

LAUDO TÉCNICO DE AÇÃO VIRUCIDA

Empresa solicitante: USE PHITTA CREAM LTDA

Produtos testados: Gel creme PHTALOX 0,05%, Gel creme PHTALOX 0,25%, Álcool gel controle 70%, Álcool gel controle 46,8%.

Vírus testado: Coronavírus cepa **SARS-CoV-2** (COVID-19)

PROCEDIMENTO

ETAPA 01

O experimento foi realizado no Laboratório NB-3 (Biosafety Level 3) no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que segue todas as normativas de Biossegurança da OMS – Organização Mundial da Saúde ([https://www.who.int > csr > BisLabManual3rdwebport](https://www.who.int/csr/BisLabManual3rdwebport)) e obedecendo às Boas Práticas de Laboratório (BPL).

No experimento foi utilizada Epiderme Humana Reconstruída (*SkinEthic™ RHE*) da empresa EPISKIN (figura 1); Cultura de células Vero CCL-81 semeadas 1×10^5 células/poço em placa de 24 orifícios; Vírus *SARS.CoV2/human/Bra/SP02cc/2020* (número de acesso Genbank MT350282) na concentração 1×10^3 TCID₅₀/mL.

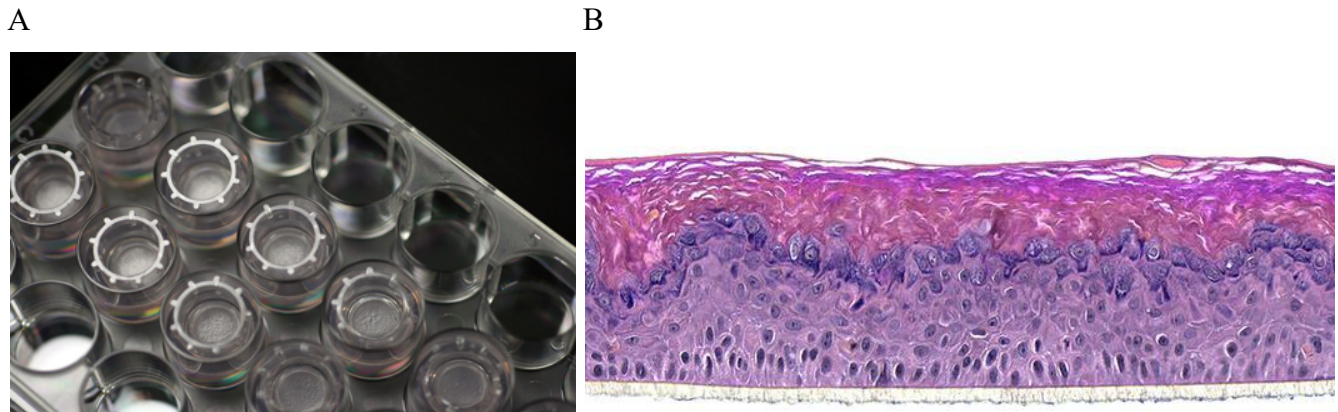


Figura 1: A) *SkinEthic™ RHE* - Epiderme humana reconstruída in vitro a partir de queratinócitos humanos cultivados em uma membrana de policarbonato em um meio quimicamente definido. B) Corte histológico da *SkinEthic™ RHE*. A epiderme reconstruída é histologicamente semelhante à epiderme humana in vivo.



ETAPA 02

As culturas de *SkinEthic™ RHE* foram recebidas no laboratório 24 horas antes do experimento. Cada “*transwell*” foi retirado do meio sólido, transferido para placa de 24 orifícios em meio de manutenção líquido e mantidos em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. No mesmo dia, placas de 24 orifícios com células Vero CCL-81 foram semeadas e mantidas na mesma temperatura e condição atmosférica.

ETAPA 03

Foram analisados nove produtos com diferentes tempos de ação. O creme *USE PHITTA CREAM* 0,05% e creme *USE PHITTA CREAM* 0,25% e os dois tipos de **Álcool Gel 70%** e **Álcool Gel 46,8%** foram investigados em cinco tempos de ação diferentes (5 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas).

Os *transwells* com *SkinEthic™ RHE* foram tratados com uma camada de produto teste e após o tempo determinado acima, foi adicionado 30µl da solução viral na superfície da *SkinEthic™ RHE* tratada.

Depois de 30 minutos, o sobrenadante foi retirado do *transwell* e inoculado em cultura de células. Após a inoculação a placa foi mantida por 30 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para adsorção viral. Após esse período, as placas foram observadas em microscópio óptico para verificação da integridade do tapete celular, para determinação de citotoxicidade do produto testado. Foi denominado como inóculo, 200µl de solução viral (1x10³ TCID₅₀/mL) adicionada em 270µl de “*Binding Solution*” e armazenado até o momento da realização de *Real-Time RT-PCR* de todas as amostras do experimento. Em seguida, os poços foram completados com 600µl de meio de cultura (DMEM) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino. A placa foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas em câmara úmida.

ETAPA 04

Após 72 horas de incubação, as placas foram observadas novamente em microscópio óptico para verificação da integridade do tapete celular em comparação com o controle negativo. E para a determinação de inibição de efeito citopático (mudanças morfológicas na célula hospedeira causadas pelo vírus inoculado) o tapete celular foi comparado com o controle positivo. Logo após a análise microscópica, foi coletado 200µl do sobrenadante de cada orifício e adicionado em 270µl de *Binding Solution* para realização de *Real-Time RT-PCR*. Após a coleta a placa de células foi fixada e corada com *Naphtol Blue Black* (Sigma-Aldrich).



