



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

**Lucas Gabriel Ribeiro**

**Processo de validação ágil de mercado otimizada em  
departamento científico com implementação de serviços de validação  
de produtos com ação virucida contra o SARS-CoV-2**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Lucas Gabriel Ribeiro

Processo de validação ágil de mercado otimizada em departamento científico com implementação de serviços de validação de produtos com ação vi-  
rucida contra o SARS-CoV-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mes-  
quita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obten-  
ção do título de Doutor em Pesquisa e Desen-  
volvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa.Dra.Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ribeiro, Lucas Gabriel.

Processo de validação ágil de mercado otimizada em departamento científico com implementação de serviços de validação de produtos com ação virucida contra o SARS-CoV-2

/ Lucas Gabriel Ribeiro. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 21201013

1. Anti-infecciosos. 2. COVID-19. 3. Virucida.  
4. SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Antimicrobianos; SARS-CoV-2; Virucida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, por sempre lutarem e acreditarem em mim, por todo apoio emocional, paciência, por todas as orientações, por me transmitirem seus valores e virtudes - amor, sinceridade, simplicidade e comprometimento. Vocês são minha base, exemplo e motivação.

Ao meu irmão por toda compaixão, por sempre ser muito carinhoso, atencioso e por todos os conselhos. Especialmente por sempre me ouvir e pela paciência em me ajudar nas mais diferentes ocasiões.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, que com seu entusiasmo, sabedoria e um altruísmo sem igual, me motivou nos primeiros passos da minha trajetória de pesquisa aplicada e até aqui tem me mostrado como a ciência pode ser aplicada para ajudar as pessoas. Seu trabalho, caráter e preocupação com todos, são um exemplo de virtudes muito belas que são alicerce na minha trajetória.

Aos integrantes da Crop Biolabs por se dedicarem com muita paixão e disposição para empreender em ciências da vida, visando sempre levar a ciência de modo ágil para aplicações reais na vida daqueles que necessitam. E por toda convivência, aprendizado e colaboração.

“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente. que erra, que decepciona, porque não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente.”

Theodore Roosevelt

## RESUMO

Crises sanitárias no contexto pandêmico, atreladas a doenças infecciosas, exigem soluções rápidas da biotecnologia para reduzir a transmissibilidade, propondo produtos virucidas (que inativam vírus), métodos de tratamento, vacinas, vigilância epidemiológica, ações e instruções para políticas públicas. A dramática pandemia da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2 potencializou a importância de tecnologias virucidas para redução da capacidade de transmissão de patógenos respiratórios. Observou-se uma crescente demanda para que os produtos com ação virucida, tais como antissépticos, purificadores de ar, equipamentos de ozonização, UV-C, tecnologias de desinfecção, tecidos e superfícies não porosas com ativos virucidas pudessem ser avaliados e terem um respaldo técnico científico comprovando a inativação das partículas virais do causador da COVID-19. Assim, o presente trabalho estabeleceu a padronização, na *startup* associada ao projeto, das técnicas: ISO 18184 *Textiles - Determination of antiviral activity of textile products*, ISO 21702 *Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces*, EN 14476 *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)*, as quais podem fornecer um respaldo técnico através de um laudo, garantindo a análise correta da eficácia virucida de amostras têxteis, superfícies não porosas e amostras em suspensão como desinfetantes e outros produtos de uso cosmético, como antissépticos e higienizadores de mãos. Paralelamente, o presente trabalho, avaliou a eficácia de uma plataforma capaz de nebulizar soluções patogênicas (virais), gerando gotículas e micro gotículas dentro de um sistema hermético, sendo possível amostrar o conteúdo biológico, a partir dos particulados gerados, quantificando a infectividade da partícula viral durante o processo de nebulização normal e após a exposição a diferentes tecnologias de desinfecção de ambientes internos, a análise foi feita de modo comparativo com resultados comparados com um equipamento similar – NIOSH Biosampler, cedido por parceria com o *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. Após as padronizações técnicas e metodológicas, foi estabelecido um sistema de gestão de projetos, com adaptações do guia PMBOK® para monitoramento e acompanhamento dos projetos a serem executados em parceria com a *startup* associada.

## ABSTRACT

Health crises in the pandemic context, tied to infectious diseases, require rapid biotechnology solutions to reduce transmissibility, proposing virucidal products (which inactivate viruses), treatment methods, vaccines, epidemiological surveillance, actions and instructions for public policies. The dramatic pandemic of COVID-19 caused by SARS-CoV-2 has enhanced the importance of virucidal technologies to reduce the transmission capacity of respiratory pathogens. A growing demand was mapped and validated for products with virucidal activity, such as antiseptics, air purifiers, ozonization equipment, UV-C, disinfection technologies, tissues and non-porous surfaces with virucidal assets could be evaluated and have a scientific technical support proving the inactivation of viral particles. The companies that work with surface and indoor disinfection equipment observed a market opportunity in the scenario of the COVID-19 pandemics. Disinfection and sterilization technologies by means of ozone generators, ultraviolet lamps had greater repercussion in the fight against the virus. Thus, the present work established the standardization, in the startup associated with the project, of the techniques: ISO 18184 Textiles - Determination of antiviral activity of textile products , ISO 21702 Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces, EN 14476 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), which can provide technical support through a report, ensuring the correct analysis of the virucidal efficacy of textile samples , non-porous surfaces and suspended samples such as disinfectants and other products for cosmetic use, such as antiseptics and hand sanitizers. At the same time, the present work evaluated the effectiveness of a platform capable of nebulizing pathogenic (viral) solutions, generating droplets and micro droplets within a hermetic system, making it possible to sample the biological content, from the generated particles, quantifying the infectivity of the viral particle during the normal nebulization process and after exposure to different technologies for disinfecting indoor environments, the analysis was performed in a comparative way with results compared with a similar equipment – NIOSH Biosampler, provided by a partnership with the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). After the technical and methodological standardizations, a project management system was established, based on the PMBOK® guide for monitoring and monitoring the projects to be executed in partnership with the associated startup.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 SARS-CoV-2: estrutura viral .....	16
1.2 Nanopartículas: potencial de ação virucida e antimicrobiano .....	16
1.3 Protótipo AirV: equipamento de nebulização viral e simulação de ambientes infectados com vírus para ensaios de eficácia de equipamentos de desinfecção .....	17
1.2 Sistema de Gestão de Projetos .....	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.1 Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Padronização de metodologias de validação de eficácia virucida de superfícies porosas (ISO 18184) e superfícies não porosas (ISO 21702).....	22
3.1.1 Parâmetros e definições aplicadas na determinação da ação virucida .....	23
3.1.2 Análise dos resultados.....	24
3.2 AATCC 100 (American Association of Textile Chemists and Colorists) para determinação de eficácia antimicrobiana e JIS Z 2801:10 (Test for Antimicrobial Activity of Plastics) .....	25
3.3 Padronização da 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) .....	27
3.3.1 Verificação da metodologia EN14476:.....	28
3.4 Prototipagem de equipamento de bioaerrosolização AirV ®.....	29
3.4.1 Modo de funcionamento e metodologia de quantificação de título viral após a nebulização.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 Eficácia virucida de superfície plástica tratada com nanopartículas de prata contra o vírus SARS-CoV-2.....	31
4.2 Eficácia virucida de superfície têxtil tratada com nanopartículas de prata contra o vírus SARS-CoV-2 .....	34
4.3 Ensaio de determinação de eficácia antimicrobiana Norma JIS Z 2801 e Norma AATCC 100 .....	35
4.4 Avaliação de eficácia virucida de antisséptico bucal contra o vírus SARS-CoV-2 de acordo com a EN 14476 .....	38
4.5 Eficácia de bioaerrosolização do AirV ® em comparação com sistema NIOSH do <i>Centers for Disease Control and Prevention (CDC)</i> .....	39

4.6 Validação de mercado virucida em campo .....	43
4.6.1 Segmentos Alvo de Mercado .....	44
4.7 Sistema de Gestão de Projetos .....	47
4.7.1 Estruturação de gestão de novos projetos- <i>Front-end Innovation</i> .....	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
5.1 Aplicabilidade na prática profissional do produto gerado pela pesquisa .....	52
6. CONCLUSÃO .....	52
7. BIBLIOGRAFIA.....	53

## LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1:** SISTEMA DE SIMULAÇÃO PARA TRANSMISSÃO AÉREA DE GOTÍCULAS / AEROSSÓIS DE VÍRUS. IMAGEM ESQUEMÁTICA (A) E UMA FOTOGRAFIA (B) DO SISTEMA. UMA CÂMARA DE TESTE PARA EXPERIMENTOS DE TRANSMISSÃO AEROTRANSPORTADA FOI CONSTRUÍDA EM UMA INSTALAÇÃO BSL3. .... 18
- FIGURA 2:** GLOVEBOX DA EMPRESA SCALA CIENTIFICA, DESENVOLVEDORA DE SISTEMAS DE AMBIENTES FECHADOS PARA SITUAÇÕES ESPECÍFICAS DE MANIPULAÇÃO DE PRODUTOS E AGENTES BIOLÓGICOS. A DIREITA O PRODUTO #890-THC. A ESQUERDA O PRODUTO 840-PH-10, POWDER HANDLING GLOVE BOX. .... 19
- FIGURA 3:** ESQUEMA DE PLACA DE TITULAÇÃO: TCID<sub>50</sub> (MEDIAN TISSUE CULTURE INFECTIOUS DOSE), REALIZADO EM MICROPLACA DE 96 POÇOS, ONDE, NA PRIMEIRA LINHA, FORAM ADICIONADOS 9 POÇOS COM AMOSTRAS DE VÍRUS PÓS CONTATO E NEUTRALIZAÇÃO COM AS AMOSTRAS TRATAMENTO. .... 25
- FIGURA 4:** UMA VISÃO GERAL ILUSTRATIVA DE FUNCIONAMENTO DO PRIMEIRO PROTÓTIPO AIRV. .... 29
- FIGURA 5:** ILUSTRAÇÃO DE DILUIÇÃO EM SÉRIE DA SOLUÇÃO VIRAL, CONFORME METODOLOGIA TCID<sub>50</sub>. .... 31
- FIGURA 6:** AMOSTRAS SUBMETIDAS À AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA. A) SUPERFÍCIES DE 50MM X 50MM COM “ANTIMICROBIANO X” (NORMA JIS Z 2801; B) SUPERFÍCIES DE 50MM X 50MM COM “ANTIMICROBIANO Y” (NORMA JIS Z 2801); C) SUPERFÍCIES DE MATERIAL ESPONJOSO DE 50MM X 50MM COM ADITIVO ANTIMICROBIANO “Y” (NORMA AATCC 100 ). .... 36
- FIGURA 7:** AMOSTRA A: SUPERFÍCIES COM E SEM “ANTI-MICROBIANO X, TESTES REALIZADOS EM TRIPLICATAS (TESTE 1, TESTE 2 E TESTE 3). TESTES REALIZADOS COM ESCHERICHIA COLI (PLACAS DE ÁGAR MACCONKEY), COM LEITURAS REALIZADAS NO TEMPO 0H, E APÓS 24H DE CONTATO. .... 37
- FIGURA 8:** AMOSTRA B - SUPERFÍCIES COM E SEM ANTIMICROBIANO Y”, TESTES REALIZADOS EM DUPLICATAS (TESTE 1 E TESTE 2) DEVIDO A DISPONIBILIDADE DE AMOSTRAS. TESTES REALIZADOS COM ESCHERICHIA COLI (PLACAS DE ÁGAR MACCONKEY), COM LEITURAS REALIZADAS NO TEMPO 0H, E APÓS 24H DE CONTATO. .... 37
- FIGURA 9:** AMOSTRA C; TESTE AATCC 100 REALIZADO COM E.COLI (PLACAS DE ÁGAR MACCONKEY) COM LEITURAS REALIZADAS NO TEMPO 0H, E APÓS 24H DE CONTATO. SUPERFÍCIES DE MATERIAL ESPONJOSO “Y”, COM E SEM ADITIVO ANTIMICROBIANO. TESTES REALIZADOS EM TRIPLICATAS (TESTE 1, TESTE 2 E TESTE 3). .... 37
- FIGURA 10:** DESENHO TÉCNICO DE EQUIPAMENTO PARA ATOMIZAÇÃO E AMOSTRAGEM DE AR. .... 39

