

NOTA DE ESCLARECIMENTO AO CONSUMIDOR

JP SOLUTION DE SERVIÇOS E EMPREENDIMENTOS EIRELI
CNPJ: 37.262.852/0001-67

Inicialmente faz-se necessário destacar que, somos uma empresa do GRUPO LAGOS QUÍMICA LTDA, situada na cidade de Alfenas e, que a 30 anos trabalha com total transparência e respeito a todos os seus clientes, tratando-se de empresa conceituada e idônea que sempre realiza o recolhimento de seus impostos, gerando benefícios para a toda a população, pois, possibilita a geração de empregos e receitas, além de carregar o nome da nossa cidade, por todo o país, vez que, além de toda e região e do estado Minas Gerais, também presta seus serviços para as cidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, dentre outros.

Destacamos ainda que, em meio a pandemia causada pelo novo coronavírus e a doença COVID-19, a empresa prestou sua colaboração com a sociedade alfenense e de toda a região, sem medir esforços, de forma que, não cessou as suas atividades neste período, garantindo dessa forma, a fabricação e distribuição de álcool em gel, não só para as empresas, mas também à pessoas físicas, sem alteração de preço, conduta praticada de forma diversa por outras empresas que somente visam lucro e não o atendimento e os anseios da população.

Ocorre que, foram ventilados, através de matéria jornalística divulgada por meio digital e amplamente compartilhada nas redes sociais, informações inverídicas sobre a utilização de cabines instaladas em nossa cidade, bem como, sobre os produtos que nela são utilizados, contestando desta forma a eficácia dos mesmos contra o novo coronavírus, o que não reflete a verdade.

Nesse passo, é imprescindível que a empresa JP SOLUTION DE SERVIÇOS E EMPREENDIMENTOS EIRELI, em parceria com a empresa LAGOS QUÍMICA LTDA, traga a toda população alfenense informações úteis e necessárias a respeito da matéria jornalística, senão vejamos:

A empresa, de antemão, informa que foram atendidas todas as exigências estabelecidas no edital municipal de nº 263/2020 e pregão nº 57/2020, vez que, naquela oportunidade, concorreu com diversas outras empresas, de dentro e fora de nosso estado, informa também que, apresentou todos os documentos solicitados, além dos laudos e FISPQ's (Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos) que são as normas de uso obrigatório nas embalagens de produtos químicos e, que comprovam a eficácia de tais produtos, todos estes com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme documentos anexados ao presente.

Importante ainda esclarecer para a população que, o processo licitatório é público, sendo assim, qualquer informação sobre requisitos, forma do processo, ingresso, datas de eventos, participantes ou quaisquer outros documentos ou informações sobre o certame, tem o seu acesso permitido e garantido por lei, a qualquer um que tenha interesse.

Com relação aos produtos requisitados pela licitação e ofertados pela empresa e, conforme laudos anexados, destaca-se que todos eles foram alvo de estudos técnicos, sendo aprovados pela ANVISA e Vigilância Sanitária, informações essas, essenciais e, de suma importância para sua utilização, uma vez que são utilizados pelos órgãos de controle e fiscalização, procedimentos e estudos científicos, para elaboração de laudos de utilização, comprovação de eficácia e uso, bem como, tais estudos determinam se os produtos ou agentes químicos são prejudiciais ou não ao ser humano, quando da sua utilização, conforme se comprova, por meio de alguns trechos dos laudos abaixo colacionados:

Irritação/corrosão cutânea

Realizado segundo método OECD 404.

Numa escala de 0,0 até 8,0, sendo 0 o menor grau (não irritante), **o produto foi considerado não irritante.**

Irritação/corrosão ocular primária

Realizado segundo método OECD 405.

Numa escala de 0 até 110, sendo 0 o menor grau, **o produto obteve uma avaliação de 0 sendo considerado como não irritante.** O efeito notado foi reversível.

Toxicidade dermal aguda e via oral

Realizado segundo método OECD 403.

A dose de produto testada foi 2000 mg/kg e o resultado obtido foi que o produto não apresenta toxicidade oral nessa concentração, concluindo que a toxicidade oral é considerada maior que 2000 mg/kg."

O Laudo viricida, documento que comprova a eficácia dos produtos contra diversos vírus, dentre ele o novo coronavírus, foram fornecidos pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Biologia/ Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

Assim, a empresa em sua política de trabalho, além da eficiência na prestação de serviços, a preocupação com o zelo pela saúde da população e clientes, trabalha em parceria com diversos profissionais multidisciplinares, utiliza-se de tecnologia de ponta, produtos de qualidade e, nesse período de crise sanitária, sempre se manteve informada sobre a eficácia e disponibilidade de novos compostos e produtos para o combate ao coronavírus, disponibilizando as informações e produtos que, nestes tempos, podem salvar vidas.

Outro fato que se revela importante, após as instalações das cabines de desinfecção, é que houve a abrupta redução de casos, em 47,4%, entre os dias 05/10 e 30/10, considerando o feriado prolongado de 12 de outubro, dentro desse período.

Por fim a empresa JP SOLUTION informa que, se sentiu obrigada a esclarecer tais questões a população, bem como, aponta que encontram-se anexada a presente NOTA AO CONSUMIDOR, todos os documentos aqui referidos, se colocando à disposição para prestar os demais e possíveis esclarecimentos que se fizerem necessários, ressaltando que continua a atuar

com comprometimento e qualidade de seus produtos e serviços, presando sempre pelo bem-estar, saúde e segurança de seus clientes, parceiros e toda a população de Alfenas.

Alfenas, 03 de novembro de 2020.



JOÃO PETENUCI NETO

Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 1 de 7

SECÃO 1 – IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Fornecedor: TerpenOil Tecnologia Orgânica Ltda.

Endereço: Av. Arquimedes 1070, Jundiaí – SP, CEP: 13211-840

Telefone de Emergência: 0800 722 6001 – DISQUE INTOXICAÇÃO

SECÃO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

Perigos mais Importantes: Este produto não causa danos ao meio ambiente se utilizado conforme as recomendações.

Efeitos do Produto:

- **Efeitos Adversos à Saúde Humana:** Por apresentar efeito desengordurante, o contato direto e prolongado com o produto pode causar irritação nos olhos e ressecamento da pele, principalmente em pessoas com alta sensibilidade.

Principais sintomas: Nenhum efeito adverso é esperado se utilizado conforme recomendação. A ingestão do produto provoca irritação do trato gastrointestinal e náusea.



Data de Elaboração: 09.09.2020

Data de Revisão:

Número de Revisão:

Telefone: (11) 4585-8351
 Av. Arquimedes, 1070 - Galpão 8
 Jd. Casa Branca - Jundiaí – SP
 CEP: 13211-840
www.terpenoil.com.br
comercial@terpenoil.com.br

Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 2 de 7

SECÃO 3 – COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Natureza Química:

Mistura de terpenos originados de laranja, alfa terpineol, tensoativos, álcool e água

Nenhum dos componentes da formulação é reconhecido como carcinogênico ou mutagênico.

| PRODUTO | CAS | CONCENTRAÇÃO (%) |
|--|--------------|------------------|
| Mistura de terpenos de origem cítrica | 5989-27-5 | 10 - 20 |
| Mistura de óleos essenciais terpênicos | Trade Secret | 5 - 10 |
| Alfa Terpineol | 98-55-5 | 1 - 8 |
| Ácido Cítrico Anidro | 77-92-9 | 2 - 8 |
| Derivado de Álcool Laurílico | 68439-50-9 | 12 - 25 |
| Lauril Éter Sulfato de Sódio | 9004-82-4 | 18 - 24 |
| Álcool Etfílico | 64-17-5 | 8 - 15 |

Este produto contém mais que 20% de água.

SECÃO 4 – MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Contato Ocular

Pode haver irritação e vermelhidão nos olhos caso haja contato direto e prolongado com o produto. Enxaguar imediatamente os olhos com grande quantidade de água por um período de 10 a 15 minutos ou até remoção completa do produto. Caso exista, remova as lentes de contato. Se os sintomas persistirem procurar assistência médica.

Contato Dermal

O produto pode causar irritação na pele. Caso haja contato direto e prolongado com o produto, pode causar vermelhidão reversível devido ao seu poder solvente. Lavar a área atingida com água em abundância. Se os sintomas persistirem procurar assistência médica.

Ingestão

Pode causar irritação se ingerido. Caso haja ingestão de grande volume do produto, não induzir o vômito e ingerir bastante água. Se houver dores estomacais ou diarreia, procurar ajuda médica.

Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 3 de 7

Inalação de vapores

Produto pode causar irritação. Caso haja inalação de grande volume de névoa do produto e esta cause irritação das vias respiratórias, procurar assistência médica.

SECÃO 5 – MEDIDAS DE PREVENÇÃO E COMBATE A INCÊNDIO

Meios de Extinção Apropriados: Em caso de incêndio usar pó químico, dióxido de carbono, espuma para alcoóis ou hidrocarbonetos. Usar neblina de água para resfriar as embalagens.

Meios de Extinção Contra Indicados: Não conhecido.

Métodos Específicos: Em caso de incêndio no local de armazenamento, manter a embalagem longe da fonte de calor, resfriá-la com neblina de água e removê-las para área segura.

Equipamentos Especiais para Proteção dos Bombeiros: O produto **não é inflamável** e não requer equipamentos especiais para seu manuseio. Usar equipamentos de proteção habituais.

SECÃO 6 – MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO / VAZAMENTO

Precauções Pessoais: Evitar contato com os olhos e lavar as mãos após manuseio.

Precauções para o Meio Ambiente: Por se tratar de produto a base de água, não tóxico e não inflamável, não é necessária utilização de cuidados específicos na manipulação. Em caso de grande derramamento, utilizar os métodos usuais.

Métodos para Remoção e Limpeza: Caso ocorra um derramamento de grande quantidade de produto utilizar materiais absorventes como areia e serragem para recolhimento e contenção, destinar os resíduos conforme legislação vigente.

Neutralização: Não necessário.

Descarte: A eliminação de resíduos deve obedecer às regulamentações federais, estaduais e municipais vigentes.

SECÃO 7 – MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

Manuseio

- **Prevenção de Fogo ou Explosão:** O produto não é inflamável e nem explosivo.

Data de Elaboração: 09.09.2020
Data de Revisão:
Número de Revisão:

Telefone: (11) 4585-8351
Av. Arquimedes, 1070 - Galpão 8
Jd. Casa Branca - Jundiaí – SP
CEP: 13211-840
www.terpenoil.com.br
comercial@terpenoil.com.br



Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 4 de 7

- **Precauções para Manuseio Seguro do Produto Químico:** Não requer equipamentos especiais para manuseio. Para exposição prolongada e constante ao produto, usar equipamentos de proteção individual.
- **Avisos de Manuseio Seguro:** Evitar o contato com oxidantes enérgicos e ácidos fortes em alta concentração.

Condições de armazenamento

- **Adequadas:** Manter em local ventilado e ao abrigo de fontes de calor e de ignição.
- **Produtos incompatíveis:** Não armazenar junto com alimentos e bebidas para que não ocorra transferência de odor, inclusive os destinados a animais. Evitar o uso concomitante com ácidos e bases fortes para não prejudicar a eficiência do produto.

Materiais para embalagens

- **Recomendados:** Polipropileno, polietileno alta densidade, aço, polietileno tereftalato (PET).
- **Inadequados:** PVC, poliestireno.

SEÇÃO 8 – CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Parâmetros de controle

Limites de exposição: Para o produto foi calculado segundo a ABNT 14725:

$$DL50_{\text{oral}} > 5000 \text{ mg/kg}$$

Equipamentos de Proteção Individual: O uso adequado do produto puro requer a utilização de equipamentos de proteção individual habituais, como óculos de proteção e luvas. Quando diluído e formulado não apresenta riscos.

Ventilação: Usar em local ventilado.

Proteção Dermal: O produto irrita a pele, mas se utilizado adequadamente, não se espera reação indesejada. Após contato, lavar bem o local com água.

Proteção para os Olhos: Pode causar irritação reversível caso haja contato direto com os olhos. Neste caso lave com água em abundância até remoção completa do produto.

Data de Elaboração: 09.09.2020
Data de Revisão:
Número de Revisão:

Telefone: (11) 4585-8351
Av. Arquimedes, 1070 - Galpão 8
Jd. Casa Branca - Jundiaí - SP
CEP: 13211-840
www.terpenoil.com.br
comercial@terpenoil.com.br



Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 5 de 7

Medidas de Higiene: Após o manuseio recomenda-se lavar as mãos.

SECÇÃO 9 – PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS

Estado Físico: Líquido.

Cor: Amarelo.

pH: 3,0 – 4,0 (solução à 1%).

Temperatura específica ou faixas de temperatura nas quais ocorrem mudanças de estado físico:

- **Ponto de Ebulição:** Não disponível.
- **Ponto de Fulgor:** 82,8°C

Densidade: 0,96 g/mL.

Solubilidade: Miscível com solventes orgânicos; miscível com água formando emulsão.

SECÇÃO 10 – ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estabilidade: O produto é estável à temperatura ambiente e ao ar, sob condições normais de uso e armazenagem. Não se polimeriza.

Reações perigosas: Não há reações perigosas conhecidas.

Condições a evitar: Temperaturas elevadas e reações com ácidos, bases fortes e oxidantes.

Produtos Perigosos de Decomposição: Em caso de incêndio pode emitir gases tóxicos e irritantes.

SECÇÃO 11 – INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Inalação: Irritação das vias respiratórias.

Contato com e Pele: O produto pode causar irritação da pele.

Contato com os Olhos: Apresenta irritação reversível aos olhos quando em contato direto.

Data de Elaboração: 09.09.2020
Data de Revisão:
Número de Revisão:

Telefone: (11) 4585-8351
Av. Arquimedes, 1070 - Galpão 8
Jd. Casa Branca - Jundiaí - SP
CEP: 13211-840
www.terpenoil.com.br
comercial@terpenoil.com.br



Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 6 de 7

Ingestão: Irritante ao trato gastrointestinal e pode causar dores estomacais ou diarreia.

SECÃO 12 – INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Mobilidade/Bioacumulação: A persistência do produto no meio ambiente é baixa em virtude da biodegradabilidade de seus componentes.

Persistência / Degradabilidade: Não aplicável.

Ecotoxicidade: De acordo com a NBR14725-2-2009, baseada nas informações de segurança de produtos químicos perigosos do GHS (Sistema Globalmente Harmonizado) o limoneno, componente principal, está classificado na categoria de substâncias perigosas para o meio aquático com o nível mais baixo possível, nível 3. Essa classificação concorda com todas as referências publicadas em trabalhos acadêmicos e revistas indexadas nacionais e internacionais.

SECÃO 13 – CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSICÃO

Resíduos do produto: Descartar segundo as regulamentações ambientais federais, estaduais e municipais. Não deixar que resíduos contaminem mananciais.

Embalagens utilizadas: As embalagens vazias, depois de enxaguadas internamente com água, podem ser descartadas normalmente junto com os resíduos plásticos e enviadas para reciclagem, de acordo com a legislação local.

SECÃO 14 – INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

Transporte Rodoviário no Brasil

PRODUTO NÃO ENQUADRADO NA RESOLUÇÃO EM VIGOR SOBRE TRANSPORTE DE PRODUTOS PERIGOSOS

Nome apropriado para embarque: Emulsão de terpenos cítricos.

Número ONU: Não classificado.

Classe de risco / divisão: Não classificado.

Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

Nome do Produto: HN Aspersão

Código do Produto: 4900

Página 7 de 7

SEÇÃO 15 – REGULAMENTAÇÕES

Regulamentações

Notificação Anvisa/MS: 21351.922431/2020-21

Limoneno

O FDA lista o Limoneno como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) em 21CFR 182.20 e 182.6.

- Proposição 65: este produto não contém substâncias químicas listadas como carcinogênicas ou tóxicas ao sistema reprodutor.

SEÇÃO 16 – OUTRAS INFORMAÇÕES

As informações contidas neste documento refletem com exatidão o nosso melhor conhecimento para o manuseio apropriado deste produto de acordo com as especificações constantes no rótulo. Quaisquer outros usos do produto que não os recomendados, serão de responsabilidade do usuário.

Esta ficha está de acordo com a NBR 14725-4 (ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Data de Elaboração: 09.09.2020
Data de Revisão:
Número de Revisão:

Telefone: (11) 4585-8351
Av. Arquimedes, 1070 - Galpão 8
Jd. Casa Branca - Jundiaí - SP
CEP: 13211-840
www.terpenoil.com.br
comercial@terpenoil.com.br

Ficha Técnica

HN Aspersão – Aromatizante de Ambientes

► **Descrição:** Produto cosmético notificado na Anvisa como Aromatizante de Ambientes sob o nº 25351.922431/2020-21, possui em sua composição óleos essenciais e os mesmos ativos terpênicos encontrados no produto 3089 da Terpenoil.

► **Indicação:** Indicado para aplicação por aspersão, nebulização e atomização, permitindo grande faixa de diluição de uso com manutenção das propriedades aromáticas.

► **Composição:** Mistura de frações terpênicas, óleos essenciais, tensoativos de rota vegetal, álcool, ácido cítrico e água.

Possui os mesmos componentes e ativos terpênicos do produto 3089 da Terpenoil.

► **Características físico-químicas:**

| Propriedades | |
|------------------------|------------------|
| Aspecto | Líquido laranja |
| Densidade (g/mL) | 0,94 – 0,99 |
| pH (solução 1%) | 3 – 4 |
| Flash point (open cup) | 82,5 °C |
| Viscosidade | 80 mPa.s |
| Ponto de Congelamento | abaixo de -10 °C |

► **Instruções de Uso:** Aplicação por métodos de aspersão, nebulização e atomização.

► **Preparação:** Diluir conforme tabela abaixo:

| Concentração de Uso |
|------------------------|
| De 5 a 10 mL por Litro |

► **Conservação:** não reutilize a embalagem vazia para outros fins. Mantenha o produto em sua embalagem original, sempre fechado, protegido da luz e calor.

► **Apresentação:** disponível em embalagens de 1 e 5 litros.

► **Validade:** 12 meses após a data de fabricação impressa no rótulo.

