



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCV)

Instituto de Ciências Biomédicas II

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil  
fone : 55 11 - 3091.7293 e-mail: eldurigo@usp.br



1/5

## **Estudo de Ação In Vivo Virucida do PHITTA CREAM (*creme hidratante com proteção antisséptica para as mãos*) Contra Virus *hRSV/human/Bra/SP025cc/2023* (número de acesso Genebank MT32654) *Diretamente na Epiderme da Superfície das Mãos de Voluntários Humanos.***

**Empresa solicitante:** USE PHITTA CREAM LTDA

**Produtos testados:** Gel creme PHTALOX 0,05%.

**Análise Realizada:** Determinação da Análise Virucida *In Vivo* do Phitta Cream, contra o vírus *hRSV/human/Bra/SP025cc/2023* (número de acesso Genebank MT32654) *diretamente na epiderme da superfície das mãos de voluntários.*

**Vírus testado:** Família Paramixoviridae ; Genero Pneumovirus; Vírus Respiratório Sincicial humano (hRSV). Equivalência de resultados aos ensaios de ação virucida contra os vírus SARS-CoV-2, Influenza A H1N1, Monkeypox virus, e ação bactericida, frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027; *Escherichia coli* ATCC8739; *Salmonella Choleraesuis* ATCC10708) e *Leptospira Biflexa* (Strain Patoc 1)

### **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> ) e obedecendo às Boas Práticas de Laboratório (BPL).

No experimento foi utilizada Epiderme Humana da região palmar ( 5 pontos independentes) de 2 voluntários, sendo que cada voluntário realizou o mesmo estudo em triplicata; Cultura de células Vero CCL-81 semeadas  $1 \times 10^5$  células/poço em placa de 24 orifícios; Vírus *hRSV/human/Bra/SP025cc/2023* (número de acesso Genebank MT32654) na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL.



## **ETAPA 02**

Foram analisados cinco produtos com diferentes tempos de ação. O Gel Creme PHTALOX 0,05% foram investigados em cinco tempos de ação diferentes (5 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas).

Os *vírus* na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL e embebido em papel watman estéril com membrana de nitrocelulose. Após as mãos dos voluntários serem tratadas com uma camada de produto teste e após o tempo determinado acima, foi adicionado 30µl da solução viral na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL na superfície da *pele humana* tratada.

Depois de 1 minuto de contato com a pele dos voluntarios, o inóculo ( papel filtro wartman embebido com o hRSV na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL foi retirado e inoculado em cultura de células. Após a inoculação a placa foi mantida por 30 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> 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 ( $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/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 CO<sub>2</sub> por 72 horas em câmara úmida.

## **ETAPA 03**

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 04 – RESULTADO

Os sobrenadantes coletados após 72h foram submetidos a *Real-Time RT-PCR* para detecção do vírus no inóculo. 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 F viral (Oliveira et al, 2012).

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 Vírus *hRSV/human/Bra/SP025cc/2023* (número de acesso Genebank MT32654) na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL. .

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 (%)	
5min	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	5,81E+01	100,00	5,14E+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
2horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	xx	2,33E+06	93,32	2,01E+06	98,63	98,47
3horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	x	3,68E+05	98,94	7,29E+05	97,91	98,43
4horas	Creme PHTALOX 0,05%	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.



## ETAPA 05 - 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 *hRSV/human/Bra/SP025cc/2023* (número de acesso Genebank MT32654) na concentração  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL e mostrando equivalência de resultado por testes anteriores ao ensaio de ação virucida contra os vírus SARS-CoV-2, Influenza A H1N1, Monkeypox virus, e ação bactericida, frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027; *Escherichia coli* ATCC8739; *Salmonella Choleraesuis* ATCC10708) e *Leptospira Biflexa* (Strain Patoc 1)(Tabela 2): Todo o estudo foi realizado em duplicata (A e B) e cada voluntário foi testado 5 pontos independentes de coleta.

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

5min	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
1h	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
2h	Creme PHTALOX 0,05%	98,47% de redução viral
3 h	Creme PHTALOX 0,05%	98,43% de redução viral
4h	Creme PHTALOX 0,05%	97,25% de redução viral

Estamos à disposição para maiores informações.

São Paulo, 14 de Novembro de 2023

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

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