<b>FIGURA 11:</b> AIRV VISÃO REPRESENTATIVA DE COMPONENTES E FUNCIONAMENTO. A) ILUSTRAÇÃO GERAL DE TODOS OS COMPONENTES PARA FUNCIONAMENTO DO EQUIPAMENTO. B) DEMONSTRAÇÃO DE AIRV EM FUNCIONAMENTO COM GERAÇÃO DE MICRO GOTÍCULAS POR MEIO DE NEBULIZADOR E SISTEMA DE ALÍQUOTA DA AMOSTRA NEBULIZADA POR MEIO DE BIOSAMPLER. ....	42
<b>FIGURA 12:</b> ESTIMATIVA DE CRESCIMENTO DE MERCADO DO SETOR DE DESINFETANTES AO REDOR DO MUNDO (CAGR, 2021). ....	46
<b>FIGURA 13:</b> SETORES COMO O DE ALIMENTOS E BEBIDAS, AGRICULTURA E TRATAMENTO DE ÁGUA SE APRESENTAM COMO OS GRANDES SEGMENTOS QUE IMPULSIONARÃO O CRESCIMENTO DO MERCADO BIOCIDA (CAGR, 2021).....	47
<b>FIGURA 14:</b> EXEMPLO DE MODELO DE PROJETO INSERIDO NA PLATAFORMA ASANA PARA GESTÃO E MONITORAMENTO DOS PROJETOS DE ANÁLISES VIRUCIDAS.....	48
<b>FIGURA 15:</b> ESBOÇO PROCESSUAL DE AÇÕES PARA INICIAR AS ANÁLISES DE VIABILIDADE TÉCNICA DE NOVOS PROJETOS, ADVINDOS DAS DEMANDAS PROSPECTADAS PELO DEPARTAMENTO DE NOVOS NEGÓCIOS. ....	50
<b>FIGURA 16:</b> ESTRUTURAÇÃO DE AÇÕES APÓS DEFINIR VIABILIDADE TÉCNICA DE EXECUÇÃO DE NOVOS PROJETOS AQUÉM DOS RELACIONADOS COM VALIDAÇÃO DE PRODUTOS CONTRA VÍRUS. ....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A forte expansão dos mercados de produtos antimicrobianos e virucidas destacam os impactos socioculturais advindos do cenário pandêmico e da crise sanitária ocasionada pela disseminação do SARS-CoV-2. A preocupação com a higiene foi intensificada vide à alta demanda e necessidade por produtos que possam oferecer proteção contra o vírus causador da COVID-19, reduzindo sua transmissibilidade. Através de Pesquisa & Desenvolvimento inúmeras empresas buscaram se consolidar no mercado de produtos biocidas, principalmente por meio de produtos com caráter inovador, fornecendo soluções virucidas contra o SARS-CoV-2. O setor de cosmético, saneantes e equipamentos de desinfecção notou a oportunidade de ampliar o portfólio, procurando validações que determinam a eficácia de inativação de partículas virais através do uso de antissépticos, superfícies têxteis e não porosas com aditivos complementares potencializadores virucidas, além de diversos instrumentos desinfetantes e esterilizantes, tais como ozonizadores, geradores de íons, equipamentos UV-C, purificadores de ar entre outros. Grande parte das empresas desenvolvedoras dessas tecnologias inovadoras no combate ao SARS-CoV-2 buscaram realizar ensaios laboratoriais em instituições de renome e com infraestrutura de biossegurança necessária para manipulação e validação do efeito virucida contra linhagens virais da família *coronaviridae* ou com a linhagem específica causadora da COVID-19. A baixa disponibilidade de laboratórios com infraestrutura de biocontenção com Biossegurança Nível 3 (NB3) inflou um mercado de ensaios virais em instituições que manipulam vírus semelhantes ao SARS-CoV-2, com linhagens virais pertencentes à família do coronavírus, à exemplo, muitos validaram os produtos com o MHV-3; CCoV entre outros. Além disso, uma série de testes de eficácia virucida foi respaldado por uma miscelânea de metodologias sem validação da metodologia final.

Algumas instituições como a UNICAMP, Fiocruz e USP têm atuado no setor de colaboração para validação de produtos com atividade virucida. Destaque para a UNICAMP, atraindo centenas de projetos para a realização dos ensaios virucidas. A oportunidade, da pioneira nos testes, ocorreu devido a estrutura laboratorial da universidade em parceria orçamentária com empresas, além da proximidade com o ecossistema de inovação de Campinas – SP; e pelo forte renome. No entanto, o laboratório concentrou-se em testes com a linhagem de um coronavírus murino, o Vírus da Hepatite

Murina (MHV-3). A ressalva dessa linhagem, atinge principalmente os interesses comerciais de empresas, que devido a fiscalização de órgãos como a ANVISA, impedem a divulgação de um *marketing* virucida contra o coronavírus humano, causador da COVID-19, o SARS-CoV-2.

De acordo com diretrizes de fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) os ensaios de laboratório precisam seguir uma metodologia internacionalmente aceita e cuja finalidade esteja em consonância com o produto que se quer testar. Mesclar várias metodologias sem comprovação de validação da metodologia final pode invalidar o teste para fins de aceitação de comprovação de eficácia junto à Anvisa. Devido à ausência de laboratórios que sigam protocolos validados internacionalmente em organizações de padronização metrológica, como métodos preconizados pela *International Organization for Standardization (ISO)*, *European Committee for Standardization*, *American Society for Testing and Materials (ASTM)*, muitas instituições públicas começaram a realizar adaptações protocolares por intermédio de interpretações de cada referencial, não seguido de modo fidedigno somente uma metodologia ou validando um método perante diretrizes de órgãos de fiscalização.

Consequentemente foi intensificado o *marketing* de produtos que “inativam” vírus, o que convergiu na rotulagem de produtos tendenciosos, os quais atestavam a eficácia contra o novo coronavírus. Como papel fundamental na fiscalização, a Anvisa determinou por meio de notas técnicas a necessidade de serem realizados ensaios com a linhagem causadora da COVID-19, o SARS-CoV-2, para que seja legalmente possível apregoar em rótulo a eficácia perante o vírus mais falado do momento (NOTA TÉCNICA Nº 20/2021/SEI/COSAN/GHCOS/DIRE3/ANVISA). Nitidamente, inúmeros produtos encontram-se irregulares devido a necessidade de comprovações mais relevantes para destacar a capacidade e utilidade para o enfrentamento da disseminação do novo coronavírus, podendo ser visualizado por meio de dados da Anvisa no painel de Monitoramento pós-mercado da qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária COVID-19. A categoria de cosméticos e saneantes apresenta cerca de 110 medidas cautelares, esses dados justificam a necessidade das empresas desenvolvedoras de produtos se alinharem com parceiros capazes de fornecer orientações técnicas, científicas e de regulamentação para validação do modo correto. A suspensão e recolhimento de

produtos, barrando a comercialização, distribuição, propaganda e uso, faz com que uma diversidade de empresas perca quantidades catastróficas de receita.

O presente projeto contou com a parceria e visão da Crop Biolabs, uma *startup* filha da Unesp, a qual notou a necessidade de padronizar ensaios experimentais para determinar a eficácia virucida de diferentes produtos, além de estruturar um modelo de negócios capaz de fornecer por meio de prestação de serviços de pesquisa e desenvolvimento a comprovação da eficácia virucida, mediante protocolos padronizados e reconhecidos internacionalmente. A estrutura do modelo de negócios inicia-se com o estabelecimento de um convênio entre a Crop Biolabs e o Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB), o convênio é respaldado de acordo com o Decreto nº 62.817, de 04 de setembro de 2017, o qual regulamente a Lei nº 13.243/2016, proporcionando a possibilidade da utilização da infraestrutura laboratorial e dos equipamentos presentes através do pagamento de uma taxa de bancada referente a hora de uso do Laboratório de Biologia Molecular, unidade especial do LBA do HCFMB. O convênio estabelecido entre as partes possibilita que a equipe da Crop utilize a estrutura laboratorial com infraestrutura de nível de biossegurança 3 (NBL3) para execução experimental, sendo todos os procedimentos técnicos-científicos metodológicos e de interpretação de resultados validados perante a equipe da *startup*.

Com a padronização metodológica e estruturação de um canal de vendas foi consolidado um portfólio com uma gama de serviços de ensaios metodológicos de acordo com a ISO 18184 *Textiles - Determination of antiviral activity of textile products*, ISO 21702 *Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces*, EN 14476 *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)*, as quais podem fornecer um respaldo técnico através de um laudo, garantindo a análise correta da eficácia virucida de amostras têxteis, superfícies não porosas e amostras em suspensão como desinfetantes e outros produtos de uso cosmético, como antisépticos e higienizadores de mãos.

De modo paralelo, empresas fabricantes de equipamentos de desinfecção de superfícies e ambientes observaram uma oportunidade mercadológica no cenário da crise

sanitária. As tecnologias de desinfecção e esterilização por meio de geradores de ozônio, lâmpadas ultravioletas tiveram maior repercussão no quesito combate ao vírus causador da COVID-19. A aplicabilidade desses equipamentos está correlacionada com uma redução da infecção do SARS-CoV-2 pela principal via aérea de transmissão. Sabe-se que a transmissão do vírus ocorre com maior incidência devido a inalação de partículas ou micro e gotículas virais, as quais são geradas quando uma pessoa infectada está falando, respirando, tossindo, espirrando. A variedade de partículas é transportada pelo ar e podem conter a partícula viral infectante, a qual pode permanecer no ar por horas. Paralelamente, outras doenças infecciosas podem ser transmitidas pelo ar por meio de aglomerados de gotículas e bioaerossóis que podem variar de tamanho, que variam de tamanho entre 1- 5 µm, essas microgotículas podem conter os microrganismos potencialmente viáveis, ser protegidas por camadas de secreções, permanecer em suspensão no ar e ainda ser transportada por longas distâncias.

Em parceria com a Crop, foi desenvolvido um protótipo e metodologia capaz de simular um espirro, gerando gotículas e micro gotículas virais dentro de um sistema hermético, sendo possível amostrar o ar com coleta dos aerossóis coletados e então dimensionar infectividade da partícula viral. O protótipo responde uma demanda científica e comprobatória da eficácia dessas tecnologias frente ao SARS-CoV-2 e de modo a simular a principal via de transmissão do vírus.

O atual projeto além de uma padronização metodológica referenciada em normativas internacionais, do desenvolvimento de uma plataforma de ensaios simulando bioaerossóis, resultou na estruturação de um *workflow* para gestão de projetos de alta complexidade científica e na validação de mercado em campo. Atualmente, as validações serviram para que o modelo operacional e de gestão fosse aplicado como um serviço, agora mais bem formatado e principalmente podendo de fato buscar *cases* no mercado que consolidassem a operação em um processo repetível e escalável. O processo foi implementando na startup Crop Biolabs, na qual o fluxo de etapas é gerido por meio das plataformas Pipefy™ e Asana.

## **1.1 SARS-CoV-2: estrutura viral**

O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Coronavirinae* família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, reino *Riboviria*. (GORBALENYA et al., 2020), sendo um vírus de ácido ribonucleico (RNA), o qual possui uma única fita de RNA de polaridade positiva (RNA+). Possui partículas virais esféricas de aproximadamente 80-220 nm. O genoma viral do SARS-CoV-2 possui 30.000 nucleotídeos, codificando cerca de 29 proteínas virais. Os coronavírus possuem RNA genômico associado a inúmeras cópias de nucleoproteína, formadoras de um nucleocapsídeo que pode ser liberado por exposição a produtos como detergentes e uma série de saneantes.

O envoltório do nucleocapsídeo é formado por uma camada bilipídica, associando proteínas, sendo as mais relevantes a glicoproteína de espícula, denominada de proteína S, as proteínas do nucleocapsídeo (proteína N), de envelope (E) e de membrana (M) (HELMY et al., 2020; LI et al., 2020). A proteína S possui duas regiões: Subunidade de ligação ao receptor (S1); subunidade de fusão de membranas (S2). A S1 é vinculada com a ligação do vírus ao receptor nas células hospedeira, desse modo determinam o tropismo celular e transmissibilidade do vírus. Enquanto a região S2 é composta por um peptídeo de fusão, sítio de clivagem, domínio citoplasmático, regiões de repetição Heptad e região transmembrana (HEALD-SARGENT; GALLAGHER, 2012; LU et al., 2020). Já a proteína M é a mais expressa no envelope, com ação no processo de montagem de partículas virais, além de determinar o sítio de brotamento do vírus e o formato do envelope viral; possui função de estabilizar o nucleocapsídeo por meio da interação com a proteína N (ICTV, 2011; MALIK, 2020). A proteína E, a menor proteína estrutural, também atua na montagem da partícula viral e de brotamento. Por fim, a proteína N associa-se ao RNA genômico formando o nucleocapsídeo, atua na síntese e tradução de RNA; além de favorecer a replicação viral.

## **1.2 Nanopartículas: potencial de ação virucida e antimicrobiano**

As partículas nanoestruturadas, metálicas, de óxido metálico, polímeros, a base de carbono e compósitos são usadas de acordo com a aplicação desejada. Dentre essas, as nanopartículas metálicas são as que possuem amplo espectro de aplicação biomédico. A

nanopartículas metálicas demonstram pronunciada atividade inibitória contra diversos microrganismos patogênicos, tais como fungos, bactérias e vírus. No contexto pandêmico da COVID-19, devido ao efeito antimicrobiano e virucida conhecido (citações) as nanopartículas de prata (AgNPs) nanopartícula de óxido de zinco (ZnO-NP) e nanopartícula de ouro (Au-NP) foram estudadas e aplicadas em uma série de produtos cosméticos e saneantes. As propriedades dessas nanopartículas dependem dos procedimentos de síntese, de seu tamanho, morfologia e carga superficial.

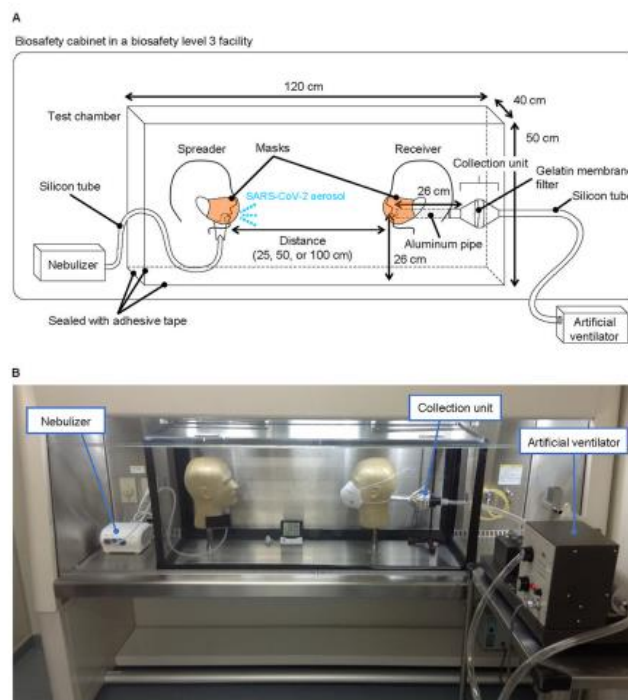
As AgNPs possuem eficácia contra vários tipos de vírus, incluindo o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), *Influenza A*, vírus da Hepatite B (HBV), assim como atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Um dos mecanismos antimicrobianos das AgNPs é associado à supressão de enzimas respiratórias e da interação com o material genético. Paralelamente o possível mecanismo de ação contra vírus ocorre devido a interação com o revestimento interno viral, impossibilitando a ligação do vírus com receptores celulares e na replicação viral devido a interação com íons  $Ag^+$  com o material genético viral (SALLEH et al., 2020). O ZnO-NP pode inibir o crescimento e a formação de biofilme de *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos recentes destacam o papel do íon  $Zn^{2+}$  na atividade antiviral, incluindo a inibição da RNA polimerase do SARS-CoV e da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), um receptor para a entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras (SKALNY; RINK; AJSUVAKOVA; ASCHNER; GRITSENKO; ALEKSEENKO; SVISTUNOV; PETRAKIS; SPANDIDOS; AASETH, 2020).