Produto à base de Terpenos e a Qualidade do Ar

Nos últimos anos, cada vez mais é evidenciado que o ar que respiramos apresenta uma qualidade muito inferior daquela que deveríamos respirar. As atividades industriais desenfreadas e sem tratamento de poluentes, carros em abundância emitindo gases e partículas tóxicas são apenas alguns exemplos de contaminantes no ar que respiramos.

Além desses agravantes para a qualidade, cientistas observaram outro: a qualidade microbiana do ar. Nos últimos anos observou-se um aumento representativo de cargas microbianas no ar que respiramos. Fungos e bactérias são encontrados na superfície de pequenas partículas e podem ser carregados por um longo caminho até chegar ao pulmão de quem as respira, assim como vírus. Portanto, a qualidade do ar não está somente relacionada à emissão de poluentes atmosféricos.

Pensando nessa nova condição do ar que respiramos e nos riscos inerentes relacionados a ambientes confinados, a **Terpenoil Tecnologia Orgânica, empresa com mais de 13 anos com expertise em formulação de produtos derivados de fontes naturais renováveis**, em parceria com o Laboratório de Microbiologia do **Instituto Adolfo Lutz (IAL)**, um dos institutos de pesquisa referência na América Latina, desenvolveu uma tecnologia para aplicação do produto antimicrobiano.

Quem nunca entrou numa floresta e respirou o ar puro não sabe que este ar é livre de microorganismos e, o principal, os agentes antimicrobianos são os terpenos expelidos pelas folhas das árvores. Esses mesmos terpenos nós utilizamos na formulação do produto natural à base de óleos essenciais, sendo uma alternativa totalmente verde para a redução da carga microbiológica presente no ar.

No estudo realizado pela **Terpenoil e Instituto Adolfo Lutz**, o ar de diferentes ambientes foi coletado e observou-se uma importante redução microbiológica presente no ar, segundo a Tabela 1. Dentre os microorganismos presentes estão àqueles resistentes a antibióticos, principais causadores de infecções pulmonares.

Este estudo, que foi aceito para publicação na revista internacional **Current Fungal Infection Reports**, mostra que a aplicação do Desinfetante Natural no ar reduziu a carga microbiana em **85%**. A previsão de publicação é na Edição de Julho de 2020. Assim que feito, será disponibilizado ao público.

Tabela 1: Número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de fungos e bactérias, antes e depois da aplicação do Desinfetante Natural.

| | Antes | Depois |
|------------------|------------------------|-----------------------|
| Fungos | 234 ufc/m ³ | 54 ufc/m ³ |
| Bactérias | 370 ufc/m ³ | 38 ufc/m ³ |

Silva, D. M. C. *et al.* Antifungal and antibacterial activity of terpenes for improvement of indoor air quality. [Current Fungal Infection Reports](#), 2020

Esses mesmos ativos encontrados no produto para desinfecção do ar deram origem a um **produto desinfetante natural** para superfícies que também foi testado contra os principais microorganismos e apresentou resultados extraordinários em apenas 30 segundos após aplicação na superfície, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Ação antimicrobiana do Desinfetante Natural em 30 segundos e 5 minutos sobre microorganismos de importância sanitária.

| Microorganismo | Redução em 30 s | Redução em 5 minutos |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 99,9% | 99,999% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 99,999% | 99,999% |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 99,9% | 99,999% |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 99,99% | 99,99% |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 99,99% | 99,99% |
| <i>Clostridium difficille</i> | 99,99% | 99,99% |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 99,99% | 99,99% |

Vale ressaltar que este produto é o único desinfetante 100% natural aprovado pela Anvisa. Máxima eficiência nos testes antimicrobianos, menor toxicidade apresentada para um produto garantem a efetividade e segurança do mesmo.

O Desinfetante de Uso Geral da linha Higiene Natural (Cód. 3089) da Terpenoil Tecnologia Orgânica é um produto derivado de uma tecnologia patenteada.

Este é o **primeiro e único produto natural** registrado na ANVISA com ativos à base de terpenos, ou seja, óleos essenciais de plantas da flora brasileira.

Óleos essenciais são conhecidos por seu poder de controlar microorganismos na natureza. O ativo derivado da planta *Pinus* sp, popularmente conhecido como pinheiro, é o alfa-terpineol.

Os laudos de ação antimicrobiana e de toxicidades podem ser consultados clicando nos links. O produto foi considerado totalmente seguro para a utilização, segundo os laudos de toxicidade.

O produto está devidamente **registrado** na [ANVISA/MS sob o nº 354850001](#).

SEGURANÇA E TOXICIDADE

Adicionalmente aos testes de eficácia, o produto foi testado para verificar a segurança e toxicidade. O produto da Terpenoil foi considerado um produto de baixíssima toxicidade. A chance de uma pessoa desenvolver uma irritação devido ao uso/exposição do produto é considerada muito baixa.

[Irritação/corrosão cutânea](#)

Realizado segundo método OECD 404.

Numa escala de 0,0 até 8,0, sendo 0 o menor grau (não irritante), o produto foi considerado não irritante.

[Irritação /corrosão ocular primária](#)

Realizado segundo método OECD 405.

Numa escala de 0 até 110, sendo 0 o menor grau, o produto obteve uma avaliação de 0 sendo considerado como não irritante. O efeito notado foi reversível.

[Toxicidade dermal aguda e via oral](#)

Realizado segundo método OECD 403.

A dose de produto testada foi 2000 mg/kg e o resultado obtido foi que o produto não apresenta toxicidade oral nessa concentração, concluindo que a toxicidade oral é considerada maior que 2000 mg/kg.

DL₅₀ > 2000 mg/kg

Biodegradabilidade imediata

Realizado segundo método OECD 301 B.

O produto apresentou um valor de 83,1% de biodegradabilidade em 28 dias. O valor mínimo aceito para este teste é 60% em 28 dias.

1. LAUDOS COMPROBATÓRIOS

Os testes para a comprovação da eficácia da ação antimicrobiana, testes de toxicidade e testes adicionais foram realizados em laboratórios credenciados para emissão do certificado (REBLAS – Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde).

Abaixo são encontrados os laudos referentes aos testes:

- 1.1. [Ação antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*](#)
- 1.2. [Ação antimicrobiana frente ao *Salmonella choleraesuis*](#)
- 1.3. [Ação antimicrobiana frente ao *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* em 30 segundos.](#)
- 1.4. [Ação antimicrobiana frente ao *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em 30 segundos.](#)
- 1.5. [Biodegradabilidade](#)
- 1.6. [Irritação corrosão cutânea](#)
- 1.7. [Irritação corrosão ocular](#)
- 1.8. [Toxicidade oral](#)
- 1.9. [Toxicidade dermal](#)
- 1.10. [Carta ANVISA liberação de uso de Desinfetantes para coronavírus](#)
- 1.11. [Relatório de atividade do Desinfetante Natural contra o coronavírus](#)
- 1.12. [Artigo publicado na Current Fungal Infection Reports](#)

DISCLAIMER

[Nota Técnica 34/20 - Avisa](#)

[Nota Técnica 51/20 - Anvisa](#)



Cidade Universitária “ZEFERINO VAZ”, 10 de junho 2020.

Ao Sr.
Rubens Miguel Scavassa
TERPENOil- Química VERDE
Av. Arquimedes, 1070 – Galpão 8
Condomínio Industrial Siprel CIS 1
Bairro Casa Branca – Jundiaí – SP
CEP: 13211-840

Referente: **LAUDO VIRUCIDA “TerpenOil-Desinfetante de uso geral”**

Prezado Sr Rubens,
Vimos por meio desta fornecer laudo do ensaio virucida.

1. **Produto:** Desinfetante de uso geral/higiene natural (Diluição 1:200)
Composição: terpenos cítricos e outros terpenos.
2. **Empresa:** TERPENOil Química VERDE
3. **Vírus Testado:**
CORONAVÍRUS/MHV-3 (características semelhantes ao SARS, MERS e Covid-19 uma vez que pertence ao mesmo gênero).
4. **Procedimento experimental:**
 - a) Os ensaios foram realizados em laboratório NB-2 (Biosafety Level 2) seguindo as Recomendações da ANVISA Art. 1 e Art. 3 da IN 04/13 e IN 12/16 e metodologias descritas nas normas (BS EN 14476:2013+A2:2019, ASTM E1053 – 11 e do Instituto Robert Koch – RKI) e obedecendo as Boas Práticas de Laboratório (BPL).
 - b) Os testes foram realizados em quadruplicata (quatro repetições biológicas):
 - A primeira etapa dos ensaios foi realizar a “Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)” nas diferentes células testadas, para determinar a concentração que não causa toxicidade para as células. Pois a substancia teste deve ser ativa somente contra o vírus e não às células.
 - positivo (presença do vírus, com o uso do desinfetante e sistema celular);
 - negativo controle de células (apenas sistema celular, sem a presença de vírus e sem a presença dos desinfetantes);
 - controle da titulação: vírus e cultivo celular.
 - A mistura vírus e **TerpenOil-Desinfetante de uso geral** foi submetida a diluição de 1:200 e diferentes tempos (1, 5, 10 e 15 minutos).
 - c) As microplacas com **TerpenOil-Desinfetante de uso geral** + sistemas celulares + vírus foram incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 hs a 04 dias.
 - d) O título do vírus foi expresso como log₁₀TCID₅₀/ml a partir do método Reed-Muench (1938).

LAUDO VIRUCIDA “TerpenOil-Desinfetante de uso geral”

5. Resultados:

Tabela: Vírus Testado, Tempos de contato, Média da Titulação viral, Título da Atividade Virucida e Redução da infectividade viral em relação ao produto “TerpenOil-Desinfetante de uso geral na Diluição 1:200”.

| Vírus | Tempo de contato dos Vírus e Desinfetante | Controle Título viral DICT ₅₀ /ml (Log 10) * | Título viral DICT ₅₀ /ml (Log 10) + Produto testado ** | Redução da infectividade viral DICT ₅₀ /ml (Log 10) (Média) *** | Toxicidade Celular |
|-------------------|---|--|--|---|--------------------|
| Coronavírus-MHV-3 | 01 minuto | 8,5 | 4,0 | 4,5 (99,99%) | - |
| | 05 minutos | | 3,0 | 5,5 (99,99%) | + |
| | 10 minutos | | 0,0 | 8,5 (100%) | ++ |
| | 15 minutos | | 0,0 | 8,5 (100%) | ++ |


*Média de 12 diluições do vírus (de 10¹ a 10¹²)

**Média de 12 diluições do vírus (de 10¹ a 10¹²), desinfetante e repetições

***<https://www.klaran.com/what-is-log-reduction>

Citotoxicidade Celular

- Não tóxico
 + Baixa
 ++ Média

| Log Reduction | Reduction Factor | Percent Reduced |
|---------------|------------------|--|
| 1 | 10 | 90% |
| 2 | 100 | 99% |
| 3 | 1,000 | 99.9% |
| 4 | 10,000 | 99.99%  |
| 5 | 100,000 | 99.999% |
| 6 | 1,000,000 | 99.9999% |



LAUDO VIRUCIDA “TerpenOil-Desinfetante de uso geral”

6. Conclusões:

- Considerando que o houve inibição da infecção viral, pode-se concluir que o produto **TerpenOil-Desinfetante de uso geral** foi eficaz para a inativação/destruição de partículas virais, e, portanto, recomendamos o uso na forma DILUÍDA 1:200 como potencial agente virucida para o Grupo Coronavírus.
- Os tempos de 01 minuto e 05 minutos de contato com o produto “**TerpenOil-Desinfetante de uso geral**” inibiu 99,99% do vírus.
- Os Tempos de 10 e 15 minutos de contato com o produto “**TerpenOil-Desinfetante de uso geral**” inibiu 100% do vírus.
- Em relação a “redução de infectividade viral”*** a mesma foi de $\geq \log 4$ para Coronavírus/strain MHV-3, já o tempo de contato (vírus e produto **TerpenOil-Desinfetante de uso geral**) o produto mostrou ser ativo a partir de 01 MINUTO.

Atenciosamente,

Prof^ª Dr^ª Clarice Weis Arns
Responsável pelo Laudo

Cidade Universitária “ZEFERINO VAZ”, 10 de junho 2020.



Bibliografia Consultada:

ANVISA - Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 2 DE JULHO DE 2013
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/int0004_02_07_2013.html

ANVISA- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 11 DE OUTUBRO DE 2016 – ANVISA.
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-12-2016-anvisa/>
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-in-no-50-de-3-de-dezembro-de-2019-anvisa/>

BS EN 16777:2018: Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area

BS EN 14476:2013+A2:2019
Incorporating corrigendum August 2019
Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

BS EN 16777:2018: *Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area*

DIN EN 14476:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements [phase 2, step 1]. Brussels 2015, CEN-Comité Européen de Normalisation.

Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann, Birte Bischoff, Daniel Todt , Eike Steinmann, Joerg Steinmann, Florian H. H. Brill and Jochen Steinmann
Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions
Antimicrobial Resistance and Infection Control (2019) 8:121
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-4>

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender , E. Steinmann
Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents
Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246e251
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>

JEFF MILLER and ROLF ULRICH
On the analysis of psychometric functions: The Spearman–Kärber method
Perception & Psychophysics 2001, 63 (8), 1399-1420

Rabenau HF, Schwebke I, Blumel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P.
Guideline of the German Association for the Control of Virus Diseases (DVV) e.V. and the **Robert Koch-Institute (RKI)** for testing chemical disinfectants for effectiveness against viruses in human medicine. Version of 1st December, 2014.
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2015;58: 493–504

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
F34 – 032038.R

Patrocinador do Estudo: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA 13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Subst. Teste: 06/08/2015
Início do Experimento: 21/09/2015
Término do Experimento: 25/09/2015
Emissão do Relatório Final: 27/11/2015
Substância Teste: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL
(%)
al
o
e
t
T
e

Composição Química Declarada (unidade):
Quantidade (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Nome Químico declarado da Subst. Teste (IUPAC ou CAS do princípio ativo): 98-55-5
Pureza declarada (princípio ativo): 90%
Homogeneidade: Líquido Homogêneo Límpido Amarelo

Diretor de Estudo: André Luiz Figueiredo Júnior
Biólogo
Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
São Paulo – SP CEP: 04164-001

NÍVEIS DE DOSE E CONCENTRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A substância teste originalmente na forma líquida que apresentou pH puro de $2,10 \pm 0,01$ foi utilizada diluída na proporção de 1 mL para 100 mL de água deionizada. A quantidade total aplicada na pele de cada animal foi de 0,5 mL.

DADOS DO SISTEMA TESTE

Foram utilizados coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, possuindo de 2783 a 2851 gramas de peso vivo. A quantidade utilizada foi de 3 fêmeas nulíparas e não prenhes.

Os sistemas testes utilizados no presente estudo foram previamente avaliados nos aspectos clínico e dermatológicos e permitiram a reutilização dos mesmos, não interferindo na avaliação da substância teste e dessa forma não comprometendo a qualidade final dos resultados obtidos.

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F34"
Página 1 de 4

DB-GIT 30.01

Suplemento Específico de Relatório Final

Revisado em 27/01/14

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F34 – 032038.R

RESULTADO

Análise dos Resultados

Cada animal foi avaliado separadamente tendo seus resultados registrados individualmente e relatados na Tabela 1.

A graduação da intensidade da reação cutânea foi baseada no método de Draize, como descrito a seguir:

| A - ERITEMA E ESCARAS: | Valor |
|---|-------|
| Ausência de eritema | 0 |
| Eritema fraco (pouco perceptível) | 1 |
| Eritema bem definido | 2 |
| Eritema moderado | 3 |
| Eritema severo (vermelhidão) à formação de escaras leves (lesões profundas) | 4 |
| Máximo possível | 4 |
| B - EDEMA: | |
| Ausência de edema (0 e 0,24mm) | 0 |
| Edema muito leve (pouco perceptível – 0,25mm e 0,49mm) | 1 |
| Edema leve (extremidade da área do edema bem definida – 0,5mm e 0,74 mm) | 2 |
| Edema moderado (0,75mm e 1 mm) | 3 |
| Edema severo (mais que 1 mm, ultrapassa a área de exposição) | 4 |
| Máximo possível | 4 |

Avaliação dos resultados:

A fim de estabelecer o Índice de Irritação Cutânea foi obtida média aritmética para os valores de eritema e edema nas 24 e 72 horas. A soma dessas duas médias é dividida por 2 e o índice é finalmente obtido e classificado de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2: Classificação de substância segundo índice de irritação Dermal.

| Índice de Irritação | Classificação |
|---------------------|-------------------------|
| 0,0 - 0,99 | Não irritante |
| 1,0 - 1,99 | Levemente irritante |
| 2,0 - 4,99 | Moderadamente irritante |
| 5,0 - 8,00 | Severamente irritante |

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F34 – 032038.R

Índice de irritabilidade dermal:

- Animal 1: 0,0
- Animal 2: 0,0
- Animal 3: 0,0
- Média: 0,0

Classificação:

- Não irritante.
- Sem irritação.

Tabela 1: Índices de lesões de pele nos 3 animais para a substância teste.

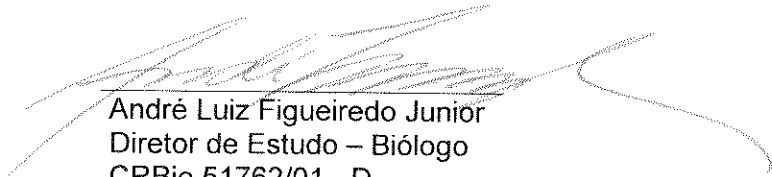
| Coelho 1 | | Coelho 2 | | Coelho 3 | | Tempo |
|--|-------|----------|-------|----------|-------|------------|
| Eritema | Edema | Eritema | Edema | Eritema | Edema | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 minutos |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 horas |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 horas |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 horas |
| Observações: Nada Digno de Nota (NDN). | | | | | | |

CONCLUSÃO

A substância teste originalmente na forma líquida apresentou índice de irritação dermal de 0,0, sendo considerada não irritante quando aplicada diluída na proporção de 1 mL para 100 mL de água deionizada por via dermal em coelhos.

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e atende os requisitos da Norma NIT-DICLA-035 Rev.02 – Princípio das Boas Práticas de Laboratório – BPL. INMETRO, 2011 e demais documentos complementares NIT-DICLA-034 a 043.