ETAPA 05 – RESULTADO

Os sobrenadantes coletados após 72h foram submetidos a *Real-Time RT-PCR* para detecção do vírus SARS-CoV-2. A extração do material genético foi realizada utilizando sistema automatizado *NucliSENS® easyMag®* (BioMerieux, Lyon, France), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada utilizando o *Kit AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit* (Applied Biosystems Inc., EUA) em máquina de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), de acordo com protocolo, “primers” e sonda para identificação do gene E viral (Corman et al., 2020).

Os resultados de RT-PCR, representados por cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição estão representados na Tabela 01.

Tabela 01: Tempo de ação do produto, identificação da amostra, observações do tapete celular, observação de efeito citopático, número de cópias de RNA/reação e porcentagem de inibição viral de teste de inibição do SARS-CoV-2.

Tempo de ação	Amostra	Observação do Tapete celular		Efeito citopático	Duplicata A		Duplicata B		Redução média (%)
		Imediata	Após 72 horas		Número de cópias/reação	Redução (%)	Número de cópias/reação	Redução (%)	
5 min	Álcool Gel 70%	células soltas	Recup.	ausência	7,01E+00	100,00	1,68E+01	100,00	100,00
5 min	Álcool Gel 46,8%	células soltas	Recup.	xxx	8,51E+06	46,44	5,18E+06	67,41	56,92
1 hora	Álcool Gel 70%	células soltas	Recup.	xxx	8,51E+06	46,44	5,18E+06	67,41	56,92
1 hora	Álcool Gel 46,8%	células soltas	Recup.	xxx	2,24E+07	35,79	2,28E+07	34,49	35,14
2 horas	Álcool Gel 70%	células soltas	Recup.	xxx	3,07E+07	11,97	2,31E+07	33,60	22,79
2 horas	Álcool Gel 46,8%	células soltas	Recup.	xxx	2,24E+07	35,79	2,28E+07	34,49	35,14
3 horas	Álcool Gel 70%	células soltas	Recup.	xxx	2,24E+07	35,79	2,28E+07	34,49	35,14
3 horas	Álcool Gel 46,8%	células soltas	Recup.	xxx	8,51E+06	46,44	5,18E+06	67,41	56,92
4 horas	Álcool Gel 70%	células soltas	Recup.	xxx	3,07E+07	11,97	2,31E+07	33,60	22,79
4 horas	Álcool Gel 46,8%	células soltas	Recup.	xxx	2,74E+07	21,47	2,65E+07	24,06	22,76



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



5min	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	5,81E+01	100,00	5,14E+01	100,00	100,00
5min	Creme PHTALOX 0,25%	ok	ok	ausência	1,78E+01	100,00	3,83E+01	100,00	100,00
1hora	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	3,09E+01	100,00	1,15E+02	100,00	100,00
1hora	Creme PHTALOX 0,25%	ok	ok	ausência	1,70E+02	100,00	9,04E+01	100,00	100,00
2horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	xx	2,33E+06	93,32	2,01E+06	95,63	94,47
2horas	Creme PHTALOX 0,25%	ok	ok	x	3,15E+06	90,96	2,61E+06	92,51	91,73
3horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	1,73E+01	100,00	1,03E+02	100,00	100,00
3horas	Creme PHTALOX 0,25%	ok	ok	x	3,68E+05	98,94	7,29E+05	97,91	98,43
4horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	2,49E+02	100,00	1,25E+02	100,00	100,00
4horas	Creme PHTALOX 0,25%	ok	ok	x	2,02E+05	98,73	2,75E+06	97,77	97,25
Controle Positivo		3,49E+07							
Inóculo		5,18E+04							

Legenda: Recup.: tapete celular recuperado.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



ETAPA 06 - CONCLUSÃO

Com base na observação de efeito citopático, citotoxicidade e comparação de resultados de *Real-Time RT-PCR* obtivemos as seguintes porcentagens de inibição do vírus SARS-CoV-2 (Tabela 2).

Tabela 02: Resultado do teste de inibição viral de SARS-CoV-2

5min	Álcool Gel 70%	100% de redução viral
5min	Álcool Gel 46,8%	Média de 56% de redução viral
1hora	Álcool Gel 70%	Média de 56% de redução viral
1hora	Álcool Gel 46,8%	Média de 35% de redução viral
2 horas	Álcool Gel 70%	Média de 22% de redução viral
2 horas	Álcool Gel 46,8%	Média de 35% de redução viral
3 horas	Álcool Gel 70%	Média de 35% de redução viral
3 horas	Álcool Gel 46,8%	Média de 56% de redução viral
4 horas	Álcool Gel 70%	Média de 22% de redução viral
4 horas	Álcool Gel 46,8%	Média de 22% de redução viral
5min	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
5min	Creme PHTALOX 0,25%	100% de redução viral
1hora	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
1hora	Creme PHTALOX 0,25%	100% de redução viral
2horas	Creme PHTALOX 0,05%	Média de 94% de redução viral
2horas	Creme PHTALOX 0,25%	Média de 91% de redução viral
3horas	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
3horas	Creme PHTALOX 0,25%	Média de 98% de redução viral
4horas	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
4horas	Creme PHTALOX 0,25%	Média de 97% de redução viral



Estamos à disposição para maiores informações.

São Paulo, 10 de outubro de 2023

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon
Prof. Titular
ICB II – USP

Dra. Danielle B. L. Oliveira
Pesquisadora Colaboradora
ICB II-USP

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/>

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

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246e251. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701