### **1.3 Plataformas e equipamentos de nebulização viral para simulação de ambientes infectados com vírus**

O desenvolvimento de sistemas herméticos para manipulação de patógenos respiratórios e outros produtos com necessidade de alto nível de isolamento, são elucidados na literatura científica e no âmbito industrial de manufatura de equipamentos como cabines biológicas, *glovebox*, isoladores etc. Portanto, sistemas com aplicabilidade específica para simular a principal via de transmissão de patógenos respiratórios, com flexibilidade de acoplagem de sistemas de nebulização para geração de aerossol e particulados respiratórios em consonância com as condições de liberação de partículas, micro e gotículas

liberadas durante a fala, espirro e tosse de um indivíduo infectado, ainda são pouco elucidados. Além disso, sistemas desenvolvidos especificamente para validar a eficácia de equipamentos com potencial de reduzir a transmissibilidade de vírus e outros patógenos dispersos no ar, com tecnologias biocidas, são ainda menos estudadas e disponíveis de modo comercial.

O contexto da crise sanitária mundial ocasionado pela disseminação do SARS-CoV-2 (causador da COVID-19) estimulou o desenvolvimento de sistemas que podem proporcionar condições para evidenciar a eficácia de máscaras e outras barreiras de redução da transmissão aérea do vírus em simulações realísticas (2020 Ueki et al ), que apesar da funcionalidade exigem dimensionamento específico para ainda serem alocados em sistemas controlados, como cabines de segurança biológica, reduzindo o tamanho e aérea de teste.

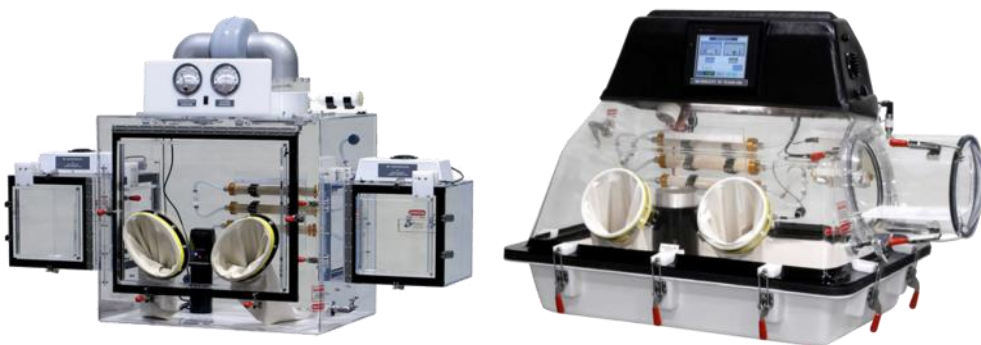


**Figura 1:** Sistema de simulação para transmissão aérea de gotículas / aerossóis de vírus. Imagem esquemática (A) e uma fotografia (B) do sistema. Uma câmara de teste para experimentos de transmissão aerotransportada foi construída em uma instalação BSL3.

Existem diversos registros de invenção na categoria de *glove box* (Marion E CoxMary E Cox, et al; David Boast), que são cabines promotoras de segurança para o operador sem comprometer o vazamento do ar interior para o exterior. Possuem pares de

luvas de um material flexível, com vedações em torno das aberturas de acesso associadas, com recipientes que são seletivamente separáveis do restante da câmara para permitir que os objetos sejam transferidos da câmara sem que tais objetos tenham que passar pela atmosfera externa. No entanto, essas não contêm um sistema para geração de aerossol e nebulização de possíveis soluções virais, além de sistemas de coleta das partículas geradas dentro do sistema, com intuito de determinar viabilidade viral após os procedimentos e ensaios, assim como a aplicabilidade não é voltada para realização dos ensaios de determinação de eficácia biocida de diferentes produtos e equipamentos. Outras invenções podem ser encontradas no âmbito de fornecimento de ambientes controlados para manipulação de fármacos e agentes biológicos no geral. A empresa Scala Científica consolidada na Holanda, Bélgica e Alemanha realiza a produção de sistemas fechados para laboratórios que necessitam de ambientes estéreis e isolados para procedimentos experimentais (figura 2).

Por essas razões, esse estudo propôs o desenvolvimento de um sistema capaz de nebulizar soluções virais, gerando partículas virais em gotículas e microgotículas, as quais podem ser acondicionadas em amostradores biológicos para posterior avaliação da infectividade em células hospedeiras. Com essa ferramenta é possível atestar tecnologias de desinfecção e purificação de ambientes com ênfase na aplicabilidade de produtos contra o SARS-CoV-2.



**Figura 2:** Glovebox da empresa Scala científica, desenvolvedora de sistemas de ambientes fechados para situações específicas de manipulação de produtos e agentes biológicos. A direita o produto #890-THC. A esquerda o produto 840-PH-10, Powder Handling Glove Box.

## 1.2 Sistema de Gestão de Projetos

O desempenho de uma empresa, independente da área de atuação está vinculado com a gestão de projetos e processos, sendo fundamental aprimorar técnicas e modelos de gerenciamento de prioridades, prazos e custos de projetos. Um guia de reconhecimento internacional de gerenciamento de projetos é o PMBOK® (*Project Management Body of Knowledge*), que engloba padronizações que identificam e conceituam etapas que podem ser aplicadas em processos, ferramentas e modelos de gestão de projetos, guiados por princípios de domínios e desempenho. Desde sua primeira edição de 1996 o guia difunde práticas eficientes, as quais foram testadas e comprovadas por gerentes de projetos ao redor do mundo, sendo compiladas em um único guia, o qual é atualizada a cada 4 anos aproximadamente. A denominação do PMBOK® como um guia, associa-o como um referencial de conhecimento para gestão de projetos, podendo ser adaptada de acordo com os processos que envolvem o ambiente empresarial em questão, não elencando obrigatoriedades, mas documentando e disponibilizando boas práticas.

Os benefícios de implementação de gestão de projetos, seguindo recomendações do PMBOK®, destaca-se principalmente em:

- Favorecer a padronização de gestão de projetos;
- Promover melhorias no fluxo de informações entre todas as partes envolvidas durante a execução do projeto;
- Aumentar o senso de urgência e reduzir a negligenciamento de atividades importantes;
- Enfatizar o uso racional de recursos;
- Controlar e monitorar etapas do projeto;
- Analisar etapas que colocam o projeto em risco e otimizar planos alternativos;

Por essas razões, o presente projeto foi desenvolvido considerando as práticas apresentadas no PMBOK®, adaptando-as para a rotina e ambiente operacional vinculado com a Crop Biolabs, em que um modelo de gestão de projetos fora implementado, podendo padronizar os processos de gerenciamento de todas etapas de validação de eficácia

virucida de produtos contra o SARS-CoV-2, além de um sistema de gestão para novos projetos de Pesquisa & Desenvolvimento, não atrelados necessariamente para os processos técnicos já padronizados, mas para projetos que demandam de inovação e envolvimento de laboratórios e pesquisadores parceiros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

- Implementar metodologias de cunho técnico aplicadas a validação de produtos virucidas por meio de delineamentos experimentais pautados em padronizações internacionais (*International Organization for Standardization*, *European Committee for Standardization*, *American Society for Testing and Materials*) e adaptações de procedimentos experimentais de avaliação de inativação viral para verificar a eficácia virucida de superfícies porosas e não porosas, antissépticos, cosméticos e purificadores de ar.
- Avaliar a eficácia de um protótipo e de uma metodologia de aerossolização de patógenos respiratórios (de relevância para saúde pública), dispersos em uma câmara de ar hermética, criando uma plataforma que possa mimetizar ambientes reais em parâmetros prévios de simulação para determinar a eficácia e validar tecnologias de desinfecção de ambientes, que buscam promover redução da transmissibilidade de vírus e microrganismos patogênicos.
- Implementação de um modelo de gestão de projetos alinhando-se com orientações do PMBOK®, com intuito de difundir práticas eficientes de gestão de processos.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Padronizar os experimentos laboratoriais de acordo com as metodologias: ISO 18184 *Textiles - Determination of antiviral activity of textile products*, ISO 21702 *Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces*, EN 14476 *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);*

- Avaliar parâmetros de monitoramento de partículas virais aerossolizadas em câmara de ar hermética, tais como particulados em diferentes frações, assim como avaliar a eficiência de amostrador para coleta das partículas virais totais por litro de ar amostrado, demonstrando a porcentagem de partículas virais infectantes (capazes de realizar o ciclo de replicação viral após a aerossolização);
- Implementar um sistema de gestão de projetos associados com a *startup* parceira, com monitoramento de todas as atividades técnicas na plataforma Asana, permitindo a visualização de dados cruciais para avaliação de KPIs (*Key performance indicator*).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Padronização de metodologias de validação de eficácia virucida de superfícies porosas (ISO 18184) e superfícies não porosas (ISO 21702)**

O teste virucida é realizado para avaliar o potencial do material tratado inativar as partículas virais, impedindo-as que infectem as células hospedeiras (Vero ATCC ® CCL-81™). Os ensaios são executados em réplicas e triplicatas independentes. Destaca-se que os resultados são expressos em comparação a ação virucida frente a redução de partículas virais da solução estoque de SARS-CoV-2 com um material “não ativo” (sem tratamento ou branco) e o material “ativo” (com tratamento), de modo que seja possível calcular o percentual de inativação viral, representado por  $\log_{10}$  de redução do TCID<sub>50</sub>.

De acordo com a ISO 21702 as amostras devem ter dimensões padronizadas em 50 mm x 50 mm e são acondicionadas individualmente em placas Petri, com posterior inoculação da solução viral durante o tempo de exposição. Em relação a ISO 18184, as amostras foram fragmentadas em dimensões aproximadas de 20x20mm totalizando aproximadamente 0,4g.

### 3.1.1 Parâmetros e definições aplicadas na determinação da ação virucida

- a) Título viral (SARS-CoV-2): O título da solução viral estoque de SARS-CoV-2 é de aproximadamente  $8,058 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL, suficientemente elevado para identificação de ao menos 4 logs de redução de título viral após exposição ao material teste.
- b) As amostras possuem tamanhos padronizados de acordo com a ISO 21702:2019, com 50 mm x 50 mm. Os filmes de cobrimento possuem área superficial de 1600 mm<sup>2</sup>.
- c) Controle de Citotoxicidade: O material testado não afetou a morfologia e crescimento celular.
- d) Neutralização: Para supressão da atividade virucida do material ativo é adicionado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 2% v/v Soro Fetal Bovino a 4°C.
- e) Exposição da solução viral com o material teste: A solução viral de SARS-CoV-2 é adicionada de modo que entre em contato com toda área superficial do material e então a mistura é neutralizada após os tempos de contato estipulados (conforme tópico d). O título viral é mensurado após a neutralização.
- f) Exposição da solução viral a um controle interno (amostra sem tratamento): Um controle interno branco não virucida (superfície sem tratamento ativo) é submetido ao contato com a solução viral de SARS-CoV-2. Após neutralização o título viral é mensurado pela metodologia TCID<sub>50</sub> e método de Spearman & Kärber.
- g) Parâmetros quantitativos da amostra com composto ativo (*Lona Libranium Prata*): Durante 30 minutos e 1 hora, a superfície com composto ativo e a solução viral de SARS-CoV-2 estarão em contato direto. Após a exposição, ocorre a neutralização (tópico d) e por meio da metodologia TCID<sub>50</sub> e cálculos descritos por Spearman & Karber é determinado o percentual virucida do produto, expresso em log<sub>10</sub> de redução.

- h) Recuperação da solução viral (Controle Positivo ou solução estoque de SARS-CoV-2): Para cada microplaca de 96 poços, advinda dos ensaios de quantificação do percentual de inativação viral ocorre a determinação do título viral individual de cada ensaio, em que é analisado após tempos de contato da solução viral com água destilada estéril e posterior realização dos ensaios de TCID<sub>50</sub>. O controle de recuperação viral do presente parecer técnico é apresentado como CV.
- i) Padrão de referência de inativação viral: a solução estoque viral é colocada em contato com Formaldeído a 0,7% v/v.

### 3.1.2 Análise dos resultados

A determinação quantitativa da atividade virucida do produto é realizada de acordo com a metodologia TCID<sub>50</sub> (*Median Tissue Culture Infectious Dose*). O protocolo leva em consideração o cultivo das linhagens de células hospedeiras do vírus – Células Vero ATCC ® CCL-81™ em microplacas de cultura de 96 poços com posterior neutralização da solução viral e do possível composto virucida a ser analisado.