 André Luiz Figueiredo Júnior
 Diretor de Estudo – Biólogo
 CRBio 51762/01 - D
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F34"
 Página 3 de 4


SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F34 – 032038.R

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este Relatório Final foi avaliado pela Garantia da Qualidade e reflete com veracidade os Dados Brutos e o Plano de Estudo.

Declaro que foram realizadas inspeções, conforme abaixo descrito:

| Programa da Garantia da Qualidade | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Inspeção de Processo | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Fases críticas do estudo | 25/11/2013 - 29/11/2013 | 13/01/2014 | 13/01/2014 |
| Inspeção | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Instalação de Teste | 22/07/2013 - 24/07/2013 | 26/07/2013 | 26/07/2013 |
| Inspeção Documental | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Plano de Estudo | 22/07/2013 | 23/07/2013 | 23/07/2013 |
| Dados Brutos, Relatório Final | 27/11/2015 | 27/11/2015 | 27/11/2015 |


 Claudia C. Ramos
 Garantia da Qualidade
 CRQ – 04161558 – IV Região
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

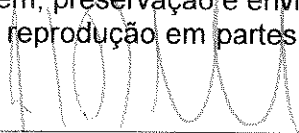
DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a nossa supervisão, conforme os procedimentos nele descritos.

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente a substância teste ensaiada. A amostragem é responsabilidade do Patrocinador.

A substância teste foi analisada como recebida, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio da substância teste.

É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.


 Gláucio Pereira Machado
 Gerente da Instalação Teste
 CRMV-SP 20396
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

=====

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F34"
 Página 4 de 4

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
F34

INSTALAÇÃO DE TESTE:

Razão Social: Laboratórios Ecolyzer Ltda.
Endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
CEP: 04164-001 – São Paulo – SP
Fone/Fax: (0xx11) 2969-5020
E -mail: ecolyzer@ecolyzer.com.br

RESUMO

O experimento de Irritação/Corrosão Cutânea Primária em Coelhos é realizado para estudar os possíveis efeitos lesivos, reversíveis ou não, de uma substância teste sobre a pele de coelhos. A substância teste é aplicada sobre a pele dos coelhos em um volume total de 0,5 mL. Os animais são mantidos por 72 horas subsequentes à aplicação e observados quanto à presença de eritema, escaras e edema, sinais de irritação local e demais alterações sistêmicas.

INTRODUÇÃO

A irritação cutânea é a produção de alterações inflamatórias reversíveis, ao passo que a corrosão é a produção de lesões teciduais irreversíveis após a aplicação de uma substância na pele.

OBJETIVO

O experimento de Irritação Cutânea Primária em Coelhos tem como finalidade fornecer informações sobre os efeitos corrosivos ou irritantes de uma substância na pele destes animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Equipamentos

- Máquina de tosa
- Vidrarias de uso comum de laboratório
- Seringa descartável
- Gaze/patch oclusivo
- Balança digital
- Medidor de espessura

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F34 – 032038.R

DB-GIT 29.00

Página 1 de 3
Relatório Final Padronizado

Elaborado: 18/04/13

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
F34

Condições de teste

Os animais são aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. São mantidos com ventilação de 10 a 15 trocas de ar por sala por hora, temperatura entre 19 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 30 e 70 % e fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A dieta é constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. Os animais são mantidos individualmente em gaiolas de arame galvanizado.

Metodologia

Aproximadamente 24 horas antes do início do teste, os pêlos da região dorsal dos animais são removidos com máquina de tosa cuidadosamente sem ferir e/ou irritar a pele. A substância teste é aplicada na pequena área tosada de aproximadamente 6 cm² e então protegida por uma gaze ou patch oclusivo. As áreas adjacentes não tratadas servem como controle negativo. No final do período de exposição (4 horas), os resíduos de produto são removidos através de lavagem com algodão embebido em água.

Os animais são mantidos por 72 horas em observação, sendo avaliados clinicamente e os graus das lesões e demais alterações anotados aos 60 minutos, 24 horas, 48 horas e 72 horas posteriores a aplicação da substância teste. Essa avaliação contempla a presença de eritema, edema, formação de escaras e vesículas, bem como outras alterações locais ou sistêmicas.

MÉTODO UTILIZADO

OECD, *Guideline For Testing Of Chemicals, Acute Dermal Irritation/Corrosion*. Section 4: Health Effects, 404, 24/04/2002 – Pág. 1-13.

Referência

INCQS n° 65.3330.003. - *Ensaio de Irritação Cutânea Primária: Avaliação das leituras; Classificação.*

ANEXOS

Não aplicável.

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito n°9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F34 – 032038.R

DB-GIT 29.00

Página 2 de 3
Relatório Final Padronizado

Elaborado: 18/04/13

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA EM COELHOS"
F34

ARQUIVO E ARMAZENAMENTO

Este Relatório Final é emitido em duas vias, sendo uma enviada ao Patrocinador e a outra arquivada.

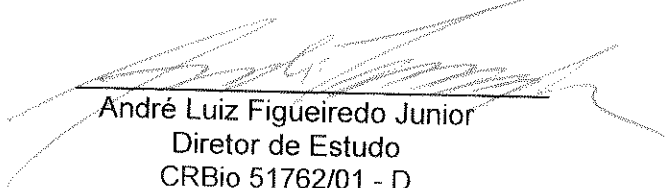
Os Dados Brutos, Plano de Estudo, Relatório Final e observações originais referentes a este estudo estão arquivados e disponíveis na empresa Arktec Guarda de Documentos, sob responsabilidade dos Laboratórios Ecolyzer Ltda, no seguinte endereço: Av. Gupe, 10565 - Barueri, SP – CEP: 06422-120. Os documentos ficam arquivados por um período de cinco anos a partir da data de entrada da Substância Teste na Instalação de Teste.

A Substância Teste permanece disponível nos Laboratórios Ecolyzer Ltda por um período de quatro meses a partir da data de emissão do Relatório Final, no seguinte endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – São Paulo, SP - CEP: 04164-001.

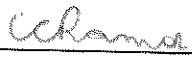
RESPONSÁVEIS



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação de Teste
CRMV-SP 20396
Ecolyzer



André Luiz Figueiredo Junior
Diretor de Estudo
CRBio 51762/01 - D
Ecolyzer



Claudia C. Ramos
Garantia da Qualidade
CRQ – 04161558 – IV Região
Ecolyzer

=====

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F34 – 032038.R

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
F4 – 032038.R

Patrocinador do Estudo: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA 13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Subst. Teste: 06/08/2015
Início do Experimento: 21/09/2015
Término do Experimento: 29/09/2015
Emissão do Relatório Final: 27/11/2015
Substância Teste: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Composição Química Declarada (unidade): [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Quantidade (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Nome Químico declarado da Subst. Teste (IUPAC ou CAS do princípio ativo): 98-55-5
Pureza declarada (princípio ativo): 90%
Homogeneidade: Líquido Homogêneo Límpido Amarelo

Diretor de Estudo: André Luiz Figueiredo Júnior
Biólogo
Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
São Paulo – SP CEP: 04164-001

NÍVEIS DE DOSE E CONCENTRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A substância teste originalmente na forma líquida que apresentou pH puro de $2,10 \pm 0,01$ foi utilizada diluída na proporção de 1 mL para 100 mL em água deionizada. A quantidade total de solução aplicada no olho de cada animal foi de 0,1 mL.

DADOS DO SISTEMA TESTE

Foram utilizados coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, possuindo de 2783 a 2851 gramas de peso vivo. A quantidade utilizada foi de 3 fêmeas nulíparas e não prenhes.

Os sistemas testes utilizados no presente estudo foram previamente avaliados nos aspectos clínico e dermatológicos e permitiram a reutilização dos mesmos, não interferindo na avaliação da substância teste e dessa forma não comprometendo a qualidade final dos resultados obtidos.

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F4 – 032038.R

RESULTADO

Análise dos Resultados

Cada animal foi avaliado separadamente tendo seus resultados registrados individualmente e relatados na Tabela 1.

A graduação da intensidade das reações oculares foi baseada no método de Kay e Calandra (modificado), que utiliza o sistema de graduação de Draize.

Graduação das reações oculares:

1. CÓRNEA:

A - Opacidade:

| | valor |
|--|-------|
| Sem opacidade | 0 |
| Área difusa ou disseminada, detalhes da íris claramente visíveis (perda de brilho) | 1 |
| Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros | 2 |
| Áreas opalescentes, nenhum detalhe da íris visível e tamanho da pupila pouco discernível | 3 |
| Córnea opaca, íris e pupila invisíveis | 4 |

B - Área da córnea envolvida:

| | |
|---------------------------|---|
| Nenhuma área comprometida | 0 |
| Até um quarto | 1 |
| De um quarto à metade | 2 |
| Da metade à três quartos | 3 |
| Acima de três quartos | 4 |

2. ÍRIS:

C - Valores:

| | |
|--|---|
| Normal | 0 |
| Raias com congestão, edema, reação à luz lenta (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas) | 1 |
| Nenhuma reação à luz, hemorragia, destruição, (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas) | 2 |

3. CONJUNTIVAS:

D – Hiperemia:

| | |
|--|---|
| Vasos normais | 0 |
| Congestão leve; vasos definidamente injetados acima do normal; | |
| Vasos distinguíveis individualmente | 1 |
| Congestão intensa mais difusa e vasos não discerníveis individualmente | 2 |
| Congestão intensa, vermelho escuro difuso | 3 |

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F4"

Página 2 de 6

DB-GIT 30.01

Suplemento Específico de Relatório Final

Revisado em 27/01/14

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F4 – 032038.R

E - Quemose:

| | |
|--|---|
| Ausência de edema | 0 |
| Edema acima do normal (incluindo a membrana nictante) | 1 |
| Edema evidente com eversão parcial das pálpebras | 2 |
| Edema com pálpebras semi fechadas, cobrindo a metade do olho | 3 |
| Edema com pálpebras completamente fechadas, cobrindo da metade ao fechamento total do olho | 4 |

F - Secreção:

| | |
|---|---|
| Ausência de secreção | 0 |
| Ligeiro aumento de lacrimejamento diferente do normal | 1 |
| Secreção com umedecimento das pálpebras e de pêlos adjacentes a estas | 2 |
| Secreção com umedecimento das pálpebras, pêlos e área considerável ao redor do olho | 3 |

Cálculo do índice de irritação ocular.

Fórmula: $(A \times B) \times 5 + (C \times 5) + [(D + E + F) \times 2]$

Em que:

| | |
|-------------------------------------|-------------------|
| Córnea: $A \times B \times 5$ | Total máximo = 80 |
| Íris: $C \times 5$ | Total máximo = 10 |
| Conjuntivas: $(D + E + F) \times 2$ | Total máximo = 20 |

Para estabelecer o Índice de Irritação Ocular, os valores para córnea, íris e conjuntivas foram somados (vide fórmula acima) nos respectivos tempos de leitura (1, 24, 48, 72 horas e 7 dias). Após obter-se a média dos tempos de leitura para o número de coelhos usados (3 coelhos), o mais alto índice estabelecido foi usado para classificar a substância teste de acordo com Tabela 2:

Tabela 2: Classificação de substância segundo índice de irritação Ocular.

| Índice de Irritação | Classificação |
|---------------------|-------------------------|
| 0 - 14,9 | Não irritante |
| 15 - 24,9 | Levemente irritante |
| 25 - 49,9 | Moderadamente irritante |
| 50 - 79,9 | Severamente irritante |
| 80 - 110,0 | Maximamente irritante |

Índice de irritabilidade ocular:

- Para 01, 24, 48, 72 horas e 7 dias: 0,0

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F4"

Página 3 de 6

DB-GIT 30.01

Suplemento Específico de Relatório Final

Revisado em 27/01/14

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
 F4 – 032038.R

Classificação:

- Não irritante.
- Sem irritação.

Tabela 1: Grau das lesões oculares dos animais para a substância teste.

| COELHO Nº 1 | | | | | | |
|--|---|------|------------|---|---|----------|
| CÓRNEA | | ÍRIS | CONJUNTIVA | | | TEMPO |
| A | B | C | D | E | F | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 HORA |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 DIAS |
| COELHO Nº 2 | | | | | | |
| CÓRNEA | | ÍRIS | CONJUNTIVA | | | TEMPO |
| A | B | C | D | E | F | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 HORA |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 DIAS |
| COELHO Nº 3 | | | | | | |
| CÓRNEA | | ÍRIS | CONJUNTIVA | | | TEMPO |
| A | B | C | D | E | F | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 HORA |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 HORAS |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 DIAS |
| Observações: Nada Digno de Nota (NDN). | | | | | | |

CONCLUSÃO

A substância teste originalmente na forma líquida apresentou índice de irritação ocular de 0,0, sendo considerada não irritante quando aplicada diluída na proporção de 1 mL para 100 mL em água deionizada por via ocular em coelhos.

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F4"

Página 4 de 6

DB-GIT 30.01

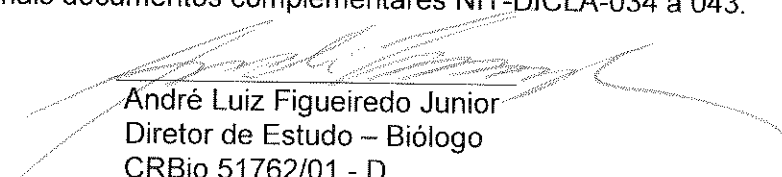
Suplemento Especifico de Relatório Final

Revisado em 27/01/14

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
“IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS”
 F4 – 032038.R

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e atende os requisitos da Norma NIT-DICLA-035 Rev.02 – Princípio das Boas Práticas de Laboratório – BPL. INMETRO, 2011 e demais documentos complementares NIT-DICLA-034 a 043.

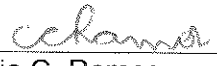

 André Luiz Figueiredo Junior
 Diretor de Estudo – Biólogo
 CRBio 51762/01 - D
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este Relatório Final foi avaliado pela Garantia da Qualidade e reflete com veracidade os Dados Brutos e o Plano de Estudo.

Declaro que foram realizadas inspeções, conforme abaixo descrito:

| Programa da Garantia da Qualidade | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Inspeção de Processo | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Fases críticas do estudo | 25/11/2013 - 03/12/2013 | 13/01/2014 | 13/01/2014 |
| Inspeção | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Instalação de Teste | 22/07/2013 - 24/07/2013 | 26/07/2013 | 26/07/2013 |
| Inspeção Documental | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Plano de Estudo | 22/07/2013 | 23/07/2013 | 23/07/2013 |
| Dados Brutos, Relatório Final | 27/11/2015 | 27/11/2015 | 27/11/2015 |


 Claudia C. Ramos
 Garantia da Qualidade
 CRQ – 04161558 – IV Região
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

“Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F4”
 Página 5 de 6

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
F4 – 032038.R

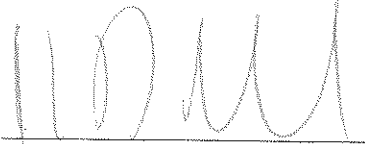
DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a nossa supervisão, conforme os procedimentos nele descritos.

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente a substância teste ensaiada. A amostragem é responsabilidade do Patrocinador.

A substância teste foi analisada como recebida, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio da substância teste.

É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação Teste
CRMV-SP 20396
Laboratórios Ecolyzer Ltda

=====

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F4"
Página 6 de 6

DB-GIT 30.01

Suplemento Específico de Relatório Final

Revisado em 27/01/14

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
F4

INSTALAÇÃO DE TESTE:

Razão Social: Laboratórios Ecolyzer Ltda.
Endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
CEP: 04164-001 – São Paulo – SP
Fone/Fax: (0xx11) 2969-5020
E -mail: ecolyzer@ecolyzer.com.br

RESUMO

O experimento de Irritação/Corrosão Ocular Primária em Coelhos é realizado para estudar os possíveis efeitos lesivos, reversíveis ou não, de uma substância teste sobre os olhos de coelhos. A substância teste é aplicada no saco conjuntival dos coelhos em um volume total de 0,1 mL. Os animais são mantidos por 7 dias subsequentes à aplicação e observados quanto à presença de lesões nas mucosas palpebrais e bulbares, bem como outras alterações locais e sistêmicas.

INTRODUÇÃO

A irritação ocular é a produção de alterações inflamatórias reversíveis, ao passo que a corrosão ocular é a produção de lesões teciduais irreversíveis após a aplicação de uma substância nos olhos.

OBJETIVO

O experimento de Irritação/Corrosão Ocular Primária em Coelhos tem como finalidade fornecer informações sobre o poder lesivo, reversível ou não, de uma substância sobre o olho destes animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Equipamentos

- Vidrarias de uso comum de laboratório
- Seringa descartável
- Balança digital

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Especifico"
F4 – 032038_R

DB-GIT 29.00

Página 1 de 3
Relatório Final Padronizado

Elaborado: 18/04/13

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
F4

Condições de teste

Os animais são aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. São mantidos com ventilação de 10 a 15 trocas de ar por sala por hora, temperatura entre 19 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 30 e 70 % e fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A dieta é constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. Os animais são mantidos individualmente em gaiolas de arame galvanizado.

Metodologia

Aproximadamente 24 horas antes do início do teste, os olhos dos animais a serem testados são examinados clinicamente para diagnóstico de alguma alteração indesejável que possa impossibilitar o animal para o teste. O volume total da substância teste é instilado no saco conjuntival após afastamento suave de ambas as pálpebras. Em seguida à aplicação, o olho é mantido fechado por alguns segundos a fim de distribuir a substância teste por todo globo ocular. O olho não tratado serve como controle negativo. No final do período de exposição, após 24 horas, o resíduo da substância teste aplicada é removido com água deionizada.

Os animais são mantidos por 7 dias subsequentes à aplicação sendo avaliados após 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias para a presença de lesões na córnea, íris e conjuntivas palpebrais e bulbares, bem como outras alterações locais e sistêmicas graves.

MÉTODO UTILIZADO

OECD, *Guidelines for Testing of Chemicals, Acute Eye Irritation/Corrosion*. Section 4: Health Effects, 405.24/04/2002. Pág. 1-14.

Referencias

INCQS n° 65.3330.004, rev. 5 – *Ensaio de Irritação Ocular: Leitura das reações oculares; Avaliação dos resultados*. Pág 1-14.

