do produto no tempo de exposição em comparação com o Controle Branco no tempo imediato, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante teste (sigiloso), em 10 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou redução de 4,67 logs de *Vaccinia virus* – 99,998% de eficácia virucida, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (13). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 2.

Tabela 24. Resultados da implementação metodológica da EN 14476:2013+A2:2019. O método foi realizado em temperatura ambiente (20±2°C).

<i>Vaccinia virus</i>			
<i>10 minutos de contato – Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)</i>			
Grupos	TCID₅₀/mL	Log₁₀ (TCID₅₀/mL)	Limite básico*
Inóculo de Teste (N)	1,58x10 ⁸	8,20	Validado
Teste N_B	7,34x10 ⁷	7,87	Validado
Controle Positivo (CP)	2,64x10 ⁵	5,42	Validado
Controle Negativo	-	-	Validado
Saneante (sigiloso) Teste Na	1,58x10 ³	3,20	Não se aplica
Atividade virucida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (TCID₅₀/mL)		Porcentagem de redução
	4,67		99,998%

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

5.2. Metodologias Fase 2, Passo 2

5.2.1. EN 14561

Considerando a apresentação dos resultados em percentual de redução do produto em comparação com o teste em água (Nw) na tabela abaixo, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante de teste (sigiloso), em 60 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou, frente à *S. choleraesuis*, redução de 5,03 logs - eficácia bactericida de 99,9991%, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (14). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 3.

Tabela 25. Resultados da implementação metodológica da EN 14561. O método foi realizado em temperatura ambiente (20±2°C).

Cepa: <i>Salmonella choleraesuis</i>				
60 minutos de contato - Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)				
Grupos		UFC/mL	Log₁₀ (UFC/mL)	Limite básico*
Validação e Controles	A	1,75x10 ³	3,24	Validado
	B	1,80x10 ³	3,26	Validado
	C	1,35x10 ³	3,13	Validado
Inóculo de Teste	N	1,90x10 ⁹	9,28	Validado
Inóculos de Validação	Nv	1,30x10 ³	3,11	Validado
	Nv₀	1,30x10 ²	2,11	Validado
Teste Controle Água	Nw	1,50x10 ⁷	7,18	Validado
Saneante (sigiloso)	Na	<1,40x10 ²	<2,15	Não se aplica
Atividade bactericida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (UFC/mL)		Porcentagem de redução	
	5,03		99,9991%	

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

5.2.2. EN 16777

Considerando a apresentação dos resultados na tabela abaixo em percentual de redução do produto no tempo de exposição em comparação com o Controle Branco no tempo imediato, verificou-se que, em *clean conditions* (substância de interferência Albumina Bovina Fração V – 0,3g/L), o saneante teste (sigiloso), em 10 minutos de exposição em temperatura ambiente apresentou redução de 0,33 logs de *Adenovirus* – 53,58% de eficácia virucida, com todos os limites básicos da técnica dentro dos padrões exigidos (13). Cálculo de redução realizado de acordo com Equação 2.

Tabela 26. Campo para posterior preenchimento dos resultados da implementação metodológica da EN 16777:2018. O método foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Adenovirus			
10 minutos de contato – Clean conditions (Albumina Bovina Fração V 0,3g/L)			
Grupos	TCID₅₀/mL	Log₁₀ (TCID₅₀/mL)	Limite básico*
Inóculo de Teste (N)	7,06x10 ⁵	5,85	Validado
Teste N_B	3,71x10 ⁵	5,57	Validado
Controle Positivo (CP)	3,71x10 ³	3,57	Validado
Controle Negativo	-	-	Validado
Saneante (sigiloso) Teste Na	1,72x10 ³	5,24	Validado
Atividade virucida do Saneante (sigiloso)	Redução em log₁₀ (TCID₅₀/mL)		Porcentagem de redução
	0,33		53,58%

*: Grupo de teste Validado ou Não Validado nos parâmetros de limites básicos exigidos pela técnica. Uma discrepância nos resultados perante os critérios de limites básicos implica em repetição do protocolo experimental. Não se aplica à amostra de teste (Na).