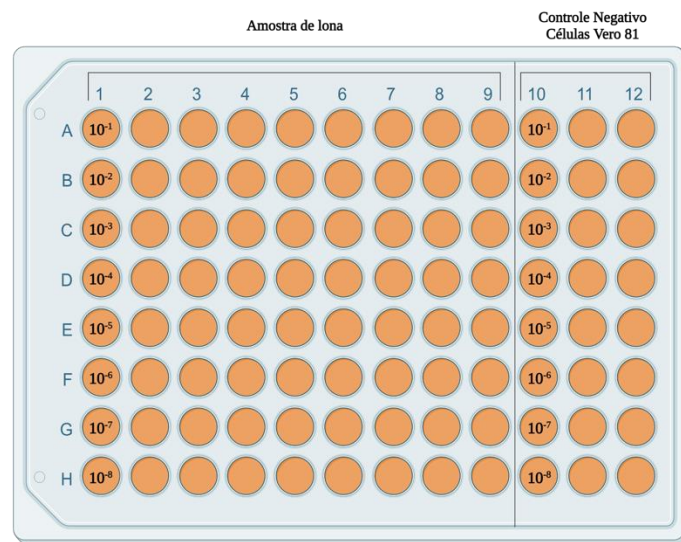
Para avaliação do efeito citopático, são realizadas análises por meio de microscópio invertido após um período de incubação de 72 horas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Dessa maneira, obtêm-se uma confirmação visual do efeito citopático das linhagens de SARS-CoV-2 em relação a célula Vero ATCC ® CCL-81™. A interpretação é baseada no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973). Sendo que o resultado da eficácia virucida é dado como negativo quando ocorre a visualização dos efeitos citopáticos e positivo quando não há efeito citopático. Para a determinação da capacidade de inibição viral utiliza-se a diferença logarítmica entre o grupo controle e do grupo com os tratamentos.

**Tabela 1** – Forma de análise numérica de inativação viral.

Log de redução	Fator de redução	Percentual de Inativação
1	10	90%
2	100	99%
3	1.000	99,9%
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%

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

Com intuito de quantificar o título viral obtido no processo de incubação, foi aplicado a metodologia de diluição limite (*end-point-diluition*). A partir dessa metodologia com inoculação de sucessivas diluições crescentes em suspensão viral em células susceptíveis é possível identificar o efeito citopático em 50% das culturas inoculadas. A tabela 1 demonstra o percentual de inativação viral, através do cálculo Reed & Munch *endpoint calculation method* (Reed & Munch, 1938). Foi ainda aplicado o fator de correção relacionado ao volume de diluição do vírus (SARS-CoV-2) utilizado em cada ensaio de TCID<sub>50</sub>. A porcentagem de inativação viral foi calculada com base em análises estatísticas e levando em consideração os volumes da solução viral utilizada, além da aplicação dos fatores de correção, convergindo nos resultados obtidos de titulação viral por TCID<sub>50</sub>/mL.



**Figura 3:** Esquema de placa de titulação: TCID<sub>50</sub> (Median Tissue Culture Infectious Dose), realizado em microplaca de 96 poços, onde, na primeira linha, foram adicionados 9 poços com amostras de vírus pós contato e neutralização com as amostras tratamento.

**3.2 AATCC 100 (American Association of Textile Chemists and Colorists) para determinação de eficácia antimicrobiana e JIS Z 2801:10 (Test for Antimicrobial Activity of Plastics)**

As análises de eficácia antimicrobiana foram realizadas em parceria com o laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Químicas e Biológica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

A metodologia quantitativa de determinação de eficácia antimicrobiana de superfícies porosas é baseada na AATCC 100 (*American Association of Textile Chemists and Colorists*). Nesse ensaio são utilizadas amostras do material têxtil a ser avaliado com 5 cm de diâmetro cortadas com tesoura estéril, sendo adicionados 4 pedaços sobrepostos em dois diferentes frascos estéreis. Enquanto para as análises da JIS Z 2801:10 as amostras são segmentadas em tamanhos padronizadas de 5x5 cm

Para realizações dos ensaios, a bactéria a ser testada (Cepa ATCC) foi previamente semeada em caldo BHI e incubada por 24 horas a 37°C. Em seguida, uma suspensão bacteriana (inóculo) foi preparada em solução de NaCl 0,9% estéril de modo a obter uma turbidez óptica comparável à solução padrão 0,5 da escala McFarland (correspondente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para se obter um inóculo entre  $1 - 2 \times 10^5$  UFC/mL, 10 µL da suspensão bacteriana padronizada com a escala 0,5 de McFarland foi adicionada em 9,99 mL de solução de NaCl 0,9% estéril. Após isso, 0,4 mL dessa suspensão do inóculo com concentração de  $1 - 2 \times 10^5$  UFC/mL foi aplicada na superfície de teste em placas de Petri estéreis. As placas foram identificadas como 0h (tempo zero), e 24h. As amostras identificadas como 0h, foram transferidas para tubos falcon estéreis, aos quais foi adicionado 1 mL de solução de NaCl 0,9% e agitados em vortex. Na sequência o volume de 0,1 mL foi espalhado na superfície de ágar BHI para recuperação de *S. aureus* e MacConkey para recuperação de *E. coli*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e as UFC/mL foram determinadas. Em seguida, as placas de Petri com amostras de 0h e 24h foram colocadas em câmara úmida e incubadas por 0 e 24 horas, respectivamente, a 35°C e posteriormente, os mesmos procedimentos citados acima foram mais uma vez realizados para recuperação e contagem das bactérias das placas de 0h e 24h.

Em relação a metodologia JIS Z 2801:2010 o procedimento de obtenção do inóculo é o mesmo. Nota-se mudanças na exposição do inóculo ao material teste: o inóculo é coberto com um pedaço de filme para espalhar e manter o inóculo na superfície a ser

testada. As placas são identificadas como 0h (tempo zero) e 24h. Nas amostras identificadas como 0h, é pipetado 1 mL de solução de NaCl 0,9% estéril, que será adicionada diretamente na região entre a superfície teste e o filme, onde se encontra o inóculo. Com a ajuda de uma alça de vidro Drigalski, formato em L, estéril, o corpo de prova bem como o inóculo e o filme de cobertura foram homogeneizados para retirar a bactéria teste. Na sequência o volume de 0,1 mL foi espalhado na superfície de ágar MacConkey para recuperação da cepa bacteriana avaliada. Também foi recuperado com ponteira estéril 1mL e adicionado em 9 mL de salina para obtenção da diluição 1:10 e em seguida 1:100, agitados no vórtex durante um minuto, e 100 µL de cada diluição serão plaqueados nas superfícies de ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e as UFC/mL foram determinadas. Em seguida, as placas de Petri com amostras de 24h foram colocadas em câmara úmida e incubadas por 24h a 35°C e posteriormente, os mesmos procedimentos citados acima foram mais uma vez realizados para recuperação e contagem das bactérias das placas de 24h.

O cálculo da eficácia antimicrobiana segue a fórmula a seguir:

$$\text{Redução de bactérias [\%]} = \frac{\log[\text{UFC}]_{0\text{horas}} - \log[\text{UFC}]_{24\text{ horas}}}{\text{Log} [\text{UFC}]_{0\text{horas}}} \times 100$$

A eficácia antimicrobiana é reconhecida quando ao menos 2 logs de redução é visualizado (99% de redução).

### **3.3 Padronização da 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)**

Nessa metodologia é permitido avaliar a eficácia virucida de produtos como cosméticos, higienizadores de mãos, antissépticos, saneantes e desinfetantes de superfícies, os quais, em sua grande maioria necessitam de uma diluição prévia, a fim de mimetizar a aplicabilidade final e reduzir impactos de citotoxicidade, o que interfere na interpretação dos resultados. Uma vez que esses produtos são expostos à solução viral nesta concentra-

ção prossegue-se a realização do ensaio de determinação do percentual de inativação viral. Posterior a exposição, ocorre a neutralização para inativação de quaisquer efeitos virucidas residuais, a solução é diluída para entrar em contato com as células em concentração a ser definida (valor determinado por ensaio de CMNT – Concentração Máxima Não Tóxica). A solução segue a diluição seriada e o título viral é determinado em microplacas de 96 poços por meio da metodologia *Median Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub>* (TCID<sub>50</sub>).

### **3.3.1 Verificação da metodologia EN14476:**

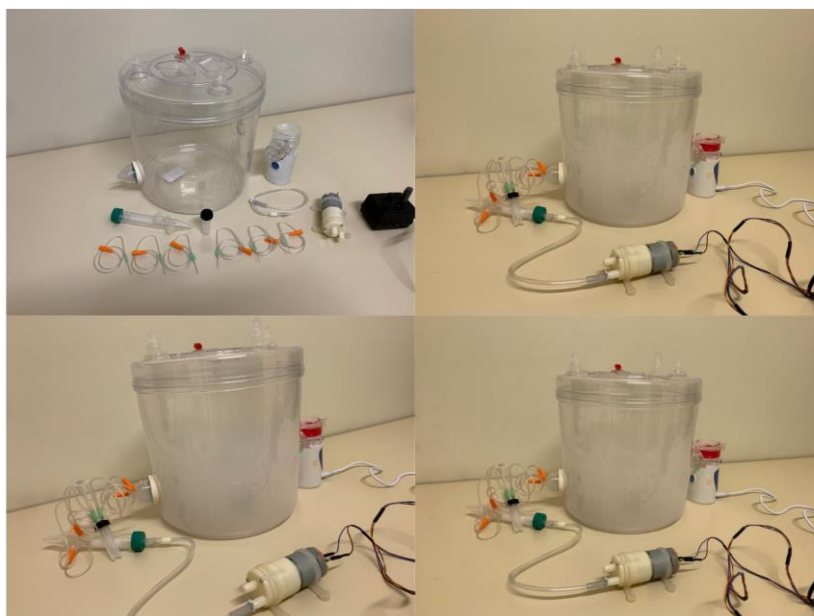
**O teste é considerado válido seguindo os critérios a seguir:**

- Título viral: O título da solução viral de SARS-CoV-2 (variante Delta) é de aproximadamente  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ mL, suficientemente elevado para identificação de ao menos 4 logs de redução de título viral após exposição ao produto teste.
- Controle de Citotoxicidade: A concentração do produto testado não afetou a morfologia e crescimento celular.
- Neutralização: Para supressão da atividade do produto é adicionado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 2% v/v Soro Fetal Bovino a 4°C.
- Exposição da solução viral com o produto teste: A solução viral de SARS-CoV-2 (variante Delta) é adicionada de modo que mantenha a concentração final do produto teste e então a mistura é neutralizada após o tempo de contato estipulado. O título viral é mensurado após a neutralização, além de ser comparado a eficácia da neutralização.
- Exposição da solução viral com controle interno: Um controle interno, não virucida (PBS), é adicionado à solução viral de SARS-CoV-2 (variante Delta), após neutralização o título viral é mensurado pela metodologia TCID<sub>50</sub>.
- Recuperação da solução viral em contato com o produto teste: A determinação da inativação viral e eficácia do possível produto virucida é realizada a partir de modo quantitativo em logs de redução do título viral após a exposição da solução viral ao produto nos tempos de contato estipulados.
- Recuperação da solução viral – controle branco: O título viral é analisado após tempo de contato da solução viral com tampão fosfato-salino (PBS).

- Controle de inativação viral: A solução viral é exposta a 0,7% v/v de formaldeído e então neutralizado, sendo a mistura recuperada para determinação do título viral por TCID<sub>50</sub>.

### 3.4 Prototipagem de equipamento de bioaerrosolização AirV ®

A tecnologia AirV ® baseia-se na nebulização da solução viral dentro do sistema hermético, o qual possui adaptações para acoplar outros equipamentos, como geradores de ozônio, geradores de íon e lâmpadas de UV-C. O funcionamento é pautado na nebulização da solução viral de SARS-CoV-2 até saturar o sistema (verificar uma névoa preenchendo todo o sistema), posteriormente ocorre a recirculação do ar dentro do sistema construído, no qual, o fluxo das micro gotículas geradas será destinado fora da câmara de ensaios para um conjunto de válvulas de passagem para passar através de um canal de derivação até um coletor, ressuspensando o conteúdo do ar nebulizado em um amostrador biológico (figura 4 ). Destaca-se que a prototipagem do sistema de coleta de bioaerossóis permite análise da atividade biológica das partículas durante e após a coleta.



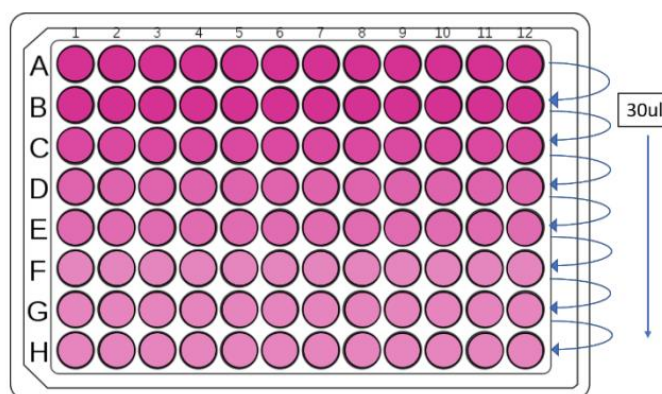
**Figura 4:** Uma visão geral ilustrativa de funcionamento do primeiro protótipo AirV.

### **3.4.1 Modo de funcionamento e metodologia de quantificação de título viral após a nebulização**

#### **Materiais necessários**

- Sistema AirV contendo câmara hermética, bomba à vácuo e aparelho nebulizador;
- 3 Scalps 19G descartáveis para conexão de *Air Sampler* e bomba à vácuo (reutilizável em mesmo experimento);
- 3 Scalps 19G descartáveis para conexão de Filtro e *Air Sampler* por amostra analisada;
- Meio de cultura DMEM 2% SFB;
- Tubos Falcon; - Tubo Criogênico de 2ml (*Air Sampler*);
- Borracha de seringa de 10ml;

O ensaio de nebulização exige um volume elevado da solução estoque de vírus, desse modo, recomenda-se diluir a solução viral estoque a uma concentração 1/10 (ex: 800µl vírus + 7200µl DMEM 2% SFB). Com o sistema montado, adiciona-se o estoque viral no aparelho nebulizador e iniciar processo de nebulização durante 20 segundos para saturação do sistema com posterior acionamento da bomba à vácuo concomitante ao processo de nebulização durante mais 1 minuto. Posteriormente, desliga-se o aparelho nebulizador, desacoplando a bomba à vácuo e filtro da câmara hermética. Filtros são acoplados nas extremidades da bomba, para permitir a recuperação de partículas retidas, os filtros são inseridos em falcon de 50ml. Com a bomba ainda acionada, lava-se os canalículos do sistema de sucção com 1ml de DMEM 2% SFB neutralizando o conteúdo recuperado no *Air Sampler* com mais 8ml de DMEM 2% SFB (totalizando um volume de 9mL utilizado na neutralização, etapa fundamental para inativar qualquer reação de inativação advinda de contato com agentes virucidas). Após neutralizar a amostra de filtro com 9ml de DMEM 2% com o tempo de contato definido, agita-se os *falcons* em vórtex por 15 segundos para homogeneização e obtém-se volume suficiente para prosseguir com a titulação viral pela metodologia de TCID50. Por fim ocorre a transferência de 270µl das amostras virais recuperadas em suspensão para a primeira linha da microplaca de 96 poços de fundo redondo, prosseguindo com uma diluição em série (figura 5).