ANEXOS

Não aplicável.

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito n°9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F4 – 032038.R

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR PRIMÁRIA EM COELHOS"
F4

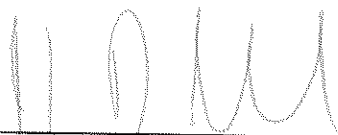
ARQUIVO E ARMAZENAMENTO

Este Relatório Final é emitido em duas vias, sendo uma enviada ao Patrocinador e a outra arquivada.

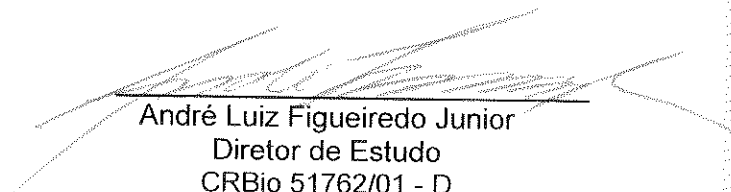
Os Dados Brutos, Plano de Estudo, Relatório Final e observações originais referentes a este estudo estão arquivados e disponíveis na empresa Arktec Guarda de Documentos, sob responsabilidade dos Laboratórios Ecolyzer Ltda, no seguinte endereço: Av. Gupe, 10565 - Barueri, SP – CEP: 06422-120. Os documentos ficam arquivados por um período de cinco anos a partir da data de entrada da Substância Teste na Instalação de Teste.

A Substância Teste permanece disponível nos Laboratórios Ecolyzer Ltda por um período de quatro meses a partir da data de emissão do Relatório Final, no seguinte endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – São Paulo, SP - CEP: 04164-001.

RESPONSÁVEIS



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação de Teste
CRMV-SP 20396
Ecolyzer



André Luiz Figueiredo Junior
Diretor de Estudo
CRBio 51762/01 - D
Ecolyzer



Claudia C. Ramos
Garantia da Qualidade
CRQ – 04161558 – IV Região
Ecolyzer

=====

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F4 – 032038.R

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
F111 – 032038.R

Patrocinador do Estudo: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA 13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Subst. Teste: 06/08/2015
Início do Experimento: 22/09/2015
Término do Experimento: 09/10/2015
Emissão do Relatório Final: 27/11/2015
Substância Teste: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL

Composição Química Declarada (unidade):

Quantidade (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Nome Químico declarado da Subst. Teste (IUPAC ou CAS do princípio ativo): 98-55-5
Pureza declarada (princípio ativo): 90%
Homogeneidade: Líquido Homogêneo Límpido Amarelo
Diretor de Estudo: André Luiz Figueiredo Júnior
Biólogo
Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
São Paulo – SP CEP: 04164-001

NÍVEIS DE DOSE E CONCENTRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A substância teste originalmente na forma líquida foi utilizada diluída na proporção de 1 mL para 100mL em água deionizada.

- Pré teste: concentração de 1000 mg/mL (dose de 2000 mg/Kg).
- Teste definitivo: concentração de 1000 mg/mL (dose de 2000 mg/Kg).

DADOS DO SISTEMA TESTE

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) fêmeas nulíparas e não prenhes, da linhagem Wistar, adultas com idade entre 8 a 12 semanas no início do experimento, possuindo de 170 a 189 g de peso vivo.

RESULTADO

Número de mortes:

- Dose 1 – Pré teste (2000 mg/Kg): 0
- Dose 1 – Definitiva (2000 mg/Kg): 0

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F111"

Página 1 de 3

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
F111 – 032038.R

Dose Letal Média (DL₅₀):

- Fêmeas: > 2000 mg/Kg (P.V.).

Intervalo de Confiança a 95%:

- Não calculado.

Sinais clínicos:

- Dose 1 – Pré teste: O animal não apresentou sinais clínicos de toxicidade.
- Dose 1 – Definitiva: Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade.

Anatomopatológico (macroscópico):

Animais que obtiveram óbito:

- Não foram observadas mortes.

Sobreviventes:

- Sistema respiratório: NDN até a dose de 2000 mg/Kg de P.V.
- Sistema cardio-vascular: NDN até a dose de 2000 mg/Kg de P.V.
- Sistema nervoso central: não pesquisado.
- Sistema digestório: NDN até a dose de 2000 mg/Kg de P.V.
- Sistema gênito urinário: NDN até a dose de 2000 mg/Kg de P.V.
- Outros (fígado e baço): NDN até a dose de 2000 mg/Kg de P.V.

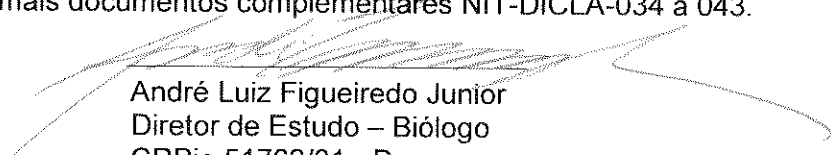
OBS: NDN = Nada Digno de Nota

CONCLUSÃO

A substância teste apresentou Dose Letal Média (DL₅₀), para ratos fêmeas brancos, maior que 2000 mg/kg de peso vivo quando administrada diluída na proporção de 1mL para 100mL em água deionizada por via oral, o que permite classificar a substância teste na classe toxicológica V. Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade após exposição à substância teste.

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e atende os requisitos da Norma NIT-DICLA-035 Rev.02 – Princípio das Boas Práticas de Laboratório – BPL. INMETRO, 2011 e demais documentos complementares NIT-DICLA-034 a 043.


André Luiz Figueiredo Júnior
Diretor de Estudo – Biólogo
CRBio 51762/01 - D
Laboratórios Ecolyzer Ltda

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F111"
Página 2 de 3

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
 F111 – 032038.R

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este Relatório Final foi avaliado pela Garantia da Qualidade e reflete com veracidade os Dados Brutos e o Plano de Estudo.
 Declaro que foram realizadas inspeções, conforme abaixo descrito:

| Programa da Garantia da Qualidade | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Inspeção de Processo | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Fases críticas do estudo | 26/11/2013 - 13/12/2013 | 13/01/2014 | 13/01/2014 |
| Inspeção | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Instalação de Teste | 22/07/2013 - 24/07/2013 | 26/07/2013 | 26/07/2013 |
| Inspeção Documental | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Plano de Estudo | 22/07/2013 | 23/07/2013 | 23/07/2013 |
| Dados Brutos, Relatório Final | 14/09/2015 | 14/09/2015 | 14/09/2015 |



Claudia C. Ramos
 Garantia da Qualidade
 CRQ – 04161558 – IV Região
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

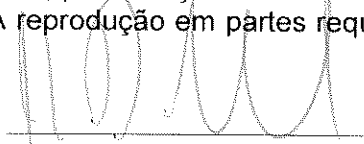
DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a nossa supervisão, conforme os procedimentos nele descritos.

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente a substância teste ensaiada. A amostragem é responsabilidade do Patrocinador.

A substância teste foi analisada como recebida, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio da substância teste.

É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.



Gláucio Pereira Machado
 Gerente da Instalação Teste
 CRMV-SP 20396
 Laboratórios Ecolyzer Ltda

=====

"Este Suplemento Especifico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F111"

Página 3 de 3

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
F111

INSTALAÇÃO DE TESTE:

Razão Social: Laboratórios Ecolyzer Ltda.
Endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
CEP: 04164-001 – São Paulo – SP
Fone/Fax: (0xx11) 2969-5020
E -mail: ecolyzer@ecolyzer.com.br

RESUMO

O experimento de Toxicidade Oral Aguda – Dose Fixa para ratos é conduzido para estudar os possíveis efeitos tóxicos da substância teste. A substância teste é administrada, por via oral, a ratos de 8 a 12 semanas de idade, em uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de PV (peso vivo) no pré teste. Os animais são observados quanto ao tempo em que venham a óbito, alterações comportamentais, sinais clínicos e achados anatomopatológicos macroscópicos. O teste definitivo é realizado em uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg a partir dos resultados do pré teste. Ao final do experimento a substância teste é classificada em sua classe toxicológica.

INTRODUÇÃO

Dose Letal Média Oral (DL_{50} oral) é definida como a quantidade de uma substância, expressa em mg do produto por Kg de peso vivo, necessária para matar 50% de uma população de animais submetidos a uma única administração via oral dentro de um curto período de tempo.

Toxicidade oral aguda constitui-se na soma de efeitos adversos ocorridos em um pequeno espaço de tempo após aplicação via oral de uma única dose da substância-teste.

Dose é a quantidade de substância administrada. A dose é expressa como peso da substância por unidade do peso do animal testado (ex: mg/Kg).

OBJETIVO

O experimento de Toxicidade oral aguda para ratos – dose fixa tem como finalidade avaliar as características toxicológicas de uma substância, fornecendo informações sobre os riscos à saúde de uma exposição aguda por via oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Equipamentos

- Balança Digital
- Vidrarias de uso comum de laboratório
- Sonda rígida
- Seringa descartável

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F111 – 032038.R

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
F111

Condições de teste

Os animais são aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. São mantidos com ventilação de 10 a 15 trocas de ar por sala por hora, temperatura entre 19 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 30 e 70 % e fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A dieta é constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. Os animais são distribuídos inteiramente ao acaso em caixas de polipropileno, cobertas por grade metálica e forradas com maravalha de madeira, com número máximo de 5 animais por caixa.

Metodologia

Os animais são submetidos a jejum nutricional de aproximadamente 12 horas (período noturno). Após esta etapa são pesados individualmente, e então após os cálculos para se determinar as doses utilizadas, a substância teste é administrada aos animais por via oral em dose única.

Os animais são observados diariamente e avaliados clinicamente quanto aos sinais clínicos sistêmicos e alterações de comportamento, durante 14 dias após a aplicação da substância teste, sendo anotados o início, grau e duração dos sintomas. Estes achados são baseados principalmente nos exames de pele, pêlos, olhos, mucosas, sistemas circulatório, respiratório, nervoso, atividade somatomotora e comportamental. Os animais são pesados no início e ao final do experimento. Os sobreviventes são eutanasiados e necropsiados após os 14 dias de teste.

A necropsia de todos os animais em teste é realizada, com especial atenção ao exame macroscópico dos órgãos coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, rins, baço e glândulas supra renais.

Pré Teste

Primeiramente é realizada uma pré análise, utilizando-se 1 animal para cada dose. O teste é iniciado em uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de PV (peso vivo). A partir do resultado dos parâmetros observados durante o experimento, como mortalidade e sinais clínicos de toxicidade, é aplicada uma nova dose ou já estará definida a dose inicial do teste definitivo.

Teste Definitivo

Para esta segunda etapa são utilizados 5 animais por dose. O teste inicia em uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg; a partir dos resultados do pré teste. Os parâmetros observados nos animais são mortalidade e sinais clínicos de toxicidade. A partir destas observações a substância teste é classificada de acordo com a tabela do GHS. (Tabela 1)

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F111 – 032038.R

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
 F111

Tabela 1: Classificação de risco toxicológico agudo segundo o GHS (Globally Harmonised Classification System - OECD).

| Classe Toxicológica | Dose Letal Média (DL₅₀) |
|----------------------------|---|
| I | (> 0 - 5 mg/Kg) |
| II | (> 5 – 50 mg/Kg) |
| III | (> 50-300 mg/Kg) |
| IV | (> 300 – 2000 mg/Kg) |
| V | (> 2000 mg/Kg) |

MÉTODO UTILIZADO

OECD, Guideline For Testing Of Chemicals, **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**, Section 4: Health Effects, 420, 17/12/2001. Pág. 1-14.

ANEXOS

Não aplicável.

ARQUIVO E ARMAZENAMENTO

Este Relatório Final é emitido em duas vias, sendo uma enviada ao Patrocinador e a outra arquivada.

Os Dados Brutos, Plano de Estudo, Relatório Final e observações originais referentes a este estudo estão arquivados e disponíveis na empresa Arktec Guarda de Documentos, sob responsabilidade dos Laboratórios Ecolyzer Ltda, no seguinte endereço: Av. Gupe, 10565 - Barueri, SP – CEP: 06422-120. Os documentos ficam arquivados por um período de cinco anos a partir da data de entrada da Substância Teste na Instalação de Teste.

A Substância Teste permanece disponível nos Laboratórios Ecolyzer Ltda por um período de quatro meses a partir da data de emissão do Relatório Final, no seguinte endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – São Paulo, SP - CEP: 04164-001.

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
 F111 – 032038.R

DB-GIT 29.00

Página 3 de 4
 Relatório Final Padronizado

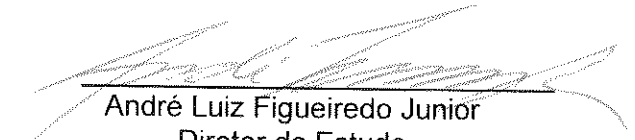
Elaborado: 18/04/13

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS – DOSE FIXA"
F111


RESPONSÁVEIS



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação de Teste
CRMV-SP 20396
Ecolyzer



André Luiz Figueiredo Junior
Diretor de Estudo
CRBio 51762/01 - D
Ecolyzer



Claudia C. Ramos
Garantia da Qualidade
CRQ – 04161558 – IV Região
Ecolyzer

=====

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Especifico"
F111 – 032038.R

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31 – 032038.R

Patrocinador do Estudo: TERPENOIL TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA 13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Subst. Teste: 06/08/2015
Início do Experimento: 22/09/2015
Término do Experimento: 07/10/2015
Emissão do Relatório Final: 27/11/2015
Substância Teste: [REDACTED]

Composição Química Declarada (unidade): [REDACTED]

Quantidade (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Nome Químico declarado da Subst. Teste (IUPAC ou CAS do princípio ativo): 98-55-5
Pureza declarada (princípio ativo): 90%
Homogeneidade: Líquido Homogêneo Límpido Amarelo

Diretor de Estudo: André Luiz Figueiredo Júnior
Biólogo
Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
São Paulo – SP CEP: 04164-001

NÍVEIS DE DOSE E CONCENTRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A substância teste originalmente na forma líquida foi aplicada pura na concentração de 1000 mg/mL. Aliquotas apropriadas da substância teste foram aplicadas topicamente nos animais de modo a se obter a dose de 2000 mg/kg de peso vivo.

DADOS DO SISTEMA TESTE

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, adultos com idade entre 8 a 12 semanas no início do experimento, possuindo os machos de 251 a 271 g e as fêmeas nulíparas e não prenhes de 170 a 178 g de peso vivo.

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31 – 032038.R

RESULTADO

Análise estatística e classificação da substância teste.

Não foi necessário, neste caso, a avaliação dos resultados de acordo com o método de Thompson & Weil (1952) das Médias Móveis com Interpolação, método usado para cálculo da Dose Letal Média (DL₅₀), curva dose resposta e do intervalo de confiança, pois não foram observadas mortes na dose máxima de 2000 mg/kg.

Número de mortes:

- Machos - Dose 1 (2000 mg/kg): 0
- Fêmeas - Dose 1 (2000 mg/kg): 0
- Total - Dose 1 (2000 mg/kg): 0

Dose Letal Média (DL₅₀):

- Machos: > 2000 mg/kg de Peso Vivo (P.V.).
- Fêmeas: > 2000 mg/kg de Peso Vivo (P.V.).
- Total: > 2000 mg/kg de Peso Vivo (P.V.).

Intervalo de Confiança a 95%:

- Machos: Não calculado.
- Fêmeas: Não calculado.
- Total: Não calculado.

Sinais clínicos:

- Os animais não apresentaram sinais clínicos compatíveis aos de toxicidade.

Anatomopatológico (macroscópico):

Animais que obtiveram óbito:

- Não foram observadas mortes.

Sobreviventes:

- Sistema respiratório: NDN até a dose de 2000 mg/kg de P.V.
- Sistema cardio-vascular: NDN até a dose de 2000 mg/kg de P.V.
- Sistema nervoso central: não pesquisado.
- Sistema digestório: NDN até a dose de 2000 mg/kg de P.V.
- Sistema gênito urinário: NDN até a dose de 2000 mg/kg de P.V.
- Outros (fígado e baço): NDN até a dose de 2000 mg/kg de P.V.

OBS: NDN = Nada Digno de Nota

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F31"

Página 2 de 4

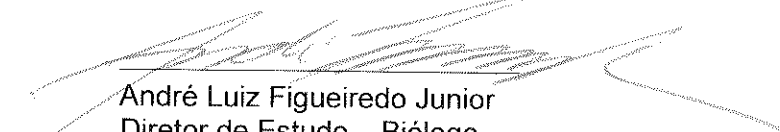
SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31 – 032038.R

CONCLUSÃO

A substância teste apresentou Dose Letal Média (DL₅₀), para ratos machos e fêmeas brancos, maior que 2000 mg/kg de peso vivo quando aplicada pura por via dermal. Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade após exposição à substância teste.

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e atende os requisitos da Norma NIT-DICLA-035 Rev.02 – Princípio das Boas Práticas de Laboratório – BPL. INMETRO, 2011 e demais documentos complementares NIT-DICLA-034 a 043.



André Luiz Figueiredo Junior
Diretor de Estudo – Biólogo
CRBio 51762/01 - D
Laboratórios Ecolyzer Ltda

DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este Relatório Final foi avaliado pela Garantia da Qualidade e reflete com veracidade os Dados Brutos e o Plano de Estudo.

Declaro que foram realizadas inspeções, conforme abaixo descrito:

| Programa da Garantia da Qualidade | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Inspeção de Processo | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Fases críticas do estudo | 26/11/2013 - 11/12/2013 | 13/01/2014 | 13/01/2014 |
| Inspeção | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Instalação de Teste | 22/07/2013 - 24/07/2013 | 26/07/2013 | 26/07/2013 |
| Inspeção Documental | Data da realização | Data do relato ao Diretor de Estudo | Data do relato a Gerencia da Instalação de Teste |
| Plano de Estudo | 22/07/2013 | 23/07/2013 | 23/07/2013 |
| Dados Brutos, Relatório Final | 27/11/2015 | 27/11/2015 | 27/11/2015 |


Claudia C. Ramos
Garantia da Qualidade
CRQ – 04161558 – IV Região
Laboratórios Ecolyzer Ltda

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F31"
Página 3 de 4

SUPLEMENTO ESPECÍFICO DE RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31 – 032038.R

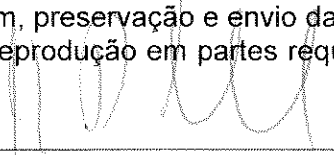
DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a nossa supervisão, conforme os procedimentos nele descritos.