6. Discussões

Ao longo do trabalho, foi explorada a implementação de metodologias de avaliação de eficácia biocida de saneantes, com foco nas demandas regulatórias da ANVISA. Este processo esteve vinculado a uma série de dificuldades até a sua conclusão, como a interpretação de regulamentações complexas, a padronização do cultivo microbiológico, a adequação e implementação dos procedimentos operacionais padrões desenvolvidos, integrando os testes na demanda operacional, otimizando prazos e entrega de resultados confiáveis, reproduzíveis e de qualidade. Este trabalho representa, portanto, um produto técnico significativo, atendendo não apenas às exigências regulatórias, mas também à realidade operacional da Crop Labs.

O gráfico abaixo (**Figura 3**) traz uma distribuição percentual dos serviços prestados pela Crop Labs na área de eficácia biocida de saneantes no ano de 2023, considerando a implementação das metodologias desenvolvidas ao longo no ano nesta pesquisa de mestrado. Este gráfico oferece uma perspectiva visual clara sobre a influência e impacto direto das novas metodologias implementadas na procura e execução dos serviços.

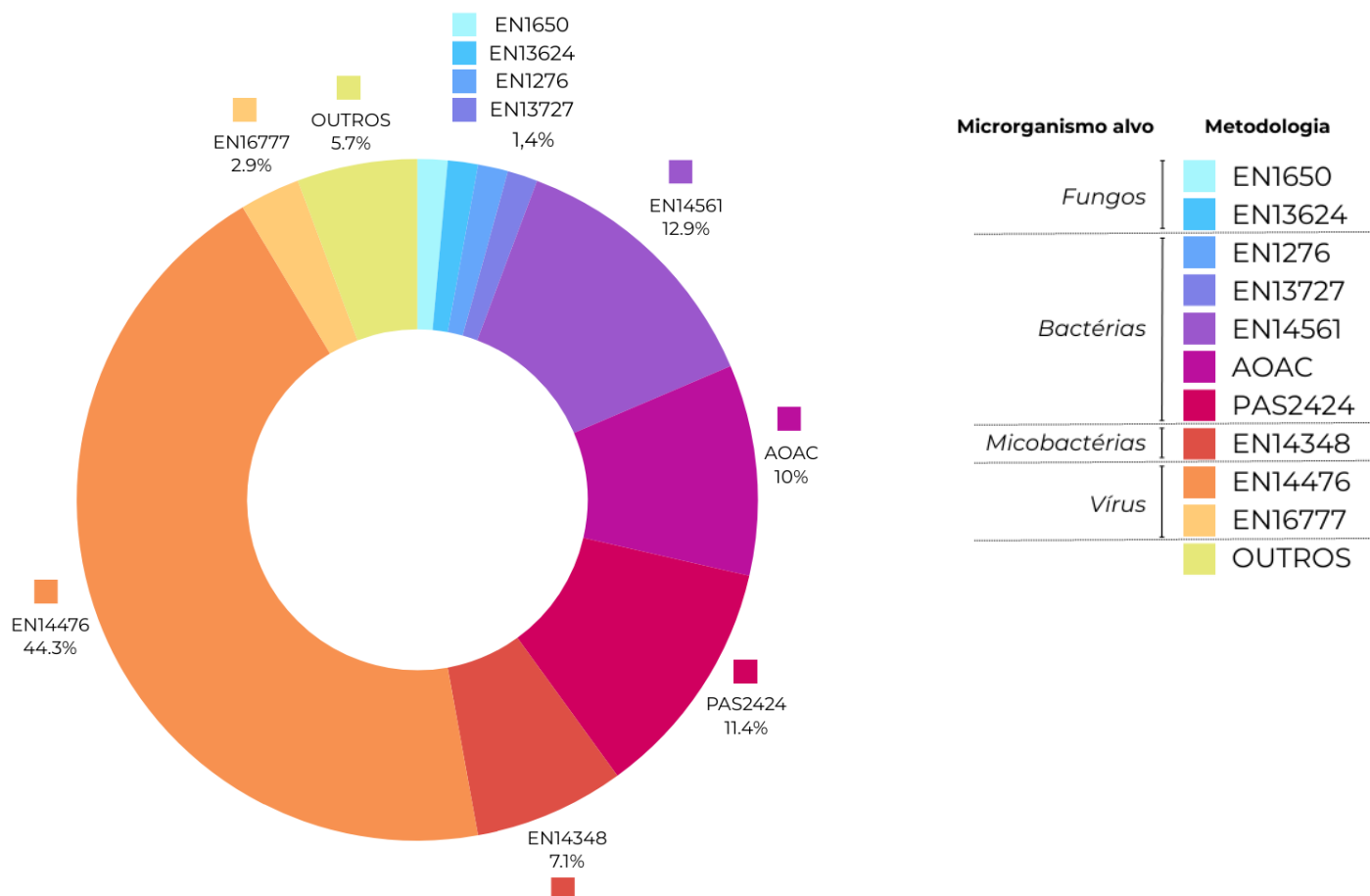


Figura 3. Gráfico de rosca. Distribuição percentual dos serviços prestados na área de eficácia de saneantes pela Crop Labs, no ano de 2023.

Cada setor do gráfico representa uma metodologia utilizada para avaliação da eficácia biocida de produtos saneantes. A porcentagem atribuída a cada setor destaca a contribuição relativa de cada método no escopo geral oferecido pela empresa no ano de 2023. A implementação das novas metodologias correspondeu a 72,9% dos serviços de eficácia em relação aos demais da mesma área, reforçando a relevância e a proeminência das contribuições deste estudo no contexto de prestação de serviços de eficácia biocida de saneantes com fins de regulamentação.

Considerando, ainda, as metodologias AOAC e PAS2424 anteriormente implementadas, que também são reconhecidas na prática regulatória, a empresa forneceu 94,3% dos serviços de teste de eficácia visando fins de regulamentação perante

a ANVISA, sendo apenas 5,7% referente à outras metodologias para fins iniciais de *screening* e pesquisa e desenvolvimento, sem finalidade regulamentadora.

Este panorama visual reforça o impacto das metodologias, demonstrando seu papel fundamental na prestação de serviços na área de eficácia biocida de saneantes. Além disso, consolida a demanda destes serviços advinda do mercado em métodos padronizados e implementados que caminham em paralelo com a prática regulatória.

7. Conflitos de Interesse