**Figura 5:** Ilustração de diluição em série da solução viral, conforme metodologia TCID50.

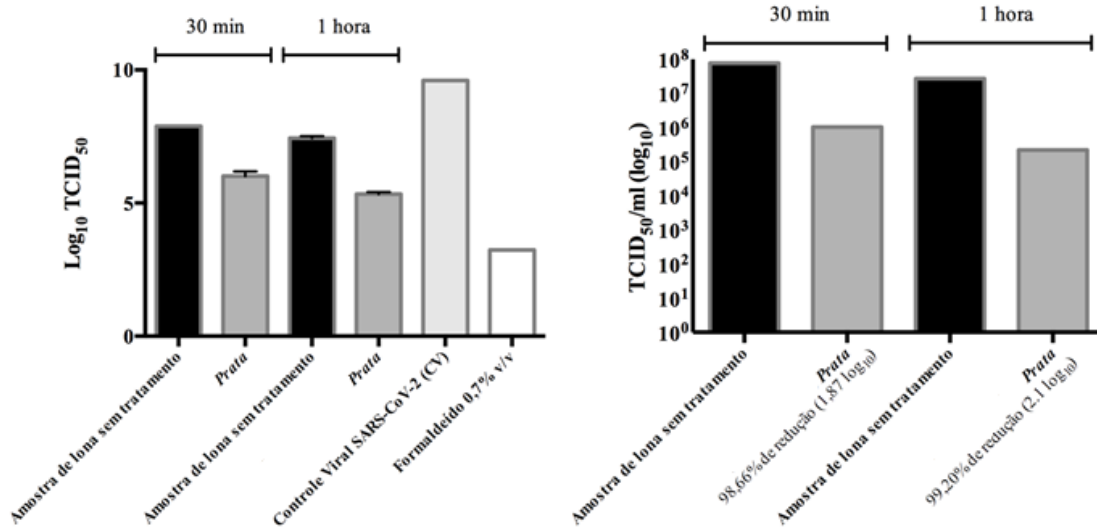
#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados elucidados para avaliação de eficácia virucida advém de diferentes produtos, contendo aditivos e tecnologias com potencial virucida e antimicrobiano de fornecedores e empresas distintas, não podendo assimilar os resultados com metodologias distintas. Em sua maioria, os produtos contam com um embasamento tecnológico em nanopartículas de prata, sintetizadas por diferentes empresas, se distinguindo entre cada produto avaliado.

##### **4.1 Eficácia virucida de superfície plástica tratada com nanopartículas de prata contra o vírus SARS-CoV-2**

Amostras de plástico com tratamento (nanopartículas de Prata) e sem tratamento foram avaliadas para determinar a capacidade de inativação de partículas de SARS-CoV-2, de acordo com a ISO 21702:2019. No procedimento experimental realizado quantificase a redução de partículas de SARS-CoV-2 após 30 minutos e 1 hora de contato das amostras de lona (com a presença do composto ativo) e amostras sem tratamento (branco).

**Gráfico 1:** Representação gráfica do título viral ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>) após 30 minutos e 1 hora de contato de amostras de plásticos tratadas em relação a amostras sem tratamento (segundo recuperação viral da solução estoque de SARS-CoV-2)



**Tabela 2:** Determinação do percentual de inativação de SARS-CoV-2 e logs de redução baseados no método de TCID<sub>50</sub>. Valores representados de acordo com a média de três replicatas para cada corpo de prova (material tratado e sem tratamento) em 30 minutos e 1 hora de exposição.

<b>ISO 21702:2019 Measurement of antiviral activity on plastics and Other non-porous surfaces</b>			
<b>Determinação da ação virucida de amostras plásticas com nanopartículas de prata (nome do produto restrito por conter informações confidenciais) contra o SARS-CoV-2</b>			
<b>30 minutos de tempo de contato</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> ± K (95%)<sup>1</sup></b>	<b>Log<sub>10</sub> de redução</b>	<b>Inativação Viral</b>
<b>Controle de Recuperação Viral (SARS-CoV-2) sem amostra (CV)</b>	9,6 ± 0		
<b>Amostras de lona sem tratamento</b>	7,89 ± 0	-	-
<b>Amostra plástica com nanopartículas de prata</b>	6,01 ± 0,17	1,87	<b>98,66%</b>
<b>1 hora de tempo de contato</b>			
<b>Amostras de lona sem tratamento</b>	7,44 ± 0,07	-	-
<b>Amostra plástica com nanopartículas de prata</b>	5,34 ± 0,07	2,1	<b>99,20%</b>
<b>&gt;15 minutos de tempo de contato</b>			
<b>Controle de Inativação Viral (Formaldeído 0,7% v/v)</b>	3,24 ± 0	6,36	<b>99,99996%</b>

<sup>1</sup>= Cálculo do título viral em log<sub>10</sub> TICD50 em um intervalo de confiança de 95% de acordo com a ISO21702

Em comparação com as amostras sem tratamento, as amostras plásticas com tratamento (nanopartículas de prata) apresentaram 1,87 log10 de redução (tabela 1), reduzindo o número de partículas viáveis de SARS-CoV-2 em 98,66%, após 30 minutos de exposição. Durante 1 hora de contato, as amostras apresentaram redução de 2,1 log10, inativando 99,20% de partículas viáveis de SARS-CoV-2.

#### 4.2 Eficácia virucida de superfície têxtil tratada com nanopartículas de prata contra o vírus SARS-CoV-2

O experimento foi realizado de acordo com a ISO 18184:2019 para quantificação da redução de partículas de SARS-CoV-2 após 1 hora de contato das amostras porosas (amostras de mantas F95) tratadas (com a presença do composto ativo) e amostras porosas sem tratamento. Os corpos de prova porosos recebidos foram segmentados em dois fragmentos de aproximadamente 20x20 mm, totalizando 0,4g (0,2g cada fragmento). Foram acondicionadas individualmente em tubos Falcon, com posterior inoculação da solução viral durante o tempo de exposição e homogeneização. Após o tempo de exposição, ocorre a neutralização, diluição em série e o título viral é determinado em microplacas de 96 poços por meio da metodologia *Tissue Culture Infectious Dose50* (TCID50).

**Tabela 3** : Descrição técnica do material poroso

Tipo de Manta Filtrante	Gramatura (g/100cm <sup>2</sup> )	Espessura (mm)	Classe de Eficiência (norma ASHRAE 52-76)
F-95	1,6 ± 0,4	7,3 ± 0,6	G1

Em comparação com as amostras da manta F95 sem aplicação do composto ativo virucida (informações confidenciais do fornecedor), as amostras F95 + *composto ativo*, em 1 hora de exposição, apresentaram 3 logs de redução (tabela 4), o que indica uma porcentagem de inativação de 99,9% de partículas virais de SARS-CoV-2, *in vitro*.

**Tabela 4:** Determinação do percentual de inativação de SARS-CoV-2 e logs de redução baseados no método de TCID<sub>50</sub>. Valores representados de acordo com a média de três replicatas para cada corpo de prova (material tratado e sem tratamento) em 1 hora de exposição.

<b>ISO 18184:2019 Determination of antiviral activity of textile products</b>			
<b>Determinação da ação virucida de amostra de filtro F95 + + composto ativo virucida (informações confidenciais do fornecedor) 7 contra o SARS-CoV-2</b>			
<b>1 hora de tempo de contato</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Log TCID<sub>50</sub>/mL<sup>1</sup></b>	<b>Log<sub>10</sub> de redução</b>	<b>Inativação Viral (%)</b>
Controle de Recuperação Viral (SARS-CoV-2) (CV)	6,45 ± 0,18		
Amostra de <i>filtro F95</i> sem tratamento	5,9 ± 0	-	-
Amostra <i>F95</i> + composto ativo virucida (informações confidenciais do fornecedor)	2,9 ± 0	3	<b>99,9%</b>

<sup>1</sup>= Cálculo do título viral em log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> em um intervalo de confiança de 95% de acordo com a ISO18184

### **4.3 Ensaio de determinação de eficácia antimicrobiana Norma JIS Z 2801 e Norma AATCC 100**

Avaliação da ação antimicrobiana de superfícies tratadas com aditivo antimicrobiano sobre *Escherichia coli* ATCC 35218 – Bacilos Gram-negativos ao longo do tempo de contato.

**Tabela 5:** Descrição das amostras teste para validação de eficácia antimicrobiana

---

Amostra A: Superfície não porosa “*Antimicrobiano X*”

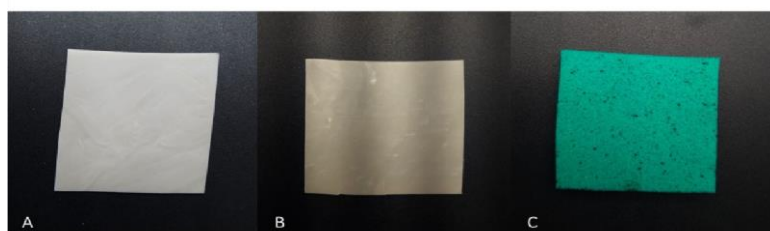
---

Amostra B: Superfície não porosa “*Antimicrobiano Y*”

---

Amostra C: Superfície porosa “*Antimicrobiano Y*”

---



**Figura 6:** Amostras submetidas à avaliação da ação antimicrobiana a) Superfícies de 50mm x 50mm com “Antimicrobiano X” (Norma JIS Z 2801; b) Superfícies de 50mm x 50mm com “Antimicrobiano Y” (Norma JIS Z 2801); c) Superfícies de material esponjoso de 50mm x 50mm com aditivo antimicrobiano “Y” (Norma AATCC 100 ).

Para determinação da eficácia antimicrobiana foram usados os seguintes parâmetros

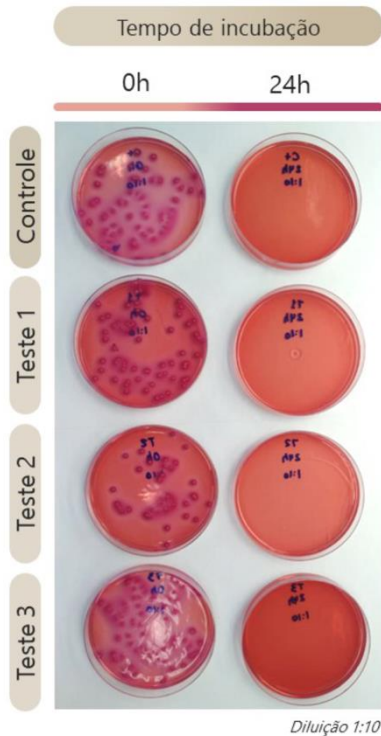
**Controle positivo:** Condições do experimento definidas para garantir o bom funcionamento do método na ausência do produto testado.

**Controle negativo:** Condições do experimento definidas para descartar contaminação externa durante o processo.

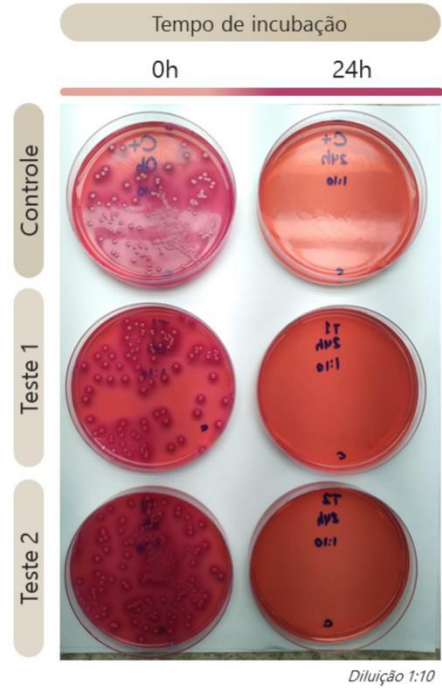
**Tabela 6:** Crescimento bacteriano em Unidades Formadora de Colônias (UFC) por mililitro (UFC/ml) de *Escherichia coli* (ATCC 35218) no tempo zero (0h) e tempo de 24 horas (24h) para as amostras testadas (A, B e C).