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente a substância teste ensaiada. A amostragem é responsabilidade do Patrocinador.

A substância teste foi analisada como recebida, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio da substância teste.

É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação Teste
CRMV-SP 20396
Laboratórios Ecolyzer Ltda

=====

"Este Suplemento Específico de Relatório Final é parte integrante do Relatório Final Padronizado – F31"
Página 4 de 4

DB-GIT 30.01

Suplemento Específico de Relatório Final


Revisado em 27/01/14

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31

INSTALAÇÃO DE TESTE:

Razão Social: Laboratórios Ecolyzer Ltda.
Endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – Vila das Mercês
CEP: 04164-001 – São Paulo – SP
Fone/Fax: (0xx11) 2969-5020
E -mail: ecolyzer@ecolyzer.com.br

RESUMO

O experimento de Toxicidade Dermal Aguda para ratos é conduzido a fim de estudar os possíveis efeitos tóxicos da substância teste. A substância teste é aplicada e administrada topicamente no dorso de ratos com 8 a 12 semanas de idade na dose inicial de 2000 mg/kg de peso vivo. Os animais são observados quanto ao tempo em que vierem a óbito, alterações comportamentais, sinais clínicos e achados anatomopatológicos macroscópicos.

INTRODUÇÃO

Dose Letal Média Dermal (DL₅₀ dermal) é definida como a quantidade que uma substância, expressa em mg do produto por kg de peso vivo, necessita para matar 50% de uma população de animais submetidos a uma única administração via dermal dentro de um período curto de tempo.

Toxicidade dermal aguda constitui-se na soma de efeitos adversos ocorridos em um pequeno espaço de tempo após aplicação via dermal de uma única dose da substância-teste.

Dose é a quantidade de substância administrada. A dose é expressa como peso da substância por unidade do peso do animal testado (ex: mg/kg).

OBJETIVO

O experimento de Toxicidade dermal aguda para ratos tem como finalidade avaliar as características toxicológicas de uma substância, fornecendo informações sobre os riscos à saúde de uma exposição aguda via dermal desta substância.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Equipamentos

- Balança Digital
- Vidrarias de uso comum de laboratório
- Máquina de tosa
- Seringa descartável
- Gaze/patch oclusivo

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F31 – 032038.R

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31

Condições de teste

Os animais são aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. São mantidos com ventilação de 10 a 15 trocas de ar por sala por hora, temperatura entre 19 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 30 e 70 % e fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A dieta é constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. São utilizados 10 animais por dose, 5 de cada sexo, sendo distribuídos inteiramente ao acaso em caixas de polipropileno cobertas por grade metálica e forradas com maravalha de madeira, com número máximo de 5 animais por caixa.

Metodologia

Aproximadamente 24 horas antes da aplicação da substância teste, os pêlos da região dorsal são removidos com máquina de tosa cuidadosamente para não ferir e/ou irritar a pele.

Os animais são pesados individualmente, e então após os cálculos para se determinar as doses utilizadas, a substância teste é administrada aos animais via tópica na pele do dorso em dose única.

Os animais são observados diariamente e avaliados clinicamente quanto aos sinais clínicos sistêmicos e alterações de comportamento, durante 14 dias após a aplicação da substância teste, sendo anotados o início, grau e duração dos sintomas. Estes achados são baseados principalmente nos exames de pele, pêlos, olhos, mucosas, sistemas circulatório, respiratório, nervoso, atividade somatomotora e comportamental. Os animais são pesados no início e ao final do experimento. Os sobreviventes são eutanasiados e necropsiados após os 14 dias de teste.

A necropsia de todos os animais em teste é realizada, com especial atenção ao exame macroscópico dos órgãos coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, rins, baço e glândulas supra renais.

MÉTODO UTILIZADO

OECD, Guideline For Testing Of Chemicals. **Acute Dermal Toxicity**. Section 4: Health Effects, 402, 24/02/1987. Pág. 1-7

ANEXOS

Não aplicável.

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F31 – 032038.R

RELATÓRIO FINAL PADRONIZADO
"TOXICIDADE DERMAL AGUDA EM RATOS"
F31

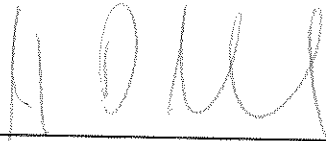
ARQUIVO E ARMAZENAMENTO

Este Relatório Final é emitido em duas vias, sendo uma enviada ao Patrocinador e a outra arquivada.

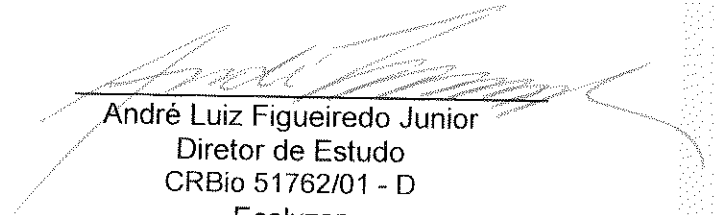
Os Dados Brutos, Plano de Estudo, Relatório Final e observações originais referentes a este estudo estão arquivados e disponíveis na empresa Arktec Guarda de Documentos, sob responsabilidade dos Laboratórios Ecolyzer Ltda, no seguinte endereço: Av. Gupe, 10565 - Barueri, SP – CEP: 06422-120. Os documentos ficam arquivados por um período de cinco anos a partir da data de entrada da Substância Teste na Instalação de Teste.

A Substância Teste permanece disponível nos Laboratórios Ecolyzer Ltda por um período de quatro meses a partir da data de emissão do Relatório Final, no seguinte endereço: Rua Romão Puiggari, 898 – São Paulo, SP - CEP: 04164-001.


RESPONSÁVEIS



Gláucio Pereira Machado
Gerente da Instalação de Teste
CRMV-SP 20396
Ecolyzer



André Luiz Figueiredo Junior
Diretor de Estudo
CRBio 51762/01 - D
Ecolyzer



Claudia C. Ramos
Garantia da Qualidade
CRQ – 04161558 – IV Região
Ecolyzer

=====

"Este Relatório Final Padronizado atende ao requisito nº9 "Relato dos Resultados de Estudo" da NIT-DICLA 037 "Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração".

"Este Relatório Final Padronizado só é considerado válido como Relatório Final quando integrado ao Suplemento Específico"
F31 – 032038.R

Title: Antifungal and antibacterial activity of for improvement of indoor air quality

Short running title Reducing air microbial burden by

Authors: Dulcilena de Matos Castro Silva¹, Lucas Xavier Bonfietti¹, Raquel Keiko de Luca Ito³; Maria Walderez Szeszs¹, Artur Luiz Rocha², Edson Abdala³, Marcia de Souza Carvalho Melhem^{1,4}

Author's institutional affiliations: ¹Instituto Adolfo Lutz, Secretary of Health, Government of Sao Paulo State, Brazil; ²Terpenoil Tecnologia Orgânica, Jundiaí City, Sao Paulo State, Brazil; ³Cancer Institute of Sao Paulo State, Brazil; ⁴Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil

□ Corresponding author: Marcia S.C.Melhem
melhemmr@uol.com.br

Acknowledgments: We thank Andres Avelino Baez and Mirian Randó for their excellent technical assistance.

Abstract

Purpose of Review. We summarized the studies on the usage of and some essential oils on mold and bacterial concentrations in air samples. There was a strong action of the product to decrease total microbial load. The investigation of antifungal activity in indoor environments validates the translation of laboratory-based outcomes showing a statistically significant reduction of bacterial and fungal concentration in the tested areas

Recent Findings has recently generated interest for its *in vitro* antimicrobial efficacy but has not been widely evaluated *in situ*. There are limited studies that scale-up laboratory experiments and assess the efficiency of antimicrobial agents within building environments. Our findings provide a basis to reduce microbial burden, including drug-resistant fungi, by washing the indoor air with a solution. This strategy could diminish health adverse effects, such as allergy or pulmonary infection, produced by inhalation of etiologic agents.

Summary have an effect on the indoor microbial burden and may be used to reduce fungal and bacterial contaminants in workplaces, hospital and houses.

Keywords: airborne microbes, fungicidal, fungi, antifungal resistance, asthma, occupational exposure

Introduction

Air quality is a critical factor in indoor space, and bioaerosols including bacteria, fungi, besides viruses and pollens, represent an important factor that influences indoor air quality^{1,2}. Bioaerosol exposure can lead to several pathologies, hence additional monitoring should be performed to evaluate the effectiveness of implemented measures, and as a way to consider alternative strategies if the contamination problems remain. Fungi as ubiquitous microorganisms, is part of indoor bioaerosols and early intervention for fungal contamination is essential to avoid visible fungal growth requiring more severe professional remediation

measures^{3,4}. Improper indoor air quality may lead to infections, hospital syndrome, and various occupational risks demanding contamination management. Control measures include dehumidification of the air and high-efficiency particulate arrestor filtration in critical settings. Upper-room ultraviolet light and negative air ionization to prevent bacterial transmission were also previously reported. Potential excess moisture indoors must be low or controlled by ventilation to prevent condensation inside the structures⁵. Chemical control by reducing fungal burden in indoor environments is proposed, and the potential for essential oils to reduce fungi is gaining interest as they are seen as a “natural” alternative to synthetic chemical fungicides⁶.

Antifungal activity of essential oils for clean the atmospheric air

Some evidence supports the existing antifungal properties of essential oils from the clove, tea tree, oregano, thyme, heartwood, marjoram, cinnamon, lemon, lemon basil, caraway, bay tree, fir, peppermint, pine, cedar leaf and manuka. Essential oils are extensively employed in medicine and in the food industry for their antimicrobial properties. Data on their use for control of indoor air quality is limited since information exists mainly on the analysis of their effectiveness against fungal isolates from indoor environments. However, there are limited studies or advice on essential oils suitable for indoor bacterial or fungi control. So, we assessed fungal and bacterial contamination in 4 indoor settings, before and after cleaning procedures with a commercially available cleaning product (Swash®, Terpenoil, Br) agent to analyze the effectiveness of this procedure. The cleaning agent included plant-derived compounds resulting in a blend of terpenes. We also assessed the potential for the 24h-term antifungal that affect the product in the indoor atmosphere. Additionally, the diversity and antifungal profile of the microbiota from indoor air were characterized. The air sampling procedures included of 250 L of air (Merck® Mas-100 equipment), collected through an impaction method, which is a process in which particles are removed from an air stream. The trials were 24 hours in duration, beginning with a single sampling before apply air-cleaning measures followed by atmospheric air sampling performed every 3 hours, totaling 8 samples per each study site. For counting of fungi, we used the culture medium Dicloran Rosa Bengal (Difco, USA) and for counting of bacteria, chromogenic media (CHROMagar Orientation Medium, Beckton Dickinson, USA) was employed. The fungal colonies representing the dominant morphotype of filamentous fungus, after 4 weeks of incubation, were characterized to genus or species level⁷. Species of the genera with potential medical interest were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, USA) method⁸. Factors recorded simultaneously to sampling included temperature and relative humidity (Digital Termo-Hygrometer Internal/External Temperatures -10+60°C, Incoterm, Brazil). The equipment FB 30 Swash® (Terpenoil, Br) was used to wash the air, in a continuous regimen of 24 h, of four distinct indoor environments located in the São Paulo City region, Brazil. The equipment releases a mixture of in an aqueous concentration of 0.5%, as a strategy of washing the atmospheric air. It used for atmospheric air washing has a 1 L reservoir, a flow rate of 40 m³ /h, suitable for manual transport (small size) and for use in environments up to 30 m². Its operation is based on air collection, washing of the air with the solution and return of the air to the environment. It was fired upon completion of the first air collection (time zero) exactly at midday time every experiment-day. The total air microbial load ranged from 164 CFU/m³ to 1788 CFU/m³ before cleaning and from 124 CFU/m³ to 200 CFU/m³ after cleaning. Regarding bacterial and fungal, the initial (before cleaning) were 116 CFU/m³ and 48 CFU/m³ and final load (after cleaning) were 60 CFU/m³ and 0 CFU/m³. When comparing CFU/m³ on air before and after cleaning statistically significant differences were detected taken account of all 4 indoor tested areas. Residential rural house presented higher fungal air load with results that ranged

from 1304 CFU/m³ to 48 CFU/m³, before and after cleaning, respectively. Air from residential urban house harbors the higher bacterial load before cleaning (760 CFU/m³) decreasing to 120 CFU/m³ after the cleaning procedures. The measured workplace presented initially 360CFU/m³ of fungal load and 504CFU/m³ of bacterial load and, after cleaning the load were 48 CFU/m³ for fungi and 140CFU/m³ for bacteria. Taken together these findings showed microbial burden decrease in each measure place, but the degree of reduction of microbial load regarding individual indoor setting was not statistically significant. In respect to all four tested settings the number of colonies forming units per m³ (CFU/m³) for the microorganisms in relation to the exposure time to terpenes, Figure 1 was constructed a graph of the log x log type using the logarithmic adjustment as a trend line. We verified that the use of the log x log approach was more feasible, that is, it showed a very good fit between the evaluated points, which are evidenced by the excellent value of the correlation coefficient (0.9807), and the curve obtained was extremely interesting. Temperatures during the sampled day ranged from 24 to 26°C in residential urban house, 20-21,5°C in hospital, 19-22.7°C in a residential rural house, and stable at 26°C in the air-conditioned area of the workplace. The relative humidity was similar for residential houses (urban and rural) and hospital setting (mean range 62.8-67.1 %), but superior to that measured in the workplace room (mean 53.7%). Diversity and the pathogenic potential of the mycobiota cultivable from indoor air samples were assessed. The methodology MALDI-TOF (BD) was useful for identifying *Aspergillus* species (*A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) besides *Curvularia curvata* and *Trichoderma koningii*. Isolates of other genera, including some of the toxigenic relevance like *Penicillium*, could not take advantage of this method to clarify species. Before cleaning procedures, 7 different genera/species of fungi were identified in air samples, being *A. niger* (22.1%), *Neurospora* spp. (22.1%), *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Mycelia sterilia*, *Penicillium* spp. and *Nigrospora* spp. (11.2%, each one). After cleaning procedures, 10 different genera/species of fungi were identified in air samples with three (*Curvularia clavata*, *Trichoderma koningii* and *Cladophyalophora* spp.; 2% each one) different were identified. Using the microdilution broth reference methodology we assessed the antifungal susceptibility of 29 air indoor fungi and found all 8 *Penicillium* spp. morphotype two isolate showing high MICs for different antifungal chemical classes and MICs above the maximum (8 mg/L) concentration value tested for either itraconazole, voriconazole and amphotericin B¹. Furthermore, isolates showed high MICs to Amphotericin B were found in *A. fumigatus* (1/5; 20%) and *A. flavus* (3/7, 42.9%) as showed in Table 1. The inhibitory activity of the blend against the 29 fungal isolates recovered from environmental indoor air was depicted in Table 2.

Fungal Bioaerosols Monitoring

Current bioaerosols studies are primarily focused on the monitoring and control of target bioaerosols that requires the efficient collection of microorganisms from the air. A wide variety of bioaerosols sampling methods is available, and no standard protocols (e.g., air CFU/m³ versus dust CFU/g sampling) have been established up to now. Principal sampling methods are filtration, impaction, and liquid impingement, being filtration one of the most widely used for atmospheric analysis⁹. An appropriate technique for air sample analysis was selected for our study involving pumping air through a porous membrane filter to capture bioaerosols. The advantages of this method include suitability for culture-dependent studies, low cost and portability and efficient trapping of microorganisms (~95%) as small as 0.035 µm in diameter¹⁰. Thus, the filtration system employed in our study allowed an efficient collection of bioaerosols, from bacteria to fungi. The bioaerosols that were captured remains viable and grew on the surface of a Petri dish containing nutrient agar. The airflow over the nutrient agar was controlled by holes that are arranged to distribute the airflow evenly over the agar resulting in unit-forming

colonies served for counting. Total count enumeration methods are laborious, and the identification of microorganisms is problematic. So, we focused on fungi identification and characterization regarding resistance to antifungal compounds. Fungi and bacteria are mainly quantified as groups using a variety of viable and nonviable assessment methods¹¹. Although some studies have recently applied culture-independent methods (high throughput amplicon sequencing to target 16S rRNA genes in bacteria/archaea or ITS rRNA in fungi), the traditional culture methods have typically been established by standard methods to identify recovered from built environment microorganisms and microbial hazards¹². Limitations of molecular methods include the necessity of additional genetic markers for robust species-level identification in several fungal genera regularly sampled, such as *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Penicillium*, that show little or no ITS variation across sets of species^{13,14}. Traditional cultures derived methods from indoor sampling have recognized about 90 species of common indoor fungi¹⁵ in contrast with high-throughput DNA sequencing that revealed a vast diversity of indoor fungi up to four 4,500 fungal operational taxonomic units^{16,17}. Indeed, conventional culture-dependent methods have some limitations for environmental studies. Microorganisms that are not culturable under our specific growth conditions remain undetected and even may induce adverse health effects. The stress of aerosolization and sampling may also result in a loss of cultivability. The losses of microbial load were difficult to assess and may vary within and among species. Cell debris, dead microorganisms and microbial components, which may also have toxic and/or allergenic properties were not detected in this study due to the traditional culture-based methods adopted^{18,19}. Fungal spores are complex agents that may contain multiple hazardous components, producing different allergens and mycotoxins, and some of them can infect humans³. A variety of fungal components that have been identified in air includes mycotoxins, ergosterol, glucans, and microbial volatile organic compounds that require unique analysis methods not feasible for our study. In the indoor environments, respiratory conditions, such as wheeze, cough, asthma, have been not only associated to fungi spores but to these biologic components, and within high fungal density buildings infections and intoxications have been reported^{20,21}. Furthermore, hyphae fragments and sub micrometer fragments dormant and passively distributed are of significant interest with regard to health because they remain in the air longer and are easily inhaled^{22,23}.