O projeto em questão não apresenta conflitos de interesse entre o setor público e privado, todos os participantes envolvidos no estudo, incluindo as figuras orientadoras e os colaboradores, estão comprometidos com a integridade e imparcialidade da pesquisa. As atividades do projeto foram conduzidas de acordo com as diretrizes éticas e os princípios de imparcialidade, assegurando a integridade e transparência científica e a confiabilidade dos dados obtidos.

8. Referências

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 59, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010 - Procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. 2010.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Classificação de saneantes [Internet]. 2020. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/saneantes/classificacao-de-saneantes>
3. IUPAC. Median Letal Dose [Internet]. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1351/goldbook.M03810>
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 774, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2023 - Dispõe sobre as condições para o registro e a rotulagem de produtos saneantes com ação antimicrobiana. 2023.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 700, DE 13 DE MAIO DE 2022 -Dispõe sobre produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos, e seu registro. 2022.
6. US Environmental Protection Agency. Standard Operating Procedure for AOAC Use Dilution Method for Testing Disinfectants. 2020.
7. Maillard JY. Testing the Effectiveness of Disinfectants and Sanitizers. In: Handbook of Hygiene Control in the Food Industry: Second Edition. Elsevier Inc.; 2016. p. 569–86.
8. European Committee for Standardization. EN 1650:2019 “Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1).” 2019;
9. European Committee for Standardization. EN 13624:2013 “Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).” 2013.
10. European Committee for Standardization. EN 1276:2019 “Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1).” 2019;
11. European Committee for Standardization. EN 13727:2012+A2:2015 “Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).” 2015;
12. European Committee for Standardization. EN 14348:2005 “Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants - Test methods and requirements (phase 2, step 1).” 2005.
13. European Committee for Standardization. EN 14476:2013+A2:2019 “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)." 2019;
14. European Committee for Standardization. EN 14561:2006 "Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity for instruments used in the medical area-Test method and requirements (phase 2, step 2)." 2023.
 15. European Committee for Standardization. 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 - Test method and requirements (phase 2/step 2)." 2018.