<b>Determinação da ação antibacteriana de amostras se superfície A, B e C contra <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)</b>						
<b>Amostra testada</b>	<b>Identificação</b>	<b>Tempo 0h</b>		<b>Tempo 24h</b>		<b>Log<sub>10</sub> de redução de 0 a 24h</b>
		<b>Contagem bactérias (UFC/ml)</b>	<b>Log (UFC/ml)</b>	<b>Contagem bactérias (UFC/ml)</b>	<b>Log (UFC/ml)</b>	
<b>A</b>	Teste*	9x10 <sup>3</sup>	3,95	<1	-	3,95
	Controle (Branco)	4x10 <sup>3</sup>	3,60	<1	-	3,60
	Controle Negativo	0	-	<1	-	-
<b>B</b>	Teste*	7,92x10 <sup>3</sup>	3,90	<1	-	3,90
	Controle (Branco)	7,35x10 <sup>3</sup>	3,87	<1	-	3,87
	Controle Negativo	0	-	<1	-	-
<b>C</b>	Teste*	3,52x10 <sup>3</sup>	3,55	4,06x10 <sup>4</sup>	4,61	-
	Controle Positivo	4,2x10 <sup>3</sup>	3,62	1x10 <sup>5</sup>	5,00	-
	Controle Negativo	0	-	<1	-	-

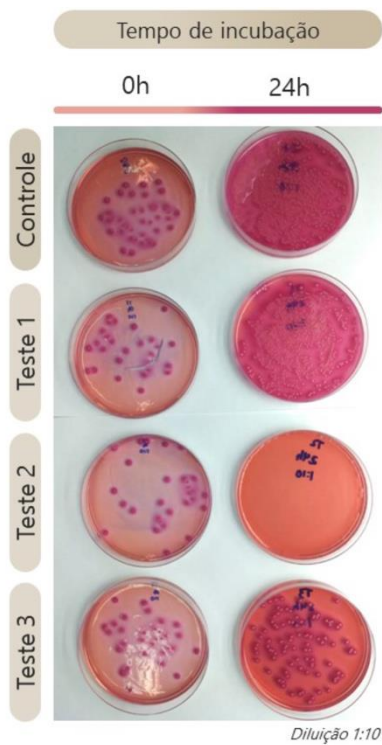
\*Amostra Teste: valor médio da contagem de bactérias recuperadas das duplicatas.



**Figura 7:** Amostra A: Superfícies com e sem “Anti-microbiano X, testes realizados em triplicatas (Teste 1, Teste 2 e Teste 3). Testes realizados com *Escherichia coli* (placas de ágar MacConkey), com leituras realizadas no tempo 0h, e após 24h de contato.



**Figura 8:** Amostra B - Superfícies com e sem anti-microbiano “Y”, testes realizados em duplicatas (Teste 1 e Teste 2) devido a disponibilidade de amostras. Testes realizados com *Escherichia coli* (placas de ágar MacConkey), com leituras realizadas no tempo 0h, e após 24h de contato.



**Figura 9:** Amostra C; Teste AATCC 100 realizado com *Escherichia coli* (placas de ágar MacConkey) com leituras realizadas no tempo 0h, e após 24h de contato. Superfícies de material esponjoso “Y”, com e sem aditivo antimicrobiano. Testes realizados em triplicatas (Teste 1, Teste 2 e Teste 3).

#### 4.4 Avaliação de eficácia virucida de antisséptico bucal contra o vírus SARS-CoV-2 de acordo com a EN 14476

Foi realizado o ensaio de determinação da Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT) do produto antes de iniciada a metodologia TCID<sub>50</sub>. O produto foi colocado em contato com as células e não apresentou toxicidade celular a partir de uma diluição 1:10.000 do produto antisséptico bucal.

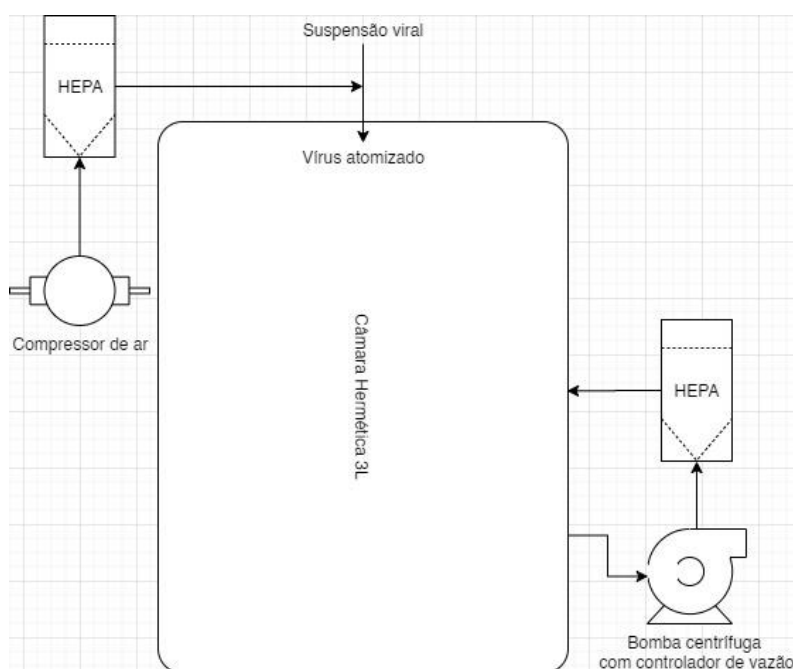
O ensaio de determinação do percentual de inativação viral do produto teste, então, foi realizado em 30 segundos e 2 minutos de contato. No momento da neutralização, o composto foi então diluído a uma concentração 1:10.000, na qual não apresentou citotoxicidade na linhagem celular utilizada no experimento. Depois de realizada a metodologia, os seguintes dados sobre a capacidade virucida do produto teste antisséptico:

**Tabela 7:** Determinação do percentual de inativação de SARS-CoV-2 (variante Delta) e logs de redução baseados no método de TCID<sub>50</sub>. Valores representados de acordo com a média de três replicatas para cada corpo de prova, comparando o material com tratamento ao tampão fosfato-salino (PBS) em 30 segundos e 2 horas de exposição.

<b>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/Step1)</b>			
Determinação da ação virucida do produto <i>Gel Dental Phtalox</i> contra o SARS-CoV-2 (variante Delta)			
<b>30 segundos de tempo de contato</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub></b>	<b>Log<sub>10</sub> de redução</b>	<b>Inativação Viral</b>
Líquido <b>sem</b> tratamento (PBS) + SARS-CoV-2	6,6		
<i>Gel Dental Phtalox</i> + SARS-CoV-2	0,7	5,9	<b>99,99987%</b>
<b>2 minutos de tempo de contato</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub></b>	<b>Log<sub>10</sub> de redução</b>	<b>Inativação Viral</b>
Líquido <b>sem</b> tratamento (PBS) + SARS-CoV-2	6,6		
<i>Gel Dental Phtalox</i> + SARS-CoV-2	0,7	5,9	<b>99,99987%</b>
<b>30 segundos e 2 minutos de tempo de contato</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub></b>	<b>Log<sub>10</sub> de redução</b>	<b>Inativação Viral</b>
Controle de Recuperação Viral (SARS-CoV-2)	6,7		
Controle de Inativação Viral (Formaldeído) + SARS-CoV-2	-	> 6,0	>99,9999%

#### 4.5 Eficácia de bioaerrosolização do AirV<sup>®</sup> em comparação com sistema NIOSH do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

A prototipação deste equipamento deu-se através de delineamento por metodologia *Stage-gates* em que são definidas etapas até a obtenção da prova de conceito (POC) e Mínimo Produto Viável (MVP). As etapas do desenvolvimento foram: i. Mapeamento de demanda reprimida do mercado; ii. Construção do protótipo inicial; iii. Verificação da reprodutibilidade e sensibilidade de amostragem iv. Desenho técnico e manufatura completa. O equipamento foi construído conforme desenho técnico mostrado em figura 5. A bomba centrífuga é acoplada ao controlador de vazão, atingindo limite de 0,5L/min. O filtro HEPA (0,22 µm) tem função de captação e amostragem de partículas microbiológicas do ar. Os resultados da eficácia do nosso protótipo foram comparados com um equipamento similar – NIOSH Biosampler, cedido por parceria com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).



**Figura 10:** Desenho técnico de equipamento para atomização e amostragem de ar.

O primeiro desafio foi a padronização do tempo ideal antes e durante a amostragem e funcionamento da bomba. Para isto, fixou-se o número de cópias virais atomizada e variou-se os tempos anteriores e de amostragem (tabelas 8 e 9). A cada experimento, relatou-se uma decisão chave para os próximos passos da execução. O passo seguinte foi

estabelecer se a colocação de aeração por ventoinha aumentaria a reprodutibilidade do conteúdo amostrado, evitando deposição das partículas ao fundo da câmara hermética.

**Tabela 8:** Variação de tempos anteriores à amostragem do conteúdo interno.

Ensaio	Tempo anterior à amostragem (min)	Tempo de amostragem (min)	Volume amostrado (L)	Carga Viral log <sub>10</sub> (cópias/mL)
<b>Amostra atomizada</b>	-	-	-	3,630
<b>1</b>	1	1	0,5	1,296
<b>2</b>	5	1	0,5	1,565
<b>3</b>	10	1	0,5	Não detectado
<b>Decisão-chave</b>	<b>Manter o tempo anterior à amostragem em 1 minuto</b>			

**Tabela 9:** Variação de tempo de amostragem, isto é, funcionamento da bomba.

Ensaio	Tempo anterior à amostragem (min)	Tempo de amostragem (min)	Volume amostrado (L)	Carga Viral log <sub>10</sub> (cópias/mL)
<b>Amostra atomizada</b>	-	-	-	3,630
<b>1</b>	1	1	0,5	1,396
<b>2</b>	1	6	3	1,465
<b>Decisão-chave</b>	<b>Manter tempo de amostragem em 6 minutos</b>			

**Tabela 10:** Comparação de amostragem em cenário com e sem aeração por ventoinha.

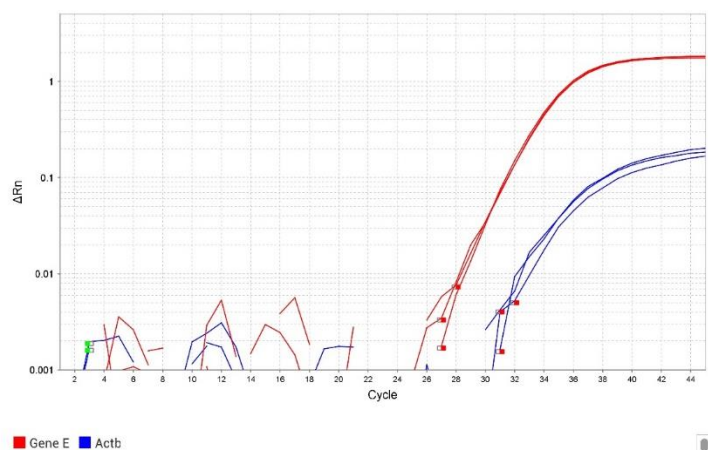
Ensaio	Tempo anterior à amostragem (min)	Volume amostrado (L)	Carga Viral log <sub>10</sub> (cópias/mL)
Amostra atomizada	-	-	3,630
Com aeração	1	3	1,56
Sem aeração	1	3	1,57
Decisão-chave	Manter sem aeração		

**Tabela 11:** Comparação entre a eficiência de captação de partículas virais no ar entre AirV e CDC NIOSH Biosampler.

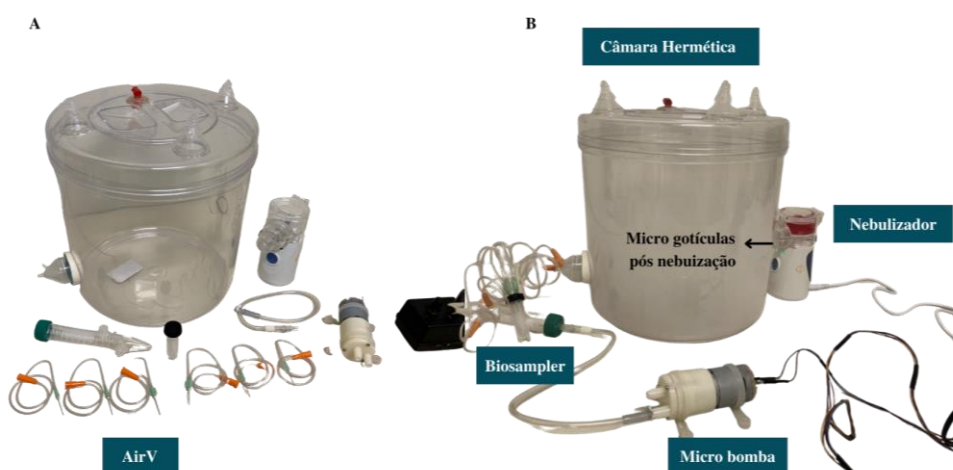
Ensaio	Carga Viral RT-qPCR (cópias/mL)	Quantidade de vírus totais (cópias)	Volume de ar amostrado (L)	Cópias por litro de ar (cópias/L)	Eficiência de captação
Input	4.10 <sup>3</sup>	1,6.10 <sup>3</sup>	-	-	-
Captação média AirV	36	14,4	3	28,8	0,9%
Captação da literatura CDC*	-	2,2.10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	3,5.10 <sup>4</sup>	1,5%

Legenda: \*dados obtidos de (G. CAO; , F. M. BLACHERE, W. G. LINDSLEY, 2016)

Após otimização de todos estes parâmetros, obteve-se triplicata perfeita de amostragem, revelada por RT-qPCR de dois genes: ACTB (linha azul) e Gene E (linha vermelha), visto em gráfico 2. Ao final da prototipagem e ensaios de viabilidade tecnológica obtivemos o modelo AirV (figura 11). Considera-se que em níveis de prontidão da tecnologia (*Technology Readiness Level – TRL*) a tecnologia AirV descrita estaria em TRL 5, de modo que para aproximarmos de simulações que mimetizem ambientes tão próximos quanto ao contexto real precisaríamos passar por uma nova prototipagem e adequação de parâmetros técnicos do equipamento, atingindo um novo protótipo funcional.



**Gráfico 2:** triplicata perfeita, em RT-qPCR, de amostragem após atomização, revelando-se boa reprodutibilidade do equipamento. Legenda: Eixo horizontal: ciclo de quantificação de RT-qPCR; Eixo vertical: detecção de fluorescência de sonda.



**Figura 11:** AirV visão representativa de componentes e funcionamento. A) Ilustração geral de todos os componentes para funcionamento do equipamento. B) demonstração de AirV em funcionamento com geração de micro gotículas por meio de nebulizador e sistema de alíquota da amostra nebulizada por meio de *biosampler*.