Among different types of bioaerosols, fungus plays an important role in human health, such as eczema development and other clinical issues²⁴⁻²⁶. Airborne fungi contribute to onset or worsening of allergic responses include rhinitis, eye irritation, cough and asthma which is of emerging significance given that the incidence of asthma in children from developed countries is increasing¹¹. Other unwanted processes in consequence of high fungal indoor load are food spoilage and wall staining. Bacterial and fungal bioaerosols in indoor air environments also contribute to microbial superficial load of nosocomial pathogens that can persist on inanimate surfaces for variable periods²⁷. So, reduction of indoor microbial contamination includes treatment of surfaces with an antifungal product, in addition, to remove any visible mould contamination, and steps to prevent moisture build-up, which enables future fungal growth. Human exposition to bioaerosols may lead to diseases and monitoring activities should be performed to assess the effectiveness of control measures.

The air treatment of indoor environments with an antifungal agent, in conjunction with variable sanitary actions, will improve indoor air quality. An antifungal agent is a compound used to kill or inhibit the growth of fungi and those recommended for indoor environments should be non-toxic to humans, odorless and hypoallergenic²⁸. Moreover, the antifungal agent should provide long-term protection to avoid fungal re-growth, especially in humid or moist environments²⁹⁻³¹. As such, essential oils are biosynthesized by plants and are composed of

complex mixtures of volatile compounds, mainly, terpenoids and aromatic and aliphatic constituents, characterized by low molecular weight, that showed antibacterial and antifungal action^{3,32,33}.

Our increased interest in these natural substances moves us to perform an investigation on the antifungal potential of a blend of to improve indoor air quality for building occupants. Of note, the concentration of in the cleaning product is so adequate that we did not observed significant odor effect resulting in small effect on sensory attributes as early reported^{28,34}. When considering all 4 settings together in principal coordinate analyses, we demonstrated a strong antimicrobial capability of blend. Before the cleaning procedures, microbial load differences were within a large range in the four measured areas, and the hospital setting had a significantly lower level of microorganism concentration. A drastic effect of reduction in microbial burden seems in the first 3 to 6 hours of cleaning procedures in residential urban and rural houses and workplace room. After the 6h-cleaning procedures, the microbial differences across the indoor measured locals were moderately stable. Similar results were reported previously³⁵. Su et al. (2011)³⁶ investigated the antifungal efficacy of essential oils by evaporating essential oil in indoor rooms and measuring the changes in the air. Higher concentrations essential oil was required to delay fungal growth and the authors reported a synergic inhibitory effect of the surrounding oil vapor. It is difficult to translate these experimental findings into real-world recommendations in view of the scarcity of studies that could empower the data.

According to the setup design, the equipment should have been maintained washing procedures continuously throughout the entire 24h-intervention period. However, the data showed that both bacterial and fungal oscillated up and down during short-time periods for unknown reasons. Even with this fluctuation, the final result is favorable to the best performance of the cleaning method. Indeed, possible bioaerosols from structures would have influenced the indoor conditions and might have affected the microbial burden along the day. Possibly, disturbance due to entrance of people, or air flow pressure inside the sampled settings generated uncontrolled effects on the cleaning process. The measured sites were unoccupied during experimental period, but the technician entrance and the necessary sampling procedures could have a direct impact on the microbial load. Indeed, the number of people and kind of human activities influences the concentration of bacterial and fungal bioaerosols³⁷. The air sampling period impact the microbial composition, being long sampling period, as weeks, yielding shift towards human-associated bacteria in high-occupancy buildings, while hours-based sampling periods in high outdoor ventilation demonstrating little effect of human occupancy on indoor aerial micro biota³⁸⁻⁴¹.

In particular, residential indoor fungi can be found in dust, furniture, carpets which act as sources for re-suspension of fungal particles into the air may play a role in the microbial load variation⁴². In a study focusing on fungal species, only half of the species found in the house dust were also detected in the indoor air⁴³. The effect of carpet is seeming also in retain dust associated to fungal material and may depend on the carpet structure, as loop-pile-type carpet was found to retain more dust cut pile counterpart⁴⁴. In many studies, higher fungal levels were more related to carpets than with smooth flooring^{18,45-48}. In residences and workplaces carpets is indeed a significant sink of fungi, nevertheless; however, the presence of carpeting did not always correlate with higher levels of fungi in indoor air^{49,50}. In the 1-year study with schools with carpeted and tile flooring although airborne concentrations of culturable fungi were significantly lower in the carpeted places in comparison with tile flooring ones, the measure of fungi wall component (1-3)- β -D-glucan per area of carpet was much higher than that found on tile floor⁵¹. By the other hand the occupants of buildings (humans and pets) are principal source

of indoor bacteria due to continuous release of the skin bacteria, as extensively demonstrated^{38,39,42,52-54}.

The factors influencing indoor bioaerosols are more largely studied on airborne culturable fungi, which relates with a lot of parameter characteristics, including occupant's lifestyle behaviors and building characteristics, air exchange rate, dwelling characteristics, temperature and relative humidity⁵⁵. Temperatures during the study were very stable values along the sampled days inside residential urban house, workplace, and hospital being less stable in residential rural house. The microbial measured results show no correlation with the indoor temperature, being the highest (mean 26°C) related to the workplace area, in comparison with the residential urban house (24.9°C) or rural house (highest microbial load) and hospital settings (lowest microbial load) (mean 20.1-20.7°C, respectively). The higher bacterial and fungal burden observed in the workplace possibly is related to the ventilation systems. Air filters and ventilation ducts are also colonized by fungi⁵⁶. The equipment could host fungal concentrations ranging from 0-1000 CFU/m³ as previously reported⁵⁷.

In hospital environments where patients are vulnerable to these infections and in workplaces when daily hours are extended, the monitoring and controlling indoor fungi are essential⁵⁷. Various studies have investigated the fungal air quality in hospital environments and other occupational works and density of airborne fungi range considerably: 19 ± 19 CFU/m³⁵⁸, 5.5-10.6 CFU/m³⁵⁹, and 0-319 CFU/m³⁶⁰. In our study, we found the low initial microbial air load (40116 CFU/m³) remaining to some extent stable all over an after the cleaning process. The few number of CFU of both fungi and bacteria prevented any statistical analysis. Moreover, the microbial concentration in indoor hospital measured area could be below the limit of efficacy of our cleaning method. It counts also for our difficult to compare the relative performance of the tested cleaning method in the four measured areas due to great differences in microbial burden.

Various factors such as the relative humidity, CO₂ concentration, temperature, intensity of UV and visible radiation, and wind speed influence on the airborne fungi⁶¹. Among these factors, nutrients, and temperature are the most important factors⁶². We verified the relative humidity inside the measure places was similar for residential houses (urban and rural) and hospital setting (mean range 62.8-67.1 %), being superior to that measured in the workplace room (mean 53.7 %). No correlation was found between microbial burden and relative humidity. High humidity within houses and buildings allows for growth of fungi indoors, particularly species of *Aspergillus* as we identify in the measure settings. Among important factors of fungal growth in indoor environments humidity is pointed as a principal in published literature, although the season, climatic conditions and outdoor air microbial counts also influences the indoor concentrations of fungi^{36,63-69}. Rural environments, in particular, farms have more rich and diverse fungal in air content in comparison to non-farming ones^{43,70}. In our study, the contribution of outdoor air in the measure indoor residential rural house probably accomplishes something to the higher microbial load. Of note, the rural residence is located in a no polluted area and the high microbial burden is not related to suspended particulate matter in atmosphere, a characteristic of pollution in crowded cities or intensive cropping areas. Fungal bioaerosols are usually bound to particulate matter^{71,72}. Recent studies showed concentration of airborne culturable fungi is greatly affected by suspended particulate matter concentrations^{73,74}. Nevertheless, variations of bacterial and fungal indoor communities are not explained clearly and the relationship between bioaerosols and air pollution levels should be a focus of future research⁷⁵.

The temperature less than optimum level (<21°C) causes a decrease in growth of fungi⁶². On the opposite, in our study the indoor air residential rural house was low during the sampling period, but microbial load was high. The high relative humidity, as measured in the rural

setting, may promote bioaerosols survival in this set. Since the frequent indoor temperature measured in our study was from 20 to 25°C, the growth of mesophilic fungi was promoted. The composition of fungal genera/species analysis showed no correlation within the four measured areas. On about half (13 out of 28) of positive samples, collected after cleaning, we observed the same genera/species of fungi growing in plates. This finding suggested that the *in-situ* action of terpenes was not selective for a specific agent but the product was effective in reduce fungal burden in general. It is not clear which factors regulate indoor fungal diversity. Using culture-dependent methods we assume that the organisms should grow and produce classic characteristics within a specified period. However, majority isolates did not sporulated and so were classified in the sterile mycelium fungi group. Furthermore, several fungi isolates were only identified to the genus level due to inconclusive species results obtained through MALDI-TOF methodology. The performance of MALDI-TOF analysis varies according to the databank robustness, and few spectra containing bank result in no identification of isolates⁷⁶.

Mycelia sterilia (25%) and *Penicillium* spp. (21%), followed by *A. flavus* (15%), *Neurospora* spp. (11%), *A. fumigatus*, *A. niger* (10%), were the most found in our study. *Penicillium* and *Aspergillus*, in fact, were the most common isolated genera at 27°C for 3 to 7 days elsewhere; moreover, the air mycobiota contained almost one third of species of *Aspergillus* genus^{10,62,77-80}.

Terpenes for Control Fungal Bioaerosols

Since fungi are also found in buildings where very strict sanitization and filtration regimes are applied^{81,82}, there is clearly need for research designed to investigate the antifungal efficacy in indoor environments, in particular in risk areas, in order to confirm laboratory obtained results. We study the efficiency in a hospital setting where it is expected high cleanliness procedures an indeed we hardly isolated fungi (*Penicillium*, *Mycelia sterilia*, *Cladophialophora* and *Curvularia lunata*) before and after the washing process in the four positive collected samples. Regarding genera fungi occurrence, those with small-sized conidia (<4 µm) of *Aspergillus* and *Penicillium* species are of ultimate relevance because inhalator particles fall in the range of 0.2-5.0 µm in diameter. A human adult at rest breathes in an average of 11,000 L of air per day and can breathing millions of airborne fungal spores in a week. Smaller (<0.2 µm in diameter) particles are commonly exhaled because of the aerodynamics of breathing but can remain airborne for long periods and also can be transported readily indoors by air currents over considerable distances. Indoor particles >10 µm in diameter may rapidly fall out of the air because of their mass under prevailing environmental conditions, particularly temperature^{83,84}.

Of note, in our study we fail to identify fungal genera commonly found indoor-*Cladosporium* and *Alternaria*⁸⁴⁻⁸⁶. These genera, as well as *Penicillium* and *Aspergillus* pose a respiratory health risk in susceptible populations living in homes with increased fungal concentrations, increasing exacerbation of current asthma symptoms in children and adults. Nevertheless, data do not provide sufficient detail to assess whether these fungi exacerbated asthma symptoms or potential health outcomes resulting from continuous and increased exposure to allergenic fungi. It is yet unknown how exposure to fungi influences the allergic symptoms. Fungal sensitization has been reported in up to 80% of asthmatic cases and it is estimated that more than 6.5 million persons have severe asthma with fungal sensitization and up to 50% of adult asthmatic patients attending secondary care have fungal sensitization. However, there is limited number of longitudinal studies to explore the risk of new cases of asthma symptoms in populations exposed to increased concentrations of indoor fungi⁸⁷.

The rank order of the most common indoor fungi is not identical within different areas, but the genus *Penicillium* is usually more common in the indoor air than in outdoor air^{47,88,89}.

Source of domestic indoor environments includes the handling of organic or biological material (potted house plants, root vegetables, fruits, blue cheese) and spoilage (e.g., moldy bread or vegetables^{46,90}). Storage of household biowaste is a source of biological particles⁴⁸, as is handling of firewood^{91,92}. *Penicillium* species are rapid colonizers and efficient in producing and releasing spores on wetting or moistening surfaces and materials that lead to mold growth⁹³.

Aspergillus are responsible for triggering hypersensitivity reactions, including rhinitis, sinusitis, and asthma. *Aspergillus* diseases are not restricted to allergy but affects a broad patient population of immunocompromised patients in form of invasive fungal disease-Aspergillosis. The mycosis is life-threatening complication for this population. Fungal infections can be particularly serious in immunocompromised patients, especially airborne spores of *Aspergillus* spp. that are blown in from natural ventilation sources. Azole antifungal agents are critical in long-term therapy for chronic pulmonary Aspergillosis and include itraconazole, voriconazole, posaconazole, and recently, isavuconazole. However, high azole MICs has been increasingly reported in both clinical and environmental *Aspergillus* strains⁹⁴. As fungal spores are enabled to travel long distances and turn more capable of withstanding environmental insults, such high temperatures and xenobiotic compounds or toxic pollutants, so the antifungal resistance could be derivative from adaptive mechanism to environmental stress⁷⁹.

Our study demonstrates isolates with high MICs from indoor air isolates. Using the micro dilution broth reference methodology, we assessed the antifungal susceptibility of twenty-nine air indoor fungi and found all 8 *Penicillium* spp. morphotype isolates with MICs above the maximum (8 mg/L) concentration value tested for either itraconazole, voriconazole and amphotericin B. Furthermore, isolates with high MICs to amphotericin B were found in *A. fumigatus* (1/5; 20%) and *A. flavus* (3/7, 42.9%). Additional research is needed for define the possible threat to human health due to these bioaerosols.

Of note, in this study the inhibitory activity of terpenes blend used was high for all fungal isolates recovered from indoor atmospheric air. In particular, for the most resistant species, e.g. *Penicillium*, the extraordinary *in vitro* efficacy of stressed the observed fungal burden reduction. Moreover, it is worth to demonstrate the impact on resistant species that could be relevance in contaminated indoor ambiances. Against commonly pathogenic species, e.g. *A. fumigatus*, the blend exhibited a good *in vitro* fungistatic action broadening the industrial, hospital and home application of such compounds to clean the indoor air. Limited information and diverse methodology for determine the antifungal susceptibility of fungi obtained from bioaerosols have prevented proper comparison of our results with previously published data. Furthermore, variety of non-standardized methodologies to determine MIC of or essential oils prevent comparison with previous existing data on antifungal activity of terpenes^{95,96}.

Future perspectives

The actual inhibitory or fungicidal mechanism of is still under investigation. Monoterpenes concentrations showed higher antimicrobial activity in vapor phase than in direct contact and depends on their presence in gaseous form facilitating their solubilization in cell membrane of fungi³⁴. Changes on microbial cell membrane properties and functions due to increasing membrane fluidity are seemed under essential oil exposition. Alterations on membrane permeability is according essential oil concentration, and high concentrations cause severe damage, loss of homeostasis, leading to death^{34,97}. Some essential oils components interfere with the amino acid involved in spore germination, and denature the enzymes responsible for germination, energy production and synthesis of structural compounds⁹⁸. There is no consensus on the phase (vapor or aqueous solution) of essential oils that presents greater antifungal activity^{29,99,100}. Majority of published paper focused remediation of sick buildings. Sick building

syndrome is recognized as a group of symptoms (eyes, nose and throat irritation; dry skin, headache and lethargy) in people spending time in a particular building, in particular, offices. There have been reports of sick building syndrome in schools, hospitals, care homes and domestic houses. Major risk factor of sick building syndrome is dampness, which promotes mould growth¹⁰¹. The risk for disease in indoor area is higher than outdoor area since the spore concentration is likely to increase¹⁰².

Conclusions

Indoor air quality is a public health issue of increasing concern, in particular, the presence of moulds have been linked to increased risk of adverse health effects mainly various respiratory conditions. Furthermore, fungi have also been demonstrated to contribute to sick building syndrome besides other building related illnesses. Not only common allergic responses to spores and small fungal particles, but serious toxigenic effects have been reported. For certain susceptible populations there is actual risk of invasive and lethal fungal infections.

Although cleaning solutions to experimentally inhibit fungi grow have been proposed, studies are warranted to focus on translating laboratory results into realistic application methods, in actual buildings. We studied the culturable number of bacteria and fungi in indoor air from rural and urban settings. The results indicate that tested terpenes blend was effective antifungal agent, and may have industrial application for reduce of fungal contamination in residential and occupational buildings. Taken together, our findings provide a basis to monitor and reduce fungal pathogens isolates, including azole drug resistant isolates, with in indoor areas where population could be at risk of health adverse effects produced by low susceptible etiologic agents. Further studies are warranted to evaluate the remediation potential of terpenes in sick environments. The degree of microbial load will govern the choice of cleaning equipment and work routine. Poorly contaminated stings like the tested hospital indoor area may require slow regime of washing procedures. An increase in microorganisms load or prevalence of certain species present indoor may point an irregular situation and specific health treat and warrant individual measures in the application of cleaning products. There is also a need to investigate the any reapplication requirements in order to maintain the indoor air quality. Considering scientific evidence that indoor air may pose a health risk to population, we strongly recommend the use of cleaning products with proven microbial action to reduce bacterial and fungal load in indoor settings. No doubt, this remains an area of great concern for occupational health researchers and the reduction of exposure levels in these environments is of utmost importance. Our results add to the paucity of literature in evaluation antifungal effect of natural compounds since most of the studies are laboratory based and there is a gap of knowledge on *in situ* experiments within building environments.

Compliance with Ethical Standards

MSCM is a fellowship of CNPq, Minister of Health, Brazil. Conflict of Interest ALR and NTCV served as Chemistry at Terpenoil

Human and Animal Rights and Informed Consent

This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchisei F, Bille J, Chryssantou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning DW, Donnelly JP, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Gaustad P, Schmalreck A, Velegraki A, Verweij P. 2008. EUCAST technical note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:982–984. 10.1111/j.1469-0691.2008.02086.x.

1. Dancer SJ. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:101–13.

2. Azimi F, Naddafi K, Nabizadeh R, Hassanvand MS, Alimohammadi M, Afhami S, Musavi SN. Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. *J Environ Health Sci Eng* 2013;19:30.

3. Eduard W, Pearce N, Douwes J. Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. *Chest.* 2009;136:716–725.

4. Ayanbimpe GM, Wapwera SD, Kuchin D. Indoor air mycoflora of residential dwellings in Jos metropolis. *Afr Health Sci.* junho de 2010;10:172–6.