#### 4.6 Validação de mercado virucida em campo

Após a identificação da oportunidade mercadológica no modelo de atuação de prestação de serviços de P&D, envolvendo desenvolvimento e validação de eficácia virucida e antimicrobiana de produtos foi possível atingir a padronização de etapas operacionais e metodológicas mais consolidadas.

A validação de mercado baseou-se na prospecção e mapeamento de mercado atuante dentro da startup Crop Biolabs, com contatações de 173 possíveis clientes, sendo que destes 54 avançaram para uma etapa de diagnóstico de projeto, etapa onde busca-se entender como de fato é possível sanar a dor do cliente, e destes, 13 contratos fechados com empresas distintas dos mais diversos segmentos de mercado já citados. É válido ressaltar também que, dentro destes projetos, 5 clientes se interessaram e contrataram o serviço com o protótipo operante do *AirV*.

Para realização destes mapeamentos, foi desenhado um perfil de cliente ideal (*Ideal Customer Profile*) baseado nos dados de clientes que se interessavam pelos serviços da Crop, ao longo das reuniões de diagnóstico foi adquirido informações específicas mapear quais clientes tinham maior propensão em fechar um contrato, e a partir de dados como região, cargo, porte da empresa, objeções compartilhadas e qual a real necessidade do cliente pelo nosso projeto. Com este tipo de coleta de dados foi possível observar que a dor mais latente dentro deste mercado é guiada pelo apelo comercial dos produtos, no sentido de poderem divulgar em campanhas de marketing e em *claims* rotulados em seus produtos, a capacidade de inativação do vírus da COVID-19 como o diferencial competitivo.

Com um número amostral de diagnóstico crescente, mais dores de mercado puderam ser levantadas, fazendo com que os moldes do serviço fossem repensados para empresas que tivessem dores distintas, que precisassem de análises mais enxutas, por estarem com seu produto em estágios iniciais de pesquisa e desenvolvimento, ou até mesmo que precisassem de análises lote a lote.

O processo de validação do mercado continua dentro da empresa como algo constantemente monitorado e repensado, sendo este considerado como o principal propulsor de novas ideias e de identificação de novas oportunidades para nos mantermos competitivo dentro deste mercado emergente.

#### **4.6.1 Segmentos Alvo de Mercado**

A análise de segmento de mercado feita pela Crop foi feita levando em conta três princípios de mercado: Indústrias Alvo e Perfil de Cliente Ideal (ICP). As principais indústrias atendidas são: Indústrias de Cosméticos, Saneantes e Desinfetantes; Equipamentos de Purificação de Ar e Sanitização (UV-C; Ozonizadores, Filtros); Indústria de Nano compósitos e Nanotecnologia. Importante ressaltar que os terceiros envolvidos nas cadeias de valor destas indústrias citadas com frequência se apresentam como potenciais clientes.

No processo de vendas desenhado foi priorizado a qualidade dos *leads* ao invés da quantidade, com o único objetivo de não ocuparmos tempo de nossa equipe com reuniões de diagnóstico com leads que possuam baixas chances de sucesso. Para isso ter um guia dos principais clientes possam fechar contrato conosco foi estruturado.

O perfil ideal de cliente que hoje a Crop visa atingir pôde ser definido a partir de uma análise do histórico de todos os clientes que já foram contatados, analisando alguns parâmetros específicos daqueles que ganharam maiores pontuações dentro da estratégia de *Lead Score*. A estratégia de *Lead Score* basicamente serve como um termômetro para sabermos o quão próximo ou o quão distante de ser um cliente em potencial está aquele *lead*. Com o levantamento de dados realizado, foi possível traçar o que hoje guia os esforços dedicados a prospecção *outbound* e *inbound*, detalhando os principais critérios de sucesso quando em contato com o mercado.

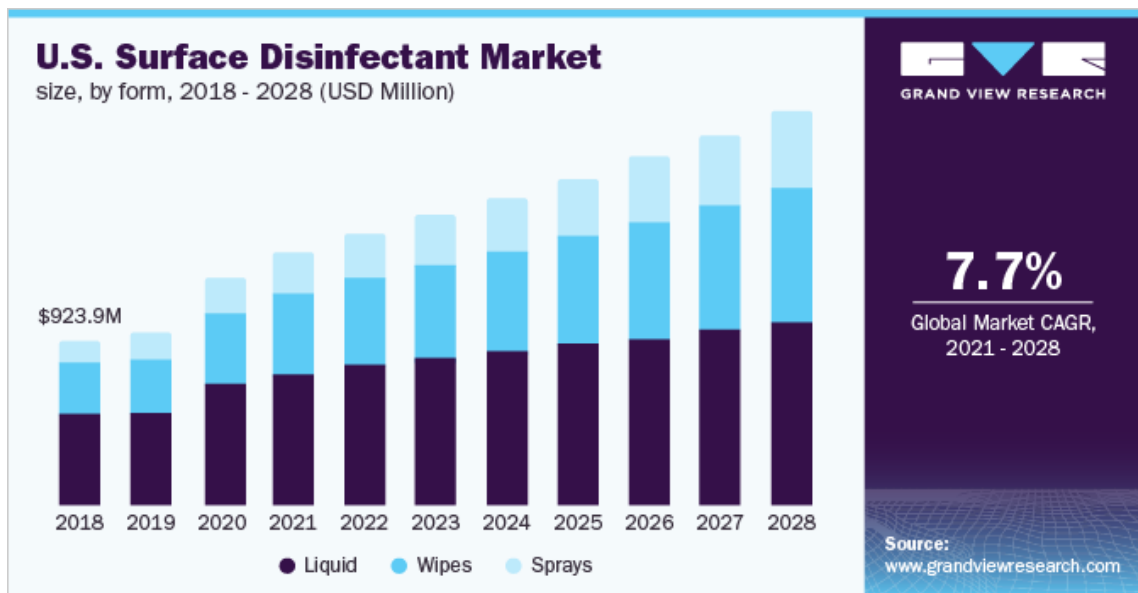
**Tabela 12:** Perfil de Cliente Ideal

<i>Ideal Customer Profile (ICP)</i>	
<b>Porte da empresa</b>	Médias e Grandes Empresas – que já possuam maturidade em investimentos em P&D.
<b>Faturamento ano</b>	1MM – 10MM / ano
<b>Necessidades latentes</b>	<i>Claim</i> virucida no rótulo do produto para estratégias de marketing; Análise exploratória para desenvolvimento e validação de produtos; Controle de qualidade lote a lote;
<b>Cargo</b>	Gerentes e Diretores nos departamentos de <b>qualidade</b> , pesquisa e desenvolvimento inovação, científico e comercial
<b>Visão do Sucesso</b>	Promoção de ações de marketing que promovam receita; Validação perante órgãos regulatórios;
<b>Região</b>	Santa Catarina e São Paulo
<b>Normativas mais enquadradas</b>	ISO21702; ISO18184
<b>Ciclo de Vendas (até o fechamento do contrato)</b>	28 dias

Um mercado em validação é o mercado internacional, onde a Crop já teve obtido um contrato bem-sucedido oriundo do Oriente Médio – Dubai, atraindo o interesse por meio do primeiro protótipo desenhado da tecnologia do *AirV*. Ainda é cedo para detalhar um perfil no exterior, porém já estão sendo realizados mapeamentos em alguns países da América Latina, como Chile e Argentina, enxergando menores barreiras de entrada quando comparado aos mercados Norte Americano e Europeu por exemplo, que apresentam não só muito mais concorrentes no mercado, como também, enfrentar a desvalorização para serviços de *Hard Science* criados em território brasileiro.

#### 4.6.2 Análise de oportunidades:

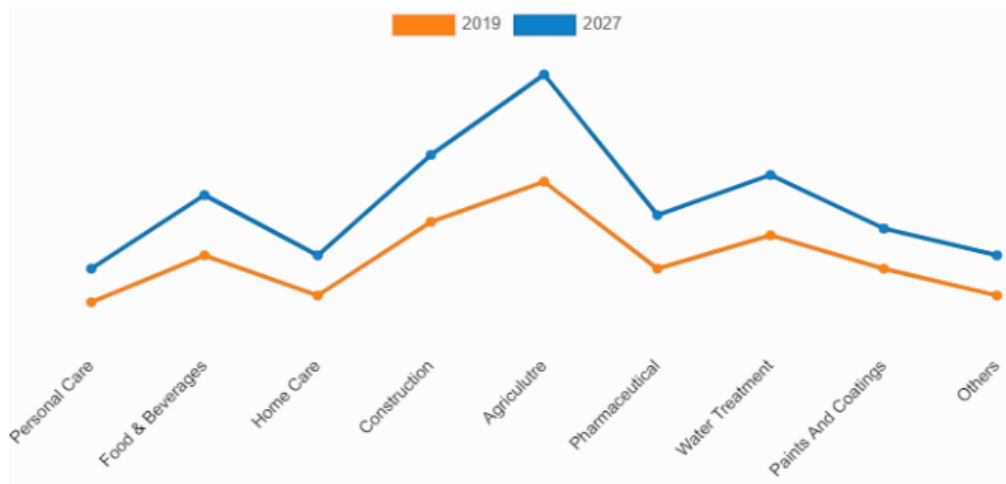
Iniciativas ao redor do mundo passaram a considerar que seus produtos possam conferir algum tipo de característica ou efeito biocida que ao longo da pandemia da COVID-19 mudou o padrão de comportamento deste mercado. O tamanho do mercado global de desinfetantes de superfície foi avaliado em US\$ 4,54 bilhões em 2020 e espera-se que se expanda a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,7% de 2021 a 2028. Estima-se que a demanda seja impulsionada pela crescente prevalência de cuidados de saúde e preocupações com Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) em todo o mundo. O aumento na demanda por desinfetantes, desinfetantes e produtos de limpeza, especialmente no setor de saúde, provavelmente desencadeará o crescimento do mercado.



**Figura 12:** Estimativa de crescimento de mercado do setor de desinfetantes ao redor do mundo (CAGR, 2021).

Paralelamente, pensando em expansão de portfólio e de mercado, é interessante vislumbrar mercados biocidas inseridos em diferentes segmentos. Em 2019, o mercado global de produtos biocidas atingiu o valor de USD 12,7 bilhões e deve atingir os USD 20,7 bilhões até o ano de 2027, registrando uma taxa de crescimento anual composta de cerca de 7% entre os anos de 2020 e 2027 (CAGR, 2021). Dentro desta análise alguns

segmentos se destacam como, por exemplo, o setor agrônômico e a indústria de tratamento de água (Figura 13). No Brasil, a realidade não foi diferente, a pandemia basicamente criou um mercado antes tímido e, até alguns meses atrás, dominado por dois grandes players públicos e um grande player no setor privado.



**Figura 13:** Setores como o de alimentos e bebidas, agricultura e tratamento de água se apresentam como os grandes segmentos que impulsionarão o crescimento do mercado biocida (CAGR, 2021).

#### 4.7 Sistema de Gestão de Projetos

A partir do estabelecimento das metodologias para avaliar a eficácia virucida de produtos contra o SARS-CoV-2 em superfícies e líquidos, testagem no ar ambiente, foi elencado um setor específico pós padronização técnica, denominado *back-end*. A estruturação de um modelo de gestão desses projetos foi realizada na plataforma Asana, a qual visa permitir melhorias no processo e monitoramento de diferentes operações que ocorrem de modo concomitante. Os projetos de avaliação de eficácia virucida que chegam no setor de *back-end* seguem um rigor metodológico e operacional, sendo estratificado em etapas fundamentais (figura 14):

Nome da tarefa	Responsável	Data de conc...	Progresso da...
▼ Cronograma Experimental - Delta			
✓ Recebimento de amostras		13 Out de 2021	Feito
✓ Confirmação de Contrato		16 Fev	Feito
✓ Montagem de microplacas de Cultura Celular		10 Mar	Feito
✓ Ensaio TCID50 (30 segundos e 2 minutos)		14 - 17 Mar	Feito
✓ Redação de Relatório Técnico 3		21 Mar	Feito
✓ Envio de Relatório Técnico		21 Mar	Feito

**Figura 14:** Exemplo de modelo de projeto inserido na plataforma Asana para gestão e monitoramento dos projetos de análises virucidas.

A exemplo das atividades fundamentais que possam identificar sobre o estágio de desenvolvimento de cada projeto e monitorar os riscos associados (figura 14), foi formato alguns indicadores de desempenho. Devido a centralização das informações de prazo no sistema Asana, é possível analisar os dados vinculados com prazos de execução, necessidades de repetições de procedimentos, gastos etc. Desde a implementação do sistema de gestão, 43 projetos foram executados, podendo monitorar os prazos de entrega dos resultados, e assim mensurar o desempenho da equipe científica vinculada aos projetos ( tabela 13).

**Tabela 13:** Dados de número de projetados executados após a padronização metodológica dos ensaios objetivos de estudo do projeto.

Metodologia de ensaio experimental	Produtos totais analisados	Prazo média de execução (dias uteis)
ISO 18184	9	21
ISO 21702	25	23
EN 14476	9	17

Fonte: Crop Biolabs, 2021.