5. Vornanen-Winqvist C, Järvi K, Toomla S, Ahmed K, Andersson MA, Mikkola R, Marik T, Kredics L, Salonen H, Kurnitski J. Ventilation Positive pressure Intervention Effect on Indoor Air Quality in a School Building with Moisture Problems. *Int J Environ Res Public Health* 2018;30:15(2). pii: E230.

6. Escombe AR, Moore DA, Gilman RH, Navincopa M, Ticona E, Mitchell B, et al. Upper-room ultraviolet light and negative air ionization to prevent tuberculosis transmission. *PLoS Med* 2009;6:e43

7. Hoog C, Guarro J, Gené G, Figueras M. Atlas of Clinical Fungi [Internet]. 4 th. biodiversity C-KF, editor. 3rd web edition. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2014.

8. Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, Hasseine L, De Geyter D, Pierard D, Surmont I, Djenad F, Donnadieu JL, Piarroux M, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017;55:2661–70.

9. * Abbasi F, Samaei MR. The effect of temperature on airborne filamentous fungi in the indoor and outdoor space of a hospital. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;doi: 10.1007/s11356-017-0939-5. [Epub ahead of print] PubMed PMID:29299864. **The authors showed the relevance of temperature on fungi growth inside hospital settings.**

10. Lee KW, Mukund R. Filter collection. Baron PA & Willeke, K. (Ed.)—Aerosol Measurement, Principles, Techniques and Applications. 2nd ed. New York, Wiley Interscience. 2001:197–228

11. ** Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C., Green, B.J. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J. Environ. Monit.* 2012;14: 334–339. **An excellent review on the bioaerosols professional exposition .**

12.* Yoo, K., Lee, T.K., Choi, E.J., Yang, J., Shukla, S.K., Hwang S-i, Park J. Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: a review. *J Environ Sci* 2017; 51: 234–247. This studies point some future strategies for detect fungi in bioaerosols.

13. Samson RA, Visagie CM, Houbbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* junho de 2014;78:141–73.

14. Visagie C.M., Hirooka Y., Tanney J.B. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*. 2014;78:63–139.
15. * Flannigan B, Samson RA, Miller JD. *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*, Second Edition [Internet]. CRC Press; 2016. **An comprehensive review of impact of indoor air on human health.**
16. Amend AS, Seifert KA, Bruns TD. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count?. *Molecular ecology*. 2010 Dec 1;19(24):5555–65.
17. Nonnenmann, M.W., Coronado, G., Thompson, B., Griffith, W.C., Hanson, J.D., Vesper, S. and Faustman, E.M. Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples. *Environ Monit*. 2012;14: 2038–2043
- 18.* Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*. 2003 Apr 1;47(3):187–200. **The health effects of bioaerosols are well described by the authors.**
19. Griffin DW. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:459–77.
20. Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:144–72; Mandal and Brandl, 2011
21. Mandal J, Brandl H. Bioaerosols in indoor environment—a review with special reference to residential and occupational locations. *Open Envir Biol Monitoring J*. 2011 Sep 28;4(1)
22. Mensah-Attipoe J, Saari S, Veijalainen AM, Pasanen P, Keskinen J, Leskinen JT, Reponen T. Release and characteristics of fungal fragments in various conditions. *Science Total Envir*. 2016 Mar 15;547:234–43.
23. Afanou KA, Straumfors A, Skogstad A, Skaar I, Hjeljord L, Skare O, et al. Profile and morphology of fungal aerosols characterized by field emission scanning electron microscopy (FESEM). *Aerosol Sci Technol* 2015;49:423–35
24. Reijula K. Moisture-problem buildings with molds causing work-related diseases. *Advances in Applied Microbiology* 2004;55:175–189.
- 25.** Knutsen AP, Bush RK, Demain JG, Denning DW, Dixit A, Fairs A, Greenberger PA, Kariuki B, Kita H, Kurup VP, Moss RB. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb 1;129(2):280–91. **The relationship between allergy and fungi is depicted.**
26. Hoseini-Tabatabaei SA, Gluhak A, Tafazolli R. A survey on smartphone-based systems for opportunistic user context recognition. *ACM Computing Surveys (CSUR)*. 2013 Jun 1;45(3):27.
27. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130
28. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)* 2017;4:3.
29. López P, Sanchez C, Batlle R, Nerín C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *J Agric Food Chem*. 2007 May 30;55(11):4348–56.
30. Nielsen PV, Rios R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int J Food Microbiol* 2000;60:219–29.
31. Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J Agric Food Chem*. 2003;51(11):3197–207.

32. Chanthaphon S, Chanthachum S, Hongpattarakere T. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* sp. against food-related microorganisms. *J. Sci. Tech.* 2008, 30(1): 125-131..
33. Jafari S, Esfahani S, Fazeli MR, Jamalifar H, Samadi M, Samadi N, Najarian Toosi A, Shams Ardekani MR, Khanavi M. Antimicrobial Activity of Lime Essential Oil Against Food-borne Pathogens Isolated from Cream-filled Cakes and Pastries. *International Journal of Biological Chemistry* 2011; 5: 258-265.
34. Tyagi, A. K., and Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chem.* 126, 228–235
35. ** Chao CJ, Wu PC, Chang HY, Su HJ. 2005. The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. In: *Indoor Air 2005* (Yang X, Zhao B, Zhao R, eds). Beijing: Tsinghua University Press, 2309–2313. **The essential oil antifungal activities on indoor air are pointed out.**
36. Su HJ., Wu PC., Chen HL., Lee FC. and Lin LL. Exposure assessment of indoor allergens, endotoxin and airborne fungi for homes in southern Taiwan. *Environment Res* 2001; 85, 135-144.
37. ** Heo, K. J., Lim, C. E., Kim, H. B. & Lee, B. U. Effects of human activities on concentrations of culturable bioaerosols in indoor air environments. *J Aerosol Science* 2017; 104: 58–65. **The correlation between human activities and bioaerosols are defined.**
38. Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, Yamamoto N, Bibby K, Rismani-Yazdi H, Peccia J. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PloS one.* 2012 Apr 18;7(4):e34867
39. Meadow JF, Altrichter AE, Kembel SW, Kline J, Mhuireach G, Moriyama M, Northcutt D, O'Connor TK, Womack AM, Brown GZ, Green JL. Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air.* 2014 Feb;24(1):41-8.
40. Gaüzère C, Godon JJ, Blanquart H, Ferreira S, Moularat S, Robine E, et al. ‘Core species’ in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air. *Sci Total Environ.* 2014a;485–486(0):508–17.
41. Gaüzère C, Moletta-Denat M, Blanquart H, Ferreira S, Moularat S, Godon JJ, et al. Stability of airborne microbes in the Louvre Museum overtime. *Indoor air.* 2014b;24(1):29–40
42. Qian H, Zheng X. Ventilation control for airborne transmission of human exhaled bio-aerosols in buildings. *J Thorac Dis.* julho de 2018;10(Suppl 19):S2295–304.
43. Miller, J.D., Laflamme, A.M., Sobol, Y., Lafontaine, P. and Greenhalgh, R. Fungi and fungal products in some Canadian houses. *Int Biodeterior* 1988; 24:103–12044. Shorter, C. (2012) *Fungi in New Zealand homes: Measurement, aerosolization & association with children’s health*, PhD Thesis, University of Otago, New Zealand.
44. Chew GL, Douwes J, Doekes G, Higgins KM, van Strien R, Spithoven J, Brunekreef B. Fungal extracellular polysaccharides, beta (1->3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* 2001;11171-8.
45. Gehring, U., Douwes, J., Doekes, G., Koch, A., Bischof, W., Fahlbusch, B., Richter, K., Wichmann, H.E., Heinrich, J. and INGA Study Group. Indoor Factors and Genetics in Asthma beta(1->3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds, *Environ Health Perspect* 2001;109: 139–144.
46. * Li DW, Kendrick B. A year-round comparison of fungal spores in indoor and outdoor air. *Mycologia* 1995; 1:190-5. **A well done study on monitoring fungal spores in atmospheric air.**

48. Wouters, I.M., Douwes, J., Doekes, G., Thorne, P.S., Brunekreef, B. and Heederik, D.J. Increased levels of markers of microbial exposure in homes with indoor storage of organic household waste. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 627–631.
49. Becher R, Øvreivik J, Schwarze PE, Nilsen S, Hongslo JK, Bakke JV. Do Carpets Impair Indoor Air Quality and Cause Adverse Health Outcomes: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(2):184
50. Ren, P., Jankun, T.M., Belanger, K., Bracken, M.B., Leaderer, B.P. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* 2001; 56, 419–424.
51. Foarde, K. and Berry, M. Comparison of biocontaminant levels associated with hard vs. carpet floors in nonproblem schools: results of a year-long study, *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004; 14(1): S41–S48.
52. Sessa R, Di PM, Schiavoni G, Santino I, Altieri A, Pinelli S, Del PM. Microbiological indoor air quality in healthy buildings. *New Microbiol* 2002;25:51-6.
53. Täubel, M., Rintala, H., Pitkearanta, M., Paulin, L., Laitinen, S., Pekkanen, J., Hyvearinen, A. and Nevalainen, A. The occupant as a source of house dust bacteria. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:834–840.
54. Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, Hubbell SP, Wright SJ, Green JL. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Sep 23;111(38):13715-20.
55. Crawford JA, Rosenbaum PF, Anagnost SE, Hunt A, Abraham JL. Indicators of airborne fungal concentrations in urban homes: understanding the conditions that affect indoor fungal exposures. *Sci Total Environ* 2015;17:113-24.
56. Noris F., Siegel J.A., Kinney K.A. Evaluation of HVAC filters as a sampling mechanism for indoor microbial communities. *Atmospheric Environment* 2011;45(2):338–346.
57. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. Potential for preventing spread of fungi in air-conditioning systems constructed using copper instead of aluminium. *Lett Appl Microbiol* 2010;50:18-23
- 58.* Perdelli F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimaldi M, Orlando P. Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:44-7. **The relevance of monitoring hospital settings for bioaerosols was stressed in this study**
59. Panagopoulou P, Filioti J, Petrikkos G, Giakouppi P, Anatoliotaki M, Farmaki E, Kanta A, Apostolakou H, Avlami A, Samonis G, Roilides E: Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *J Hosp Infect* 2002; 52:185-191.
60. Li CS, Hou PA. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci Total Environ* 2003;305:169-76.
61. Basílico Mde L, Chiericatti C, Aringoli EE, Althaus RL, Basílico JC. Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. *Sci Total Environ*. 2007 Apr 15;376(1-3):143-50.
62. Khan AH, Karuppayil SM. Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi journal of biological sciences*. 2012 Oct 1;19(4):405-26
63. DeKoster, J.A. and Thorne, P.S. Bioaerosol concentration in noncomplaint, complaint and intervention homes in the Midwest, *Am Ind Hyg Assoc J* 1995; 56: 573–580.
64. Dharmage, S., Bailey, M., Raven, J., Mitakakis, T., Thien, F., Forbes, A., Guest, D., Abramson, M. and Walters, E.H. Prevalence and residential determinants of fungi within homes in Melbourne, Australia, *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1481–1489.

65. Fradkin, A., Tarlo, S.M., Tobin, R.S., Tuccillo, M. and Malloch, D. Species identification of airborne molds and its significance for the detection of indoor pollution, *JAPCA* 1987;37: 51–53.
66. Kuo, Y. and Li, C. Seasonal fungus prevalence inside and outside of domestic environments in the subtropical climate. *Atmos Environ* 1994; 28: 3125–3130.
67. Burge HA, Rogers CA. Outdoor allergens. *Environmental Health Perspectives*. 2000 Aug;108(Suppl 4):653.
68. Lee JH, Jo WK. Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols at Korean high-rise apartment buildings. *Environ Res*. 2006;101(1):11–7.
69. Pitkäranta M, Meklin T, Hyvärinen A, Paulin L, Auvinen P, Nevalainen A, Rintala H: Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:233-244.
70. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *New England Journal of Medicine*. 2011 Feb 24;364(8):701-9.
71. Glikson MS, Rutherford S, Simpson RW, Mitchell CA, Yago A. Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmospheric Environment*. 1995 Mar 1;29(4):549-62.
72. Alghamdi MA, Shamy M, Redal MA, Khoder M, Awad AH, Elserougy S. Microorganisms associated particulate matter: a preliminary study. *Sci Total Environ*. 2014; 479:109-16.
73. Liu, Z.; Li, A.; Hu, Z.; Sun, H. Study on the potential relationships between indoor culturable fungi, particle load and children respiratory health in Xian, China. *Build Environ* 2014;80:105-114
74. Gao, M., Yan, X., Qiu, T., Han, M., Wang, X. Variation of correlations between factors and culturable airborne bacteria and fungi. *Atmos Environ* 2016; 128: 10-19.
75. Du P, Du R*, Ren W, Lu Z, Zhang Y, Fu P. Variations of bacteria and fungi in PM2.5 in Beijing, China. *Atmospheric Environment* 2018; 172:55-64.
76. Cassagne, Carole et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*, v. 59, n. 11, p. 678-690, 2016.
77. Hedayati MT, Mayahi S, Denning DW. A study on *Aspergillus* species in houses of asthmatic patients from Sari City, Iran and a brief review of the health effects of exposure to indoor *Aspergillus*. *Environ Monit Assess* 2010;168:481-7.
78. Mousavi B, Hedayati MT, Hedayati N, Ilkit M, Syedmousavi S. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr Med Mycol* 2016;2:36-42
79. Nursing E. Occurrence of fungi and cytotoxicity of the species: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* isolated from the air of hospital wards. 2017;30(2):231–9
80. Górny RL, Dutkiewicz J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med* 2002;9:17-23
81. La Duc MT, Vaishampayan P, Nilsson HR, Torok T, Venkateswaran K. Pyrosequencing-derived bacterial, archaeal, and fungal diversity of spacecraft hardware destined for Mars. *Applied and environmental microbiology*. 2012 Jun 22:AEM-01435.
82. Checinska A, Probst AJ, Vaishampayan P, White JR, Kumar D, Stepanov VG, et al. Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities. *Microbiome* 2015;3:50
83. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Summerbell RC, Rex JH, et al. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year

- prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003;101:2542-6.
84. Nevalainen A, Taubel M, Hyvarinen A. Indoor fungi: companions and contaminants. *Indoor Air* 2015;25:125-56.
85. Hamada N, Abe N. Growth characteristics of four fungal species in bathrooms. *Biocontrol science*. 2010;15(3):111-5
86. Zupančič J, Novak Babič M, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *PLoS One* 2016;11:e0148166.
87. ** Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, et al. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 110–122. **Statistic analysis of relationship between asthma and indoor air.**
88. Hyvarinen, A., Reponen, T., Husman, T., Ruuskanen, J. and Nevalainen, A. Characterizing mold problem buildings: concentrations and flora of fungi, *Indoor Air* 1993; 3: 337–343.
89. Hyvarinen, A., Meklin, T., Vepsealaainen, A. and Nevalainen, A. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials—concentrations and diversity. *Int Biodeterior Biodegradation* 2002;49; 27–37.
90. Pessi, A.M., Suonketo, J., Pentti, M., Kurkilahti, M., Peltola, K. and Rantio-Lehtimeaki, A. Microbial growth inside insulated external walls as an indoor air biocontamination source. *Appl Environ Microbiol* 2001; 68: 963–967.
91. Lehtonen, M., Reponen, T. and Nevalainen, A. Everyday activities and variation of fungal spore concentrations in indoor air. *Int Biodeterior Biodegradation* 1993;31: 25–39.
92. Leppeanen, H.K., Nevalainen, A., Vepsealaainen, A., Reponen, M., Taubel, M., Laine, O., Rantakokko, P., von Mutius, E., Pekkanen, J. and Hyvarinen, A. Determinants, reproducibility, and seasonal variation of ergosterol levels in house dust. *Indoor Air* 2014; 24: 248–259.
93. Pasanen AL, Rautiala S, Kasanen JP, Raunio P, Rantamäki J, Kalliokoski P. The relationship between measured moisture conditions and fungal concentrations in water-damaged building materials. *Indoor Air*. junho de 2000;10(2):111–20.
94. Chowdhary A, Agarwal K, Meis JF (2016) Filamentous Fungi in Respiratory Infections. What Lies Beyond Aspergillosis and Mucormycosis? *PLoS Pathog* 12(4): e1005491. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005491>.
95. Fernández-López J, Viuda-Martos M. Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems. *Foods*. 2018 Apr 5;7(4). pii: E56.
96. Bluma R, Amaiden MR, Daghero J, Etcheverry M. Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *J Appl Microbiol*. 2008;105:203-14.
97. Carson CF, Mee BJ, Riley TV (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) on *Staphylococcus aureus* determined by time - kill, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002;46: 1914-1920.
98. Nychas, G.J.E., 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 58– 89.
99. Gómez-Sánchez A, Palou E, López-Malo A. Antifungal activity evaluation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact. *J Food Prot* 2011;74:2192-8.
100. Inouye S, Uchida K, Maruyama N, Yamaguchi H, Abe S. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47(2):91-8.
101. Adams RI, Tian Y, Taylor JW, Bruns TD, Hyvärinen A, Täubel M. Passive dust collectors for assessing airborne microbial material. *Microbiome* 2015;3:46.

102.Prasad C, Hogan MB, Peele K, Wilson NW. Effect of evaporative coolers on skin test reactivity to dust mites and molds in a desert environment. *Allergy Asthma Proc* [Internet]. 2009;30:624–7.

Table 1. Antifungal susceptibility of 29 fungi isolates from indoor air from houses, hospital and workplace settings

| Fungi (n) | Antifungal Drug | MIC (mg/L) | | | | | | | | | | |
|---|-----------------|------------|------|------|------|------|-----|---|---|---|---|----|
| | | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | >8 |
| <i>A. fumigatus</i> (5) | ITC | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. flavus</i> (7) | ITC | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| <i>A. niger</i> (5) | ITC | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Penicillium</i> spp.[morphotype 1] (2) | ITC | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Penicillium</i> spp.[morphotype 2] (8) | ITC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 5 |
| <i>Trichoderma koningii</i> (1) | ITC | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Cladophialophora</i> spp. (1) | ITC | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | ITC | 0 | 0 | 6 | 4 | 3 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | VCZ | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 13 | 6 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | AmB | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 9 | 4 | 5 | 1 | 5 |

MIC, minimal inhibition concentration

Table 2. Inhibitory activity of terpenes blend against 29 fungal isolates recovered from environmental indoor air

| Species | MIC (blend dilution) |
|--|-----------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> (n=7) | < 1/128 |
| <i>Aspergillus niger</i> (=5) | < 1/128 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> (n=5) | < 1/128 |
| <i>Trichoderma koningii</i> (n=1) | <1/128 |
| <i>Cladophialophora</i> spp. (n=1) | < 1/128 |
| <i>Penicillium</i> morphotype 1 (n= 1) | < 1/128 |
| <i>Penicillium</i> morphotype 1 (n=1) | 1/512 |
| <i>Penicillium</i> morphotype 2 (n=3) | 1/1024 |
| <i>Penicillium</i> morphotype 2 (n=3) | 1/2048 |
| <i>Penicillium</i> morphotype 2 (n=2) | 1/4096 |

MIC, minimal inhibition concentration

Figure legends

Figure 1. Effects of 24h-exposition time of terpenes blend on bacterial and fungal load (CFU/m³) in indoor air of two residential houses (urban and rural) , one workplace and one hospital setting.

RELATÓRIO DE ENSAIO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À CEPA ESPECÍFICA DE
Staphylococcus aureus
AA2 – 032038.R**

Cliente: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA
13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Amostra: 06/08/2015
Início do Ensaio: 26/08/2015
Término do Ensaio: 28/08/2015
Emissão do Relatório: 27/11/2015
Amostra: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL

Composição Química Declarada:

[REDACTED]

Quantidade de amostra recebida (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./ Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Quantidade de amostra utilizada (mL ou g): 10

METODOLOGIA

A análise de diluição de uso é baseada na introdução de cilindros carregadores, previamente contaminados com microrganismos alvos, em tubos de ensaio contendo amostra teste (desinfetante), onde permanecem em contato pelo tempo solicitado/estipulado. Posteriormente, os cilindros são transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura adequado e incubados por 48 horas.

POP – LMB 01.05 - Atividade Antimicrobiana - Diluição de Uso

CONDIÇÕES DO ENSAIO

Faixa de temperatura da amostra durante o ensaio: 20°C±1.

Faixa de temperatura de incubação: 36°C±1.

TÉCNICA ANALÍTICA

Atividade Antimicrobiana – Diluição de Uso.

RESULTADO

| | |
|----------------------------|--|
| Microrganismo Teste | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) |
| Diluição de Uso | 1 g para 100 mL de água |
| Tempo de Contato | 10 minutos |
| Resultado | Eliminação de 60 dos 60 cilindros |

[Handwritten signature]

RELATÓRIO DE ENSAIO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À CEPA ESPECÍFICA DE *Staphylococcus aureus* AA2 – 032038.R

Laboratório de Ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 639

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO

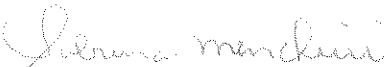
O desinfetante para ser considerado satisfatório, deve ser capaz de matar o microrganismo teste em 59 dos 60 cilindros utilizados, o que confere um nível de confiança de 95% (especificação fornecida pelo método analítico).

As opiniões e interpretações expressas abaixo não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

CONCLUSÃO DETALHADA

De acordo com os resultados obtidos no ensaio, a amostra pode ser considerada SATISFATÓRIA na eficácia bactericida frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), quando utilizada na concentração de 1 g para 100 mL de água e tempo de contato de 10 minutos.

- Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.
- Amostragem realizada pelo cliente.
- As amostras foram analisadas como recebidas, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio das amostras.
- Este relatório atende os requisitos da NBR ISO/IEC 17025, o qual garante a rastreabilidade dos dados gerados no ensaio.
- É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.
- Referência Bibliográfica: Testing Disinfectants against *Staphylococcus aureus* – Use Dilution Method, AOAC Official Method 955.15, AOAC 18th Edition – Revisão 4 – 2011.


Sabrina Menchini
Analista Responsável
CRBio 51761/01-D


Gláucio P. Machado
Gerente Técnico
CRMV-SP 20396

=====

RELATÓRIO DE ENSAIO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À CEPA ESPECÍFICA DE
Salmonella choleraesuis
AA1- 032038.R

Cliente: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA
 13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Amostra: 06/08/2015
Início do Ensaio: 25/08/2015
Término do Ensaio: 27/08/2015
Emissão do Relatório: 27/11/2015
Amostra: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL
 (X) [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
Composição Química Declarada: [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
Quantidade de amostra recebida (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./ Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Quantidade de amostra utilizada (mL ou g): 10

METODOLOGIA

A análise de diluição de uso é baseada na introdução de cilindros carregadores, previamente contaminados com microrganismos alvos, em tubos de ensaio contendo amostra teste (desinfetante), onde permanecem em contato pelo tempo solicitado/estipulado. Posteriormente, os cilindros são transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura adequado e incubados por 48 horas.

POP – LMB 01.05 - Atividade Antimicrobiana - Diluição de Uso

CONDIÇÕES DO ENSAIO

Faixa de temperatura da amostra durante o ensaio: 20°C±1.

Faixa de temperatura de incubação: 36°C±1.

TÉCNICA ANALÍTICA

Atividade Antimicrobiana – Diluição de Uso.

RELATÓRIO DE ENSAIO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À CEPA ESPECÍFICA DE
Salmonella choleraesuis
AA1- 032038.R

Laboratório de Ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 639

RESULTADO

| | |
|----------------------------|---|
| Microrganismo Teste | <i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 10708) |
| Diluição de Uso | 1 g para 100 mL de água |
| Tempo de Contato | 10 minutos |
| Resultado | Eliminação de 59 dos 60 cilindros |

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO


O desinfetante para ser considerado satisfatório, deve ser capaz de matar o microrganismo teste em 59 dos 60 cilindros utilizados, o que confere um nível de confiança de 95% (especificação fornecida pelo método analítico).

As opiniões e interpretações expressas abaixo não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

CONCLUSÃO DETALHADA

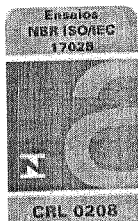
De acordo com os resultados obtidos no ensaio, a amostra pode ser considerada SATISFATÓRIA na eficácia bactericida frente à *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), quando utilizada na concentração de 1 g para 100 mL de água e tempo de contato de 10 minutos.

- Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.
- Amostragem realizada pelo cliente.
- As amostras foram analisadas como recebidas, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio das amostras.
- Este relatório atende os requisitos da NBR ISO/IEC 17025, o qual garante a rastreabilidade dos dados gerados no ensaio.
- É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.
- Referência Bibliográfica: Testing Disinfectants against *Salmonella choleraesuis* – Use-Dilution Method, AOAC Official Method 955.14, AOAC 16th Edition – Revisão 4 - 2011


Sabrina Menchini
Analista Responsável
CRBio 51761/01-D


Gláucio P. Machado
Gerente Técnico
CRMV-SP 20396

=====



Boletim de Análise: BA LCM-0298/17
Avaliação da atividade antimicrobiana pelo procedimento "Time-Kill"



Patrocinador/Fabricante: TERPENOil TECNOLOGIA ORGÂNICA LTDA
Endereço: Av. Arquimedes, 1070 – Jd. Casa Branca – Jundiaí/SP – CEP: 13211-840

Dados da amostra:

Substância teste: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL
Lote: Piloto
Data de Fabricação: 11/05/2017
Composição declarada (patrocinador):

Quantidade recebida da amostra: 262g
Data de Validade: 11/05/2018

| Componentes Components | Concentrações (%) Concentration (%) |
|---------------------------|--|
| Terpenos Cítricos | |
| Óleos Essenciais Naturais | |
| Tensoativos não iônicos | |
| Álcool anidro | |
| Ácido Cítrico | |
| Água | |

Código Bioagri: SAN-0761/17
Data do início do teste: 23/08/2017
Data do término do teste: 29/08/2017
Conclusão do relatório: 30/08/2017
Metodologia utilizada: ASTM E 2315-03, 2008 e POP-M 2166, Rev: 00.

Proposta: 04842/17

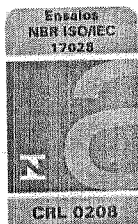
Data de recebimento: 28/07/2017

Procedimentos

O material em teste ou, a diluição do material em teste, é colocado em contato com uma população conhecida de um microrganismo por um tempo de contato e temperatura específicos. A atividade do material é extinta a intervalos de tempos específicos (segundos, minutos ou horas). O material em teste é neutralizado no tempo amostrado e os microrganismos sobreviventes são contados. A redução percentual e logarítmica são calculadas a partir da população sobrevivente em relação à população obtida no ensaio branco (água no lugar da amostra).

Condições do ensaio

Concentração da substância teste: diluída com água na concentração de 1:100%
Microrganismos teste: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Clostridium perfringens* ATCC 8798
Neutralizante: mistura de tween, saponina, L-histidina, tiosulfato de sódio, Lecitina.
Tempos de contato aplicados: 30 seg; 1 min; 5 min; 10 min; 30 min.
Temperatura durante o ensaio: 20,0 °C



Boletim de Análise: BA LCM-0298/17
Avaliação da atividade antimicrobiana pelo procedimento "Time-Kill"



Resultados

Reduções calculadas a partir da população sobrevivente no ensaio com a substância teste em relação à população obtida no ensaio branco, para cada tempo de contato, frente aos microrganismos:

Salmonella typhimurium ATCC 14028

| Tempos de contato | 30 segundos | 1 minuto | 5 minutos | 10 minutos | 30 minutos |
|------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|------------|
| Redução em Log ₁₀ | >4,32 | >4,19 | >4,17 | >4,25 | >4,20 |
| Percentual de redução | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% |

Salmonella enteritidis ATCC 13076

| Tempos de contato | 30 segundos | 1 minuto | 5 minutos | 10 minutos | 30 minutos |
|------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|------------|
| Redução em Log ₁₀ | >4,24 | >4,22 | >4,26 | >4,18 | >4,24 |
| Percentual de redução | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% |

Clostridium difficile ATCC 9689

| Tempos de contato | 30 segundos | 1 minuto | 5 minutos | 10 minutos | 30 minutos |
|------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|------------|
| Redução em Log ₁₀ | >4,02 | >4,10 | >4,07 | >4,12 | >4,05 |
| Percentual de redução | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% |

Clostridium perfringens ATCC 8798

| Tempos de contato | 30 segundos | 1 minuto | 5 minutos | 10 minutos | 30 minutos |
|------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|------------|
| Redução em Log ₁₀ | >4,10 | >4,13 | >4,15 | >4,07 | >4,11 |
| Percentual de redução | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% | >99,99% |


Notas:

Este Relatório refere-se somente à amostra analisada, não sendo extensivo a outros lotes e/ou produtos.

Este Relatório só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Plano de amostragem não realizada pela Bioagri.

Os documentos e registros gerados neste ensaio serão mantidos no(s) arquivo(s) da Bioagri Laboratórios Ltda por um período de seis (6) anos.


Marina Gumiere, Dra.
Responsável Técnica



RAM nº 1336/17

22.11.2017

RELATÓRIO DE ENSAIO MICROBIOLÓGICO

TESTE DE EFICÁCIA DE ANTIMICROBIANOS Time Kill

Apresentado por: ***Ipel Biocidas***

Apresentado a: ***Lab. Desenvolvimento – Terpenoil***

INOVANDO COM TECNOLOGIA

IPEL – ITIBANYL PRODUTOS ESPECIAIS LTDA.

Fábrica: Rod. Edgard Máximo Zambotto, km 72,5 – Jarinú – SP – CEP 13240-000 – Fone/Fax 55 (11) 4016-8016

E-mail: eliane@ipel.com.br

I - OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido visa avaliar o espectro de ação dos produtos recebidos sobre os microrganismos citados abaixo.

II. – METODOLOGIA

Redução Microbiana (TIME KILL TEST)

| | |
|---------------------------------------|---|
| Metodologia básica: | Dilution Neutralization Method – EN 1276 (1997), Phase 2 Step 1 Dilution Test |
| Carga microbiana inicial na amostra: | 10^4 a 10^5 UFC/g ou mL |
| Condições de teste: | Suspensão de microrganismo teste, submetido a tratamento com antimicrobianos, à temperatura de 28 ± 2 °C |
| Microrganismos testes: | Bactérias: <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Metodologia de recuperação: | Plaqueamento direto sobre TSA |
| Análise de sobreviventes após: | 30 seg, 1 min, 5 min e 10 min |
| Reinoculações | Não há |
| Critérios de avaliação de resultados: | Resultados de contagem expressos em: ufc/ml : unidade formadora de colônias por ml Redução microbiana expressa em: Redução Logarítmica = $\log N_0 / N$ Onde: N_0 = Contagem obtida no tubo Controle em 2 horas N = Contagem obtidas nos tubos testes nos respectivos tempos de contato. |

IV. – RESULTADOS e CONCLUSÕES

| Enumeração de Sobreviventes: <i>Escherichia coli</i> | | | | | | | | |
|--|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| Amostras | 30 segundos | | 1 minuto | | 5 minutos | | 10 minutos | |
| | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução |
| Solução desinfetante (diluição 1:125) | $7,0 \times 10^3$ | 99,9% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:150) | $2,5 \times 10^4$ | 99% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:200) | $2,3 \times 10^4$ | 99% | $1,2 \times 10^4$ | 99% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução AT-250 (diluído 1:150) | $3,8 \times 10^5$ | 90% | $2,4 \times 10^5$ | 90% | $9,9 \times 10^4$ | 99% | $1,4 \times 10^2$ | 99,99% |
| Controle | $3,6 \times 10^6$ | | | | | | | |

| Enumeração de Sobreviventes: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | | | | |
|--|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| Amostras | 30 segundos | | 1 minuto | | 5 minutos | | 10 minutos | |
| | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução |
| Solução desinfetante (diluição 1:125) | 6,8 x 10 ³ | 99,9% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:150) | 4,3 x 10 ⁴ | 99% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:200) | 2,7 x 10 ⁶ | - | 8,0 x 10 ⁵ | 90% | 1,9 x 10 ⁴ | 99% | < 100 | 99,999% |
| Solução AT-250 (diluído 1:150) | 1,6 x 10 ⁶ | - | 1,7 x 10 ⁶ | - | 9,1 x 10 ⁵ | 90% | 3,9 x 10 ⁵ | 90% |
| Controle | 3,0 x 10 ⁶ | | | | | | | |

| Enumeração de Sobreviventes: <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | | | | |
|---|-----------------------|---------|----------|---------|-----------|---------|------------|---------|
| Amostras | 30 segundos | | 1 minuto | | 5 minutos | | 10 minutos | |
| | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução | Contagem | Redução |
| Solução desinfetante (diluição 1:125) | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:150) | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução desinfetante (diluição 1:200) | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Solução AT-250 (diluído 1:150) | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% | < 100 | 99,999% |
| Controle | 6,9 x 10 ⁶ | | | | | | | |

OBS.: Os resultados se aplicam somente às amostras recebidas para análise.



Dra. Eliane Gama Lucchesi
Ger. Ass. Técnica e Lab. Microbiologia
CRB n.º 20.305/01

RELATÓRIO DE ENSAIO

**DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA
PELA MEDIDA DE DIÓXIDO DE CARBONO
DESPRENDIDO EM SISTEMA FECHADO
B2 – 032038.R**

Cliente: TERPENOil TECNOLOGIA ORGANICA LTDA
Endereço: AV ARQUIMEDES 1070 – JD. CASA BRANCA
13211-840 JUNDIAI - SP
Protocolo Ecolyzer: 032038.R
Início do Processo: 06/08/2015
Recebimento da Amostra: 06/08/2015
Início do Ensaio: 16/10/2015
Término do Ensaio: 13/11/2015
Emissão do Relatório: 27/11/2015
Amostra: DESINFETANTE NATURAL DE USO GERAL
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Composição Química Declarada: [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Quantidade de amostra recebida (mL ou g): 4000,00
Lote/Val./ Fab. Declarada: PILOTO 19/05/2016 19/05/2015
Quantidade de amostra utilizada: (mL ou g) 1

METODOLOGIA

A amostra foi incubada em frascos âmbar contendo meio mineral e inóculo durante 28 dias. As leituras foram realizadas em dias pré estabelecidos titulando-se o CO₂ dissolvido em hidróxido de bário até o ponto de viragem. Analisaram-se controles negativos em paralelo.

POP – LFQ 59.04 Ensaio de Determinação da Biodegradabilidade Imediata – Sistema fechado

CONDIÇÕES DO ENSAIO

Temperatura de incubação: 24 - 25°C

Tempo de incubação 28 dias.

TÉCNICA ANALÍTICA

Titulometria

RESULTADOS

A amostra apresentou um grau de biodegradabilidade de 83,1%.

RELATÓRIO DE ENSAIO

DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DE DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO EM SISTEMA FECHADO B2 – 032038.R

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO

A amostra deve atingir um mínimo de 60% de biodegradação em 10 dias após atingir 10% de biodegradação inicial.

O controle utilizando glicose deve apresentar um mínimo de 60% de desprendimento de CO₂ teórico num intervalo de 10 dias após atingir 10% de biodegradação.


O ensaio de inibição deve atingir um desprendimento mínimo de 25% de CO₂ no mesmo intervalo e condições referentes ao controle biodegradável (glicose).

As opiniões e interpretações expressas abaixo não fazem parte do escopo de acreditação deste laboratório.

CONCLUSÃO DETALHADA

A amostra foi considerada facilmente biodegradável.

- Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.
- Amostragem realizada pelo cliente.
- As amostras foram analisadas como recebidas, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio das amostras.
- Este relatório atende os requisitos da NBR ISO/IEC 17025, o qual garante a rastreabilidade dos dados gerados no ensaio.
- É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.
- Referência bibliográfica: OECD – Guideline for testing of Chemicals – 301B CO₂ Evolution Test - Ready Biodegradability – 1992, CETESB – Projeto 83.04.00 Desenvolvimento e Implementação de testes para avaliação da biodegradação e bioconcentração de agentes químicos, São Paulo out. 1990.


Juliana Brito Amaro Ornaghi
Analista Responsável
CRQ 04491241 – IV Região


Gláucio Pereira Machado
Gerente Técnico
CRMV-SP 20396

=====