#### 4.7.1 Estruturação de gestão de novos projetos- *Front-end Innovation*

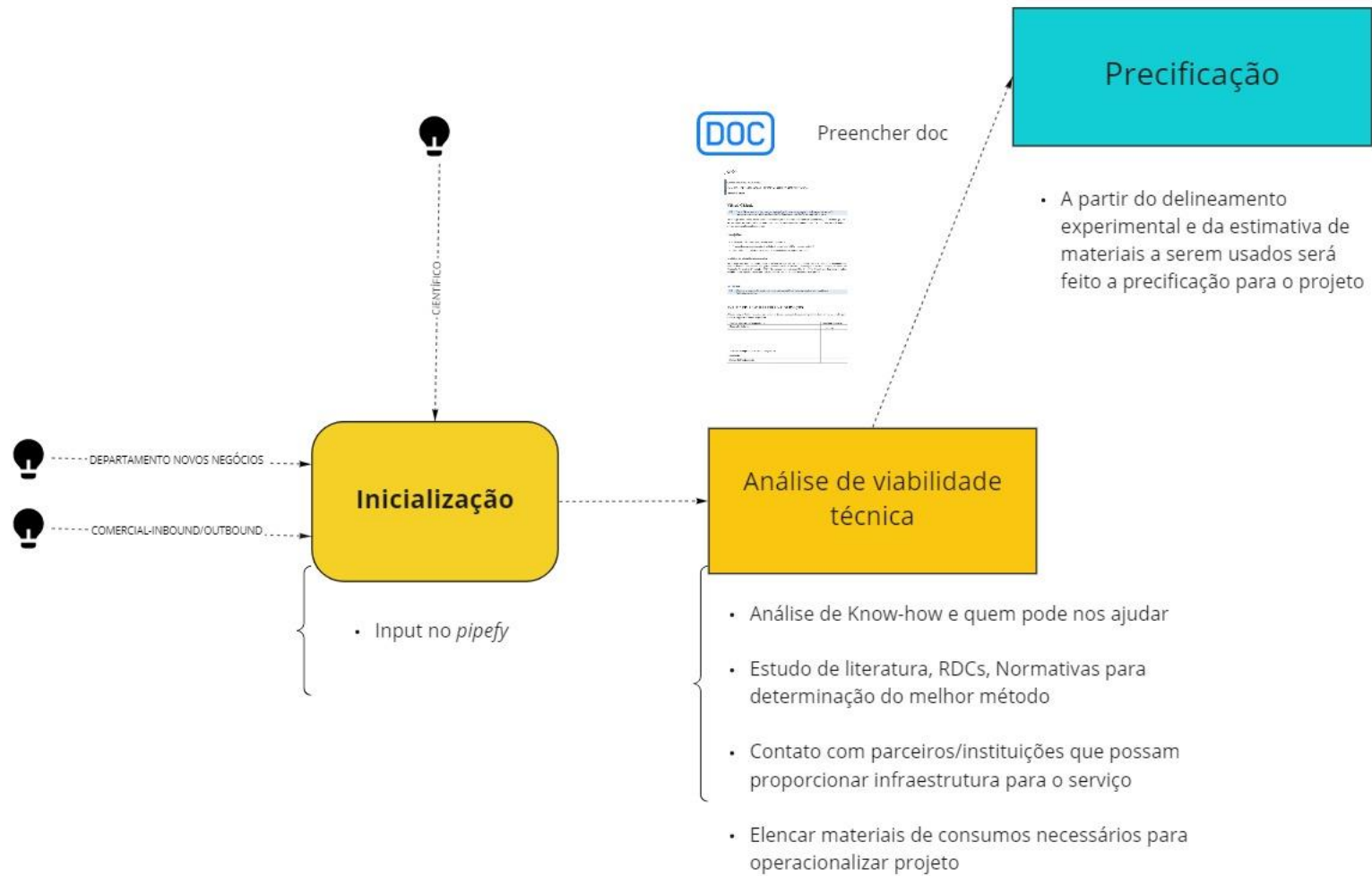
Foi criado um modelo de gestão do fluxo de recebimento de informações técnicas para verificar viabilidade de se executar projetos científicos advindos de demandas prospectadas pelo departamento de novos negócios da Crop, não necessariamente atrelados a validação de produtos de combate a pandemia da COVID-19, mas de projetos de ampliação de portfólio da *startup*. A prospecção de *leads* por parte desse departamento é voltada aos setores de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação das empresas. O *workflow* do processo é monitorado na plataforma *Pipefy*. O *input* para o início da participação da equipe científica na análise de viabilidade ocorre após o departamento de novos negócios realizar uma reunião prévia de coleta de informações e dores das empresas, em que são repassados para o primeiro card do processo, ficando em uma etapa de *backlog*, até que o responsável científico do setor de *front-end* possa iniciar os estudos de viabilidade e planejamento (figura 15). Esse processo, no que se refere ao departamento científico, é atrelado a um colaborador específico para realizar os estudos de viabilidade, enquanto outro, fica responsável pela gestão. Com a implementação desse modelo gestão de novos projetos entre janeiro e fevereiro de 2022, foi possível obter dados sobre os prazos para avaliação de viabilidade técnica de 14 projetos que ainda não estavam padronizados (tabela 13).

**Tabela 14:** Dados de avaliação do processo implementado para avaliar viabilidade técnica de novos projetos entre janeiro e fevereiro de 2022.

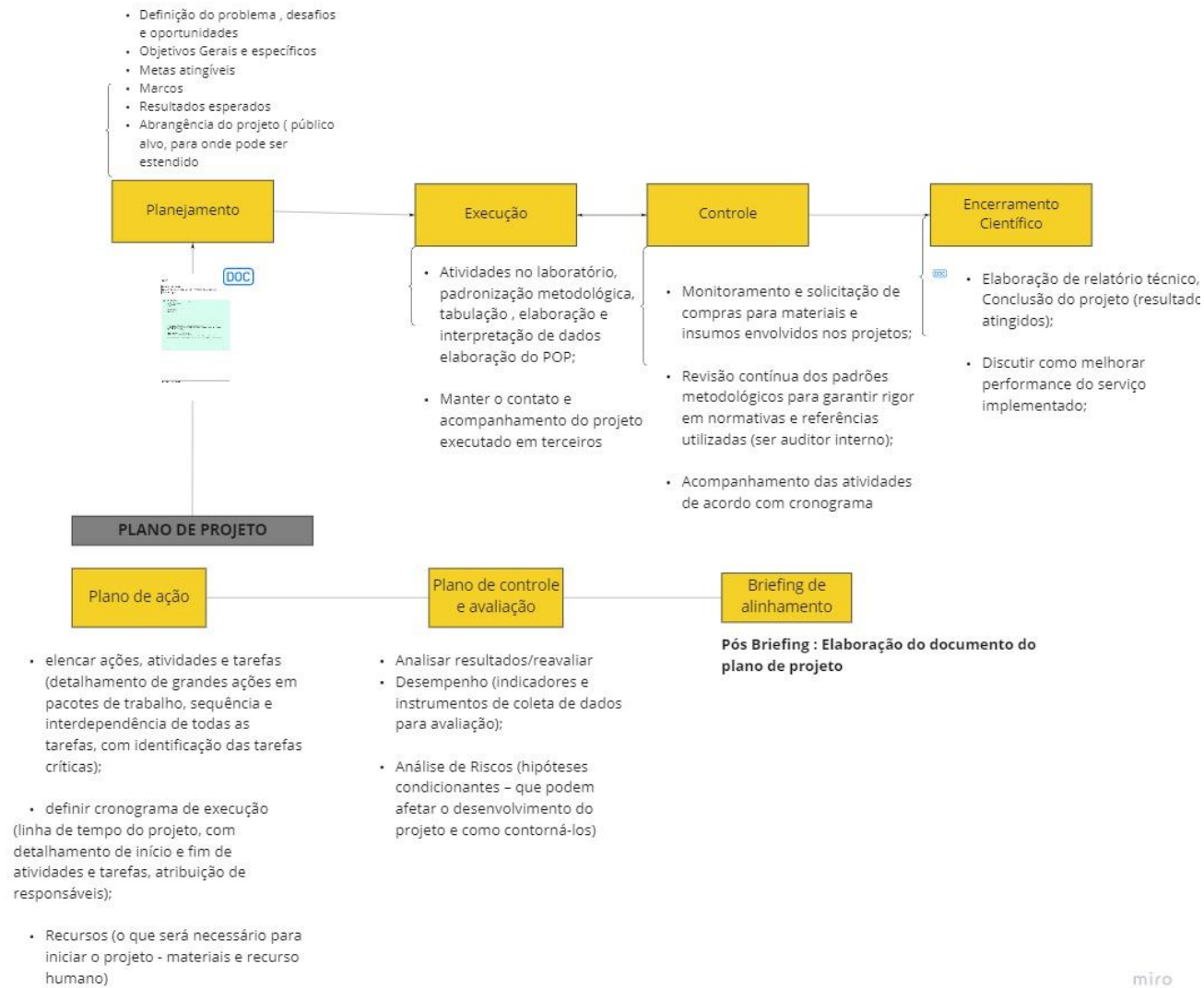
	Número de projetos analisados	Tempo médio para concluir parecer de viabilidade técnica (dias)
<b>Projetos Janeiro 2022</b>	6	11,8
<b>Projetos Fevereiro 2022</b>	8	4,5
<b>Prazo médio de viabilidade técnica de Projetos entre Jan-Fev</b>		6,93

Observa-se que com o mês inicial da implementação dos processos demandou de um prazo maior de execução (11,8 dias) do parecer de viabilidade técnica, no entanto, no mês seguinte, esse prazo tem uma redução de 61,87%, o que pode ser associado com a adesão dos envolvidos nas etapas do processo e o sucesso das adequações de cada operação unitária do modelo de processual.

**Figura 15:** Esboço processual de ações para iniciar as análises de viabilidade técnica de novos projetos, advindos das demandas prospectadas pelo departamento de novos negócios.



**Figura 16:** Estruturação de ações após definir viabilidade técnica de execução de novos projetos aquém dos relacionados com validação de produtos contra vírus.



## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **5.1 Aplicabilidade na prática profissional do produto gerado pela pesquisa**

O presente projeto proporcionou a padronização metodológica de três normativas de respaldo internacional para validação e comprovação de eficácia de produtos com ação contra vírus, favorecendo o portfólio de prestação de serviços da *startup* vinculado ao estudo. A implementação metodológica das normativas de estudo virucida e o sistema de gestão de projetos foi aplicada em 43 projetos executados no ano de 2021 na Crop Biolabs. O desenvolvimento da plataforma para testagem em sistema hermético, mimetizando a transmissibilidade área de patógenos virais, especificamente do SARS-CoV-2, demonstrou-se como um sistema efetivo, comparado ao NIOSH, possibilitando inclusive uma subvenção para um projeto de prototipagem com um modelo de maior escala com aporte concedido pela modalidade do edital PIPE-SEBRAE da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos na padronização metodológica dos procedimentos de avaliação de eficácia virucida de superfícies porosas e não porosas e antissépticos mostraram ser metodologias fidedignas para comprovação de eficácia de produtos, podendo ser um referencial metodológico a ser aplicado no portfólio de serviços vinculados com a *startup* parceira do projeto. Além disso, reforça a importância de oferecer um modelo de validação de produtos contra o SARS-CoV-2, seguindo as diretrizes da NOTA TÉCNICA Nº 20/2021/SEI/COSAN/GHCOS/DIRE3/ANVISA.

O sistema AirV teve sua avaliação de eficácia analisada de modo comparativo com um equipamento advindo do CDC, demonstrando ser uma plataforma de análise de tecnologias contra patógenos respiratórios envolvidas na desinfecção de ambientes e purificação de ar.

Foi validado um sistema de gestão de projetos na plataforma Asana, permitindo o monitoramento de diversos projetos de modo concomitante, além de centralizar as informações e dados gerados na execução de todos os processos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Blachere FM, Lindsley WG, Slaven JE, Green BJ, Anderson SE, Chen BT, Beezhold DH. Amostragem de bioaerossol para a detecção de vírus influenza em aerossol. *Influenza Outras Respir. Vírus.* 2007; 1 (3): 113-120.
2. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 20/2021/SEI/COSAN/GHCOS/DIRE3/ANVISA. Enquadramento de tecidos, supercies e objetos com propriedade antimicrobiana, de produtos antimicrobianos para aplicação nos mesmos e produtos com ação antimicrobiana para adicionar à água e deixar os tecidos em imersão, com a finalidade de proteção à saúde humana. Brasília, 2021.
3. Cao G, Noti JD, Blachere FM, Lindsley WG, Beezhold DH. Development of an improved methodology to detect infectious airborne influenza virus using the NIOSH bioaerosol sampler. *J Environ Monit.* 2011 Dec;13(12):3321-8.
4. Charles E. Henry Monica J. Heyl Dennis J. Reutter. Portable glovebox and filtration system. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US6974197?q=glove+box+vigor>.
5. EN 14476:2013+A1:2015: 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).
6. Francisco P. Granadino, Aurora. Glovebox for a double wall containment module. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US7780248?q=glove+box+vigor>.
7. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5, 536–544 (2020).
8. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, Set, Fuse! The Coronavirus Spike Protein and Acquisition of Fusion Competence. *Viruses.* 2012; 4(4):557-580.
9. Hussein, H.A., Abdullah, M.A.: Functional bionanomaterials, pp. 313–332. Springer, New York (2020).
10. Kalimuthu, K., Cha, B.S., Kim, S., Park, K.S.: Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Microchem. J.* 152, 104296 (2020)
11. Lorenz, R. J., and K. Bögel. 1973. Methods of calculation. In: Kaplan, M. M., and H. Koprowsky (eds.). *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: World Health Organization. Pp. 329–332.

12. Reed, L.J. and Muench, H. (1938) A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
13. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*. 2012 Apr;4(4):557-80.
14. Rehman, S., Asiri, S.M., Khan, F.A., Jermy, B.R., Ravinayagam, V., Alsalem, Z., Jindan, R.A., Qurashi, A.: Anticandidal and in vitro anti-proliferative activity of sonochemically synthesized indium tin oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* 10, 3228 (2020).
15. Skalny, A. V. et al. Zinc and respiratory tract infections: perspectives for COVID19 (Review). *Int. J. Mol. Med.* 46, 17–26.
16. Skalny AV, Rink L, Ajsuvakova OP, Aschner M, Gritsenko VA, Alekseenko SI, Svistunov AA, Petrakis D, Spandidos DA, Aaseth J, Tsatsakis A, Tinkov AA. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 (Review). *Int J Mol Med.* 2020 Jul;46(1):17-26.
17. Ueki H, Furusawa Y, IwatsukiHorimoto K, Imai M, Kabata H, Nishimura H, Kawaoka Y. 2020. Effectiveness of face masks in preventing airborne transmission of SARS-CoV2. *mSphere* 5:e00637-20.