



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



DEPARTAMENTO DE
MicroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM)

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

LAUDO TÉCNICO DE AÇÃO VIRUCIDA EM GEL CREME CONTRA VIRUS MONKEYPOX *vírus Monkeypox (MPXV - número de acesso Genbank ON751962.1)*

Empresa solicitante: USE PHITTA CREAM LTDA

Produtos testados: Gel creme PHTALOX 0,05%

Vírus testado: Monkeypox (*MPXV - número de acesso Genbank ON751962.1*)

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).



DILUIÇÃO SERIADA	4mL	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL
Creme						



Meio de cultura:	Nada	2mL	2mL	2mL	2mL
Antes do vírus/meio:	Puro	1/2	1/4	1/8	1/16
Depois do vírus/meio:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32





Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



DEPARTAMENTO DE
MicroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM)

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



2/5

ETAPA 02

Microplacas contendo lamínulas pré adsorvidas para estudo in vitro de aderência.

ETAPA 03

O Gel Creme PHTALOX 0,05% foi investigado em cinco tempos de ação diferentes (5 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas).

As micro lamínulas foram tratados com uma camada de produto teste e após o tempo determinado acima, foi adicionado 30 μ l da solução viral na superfície da *microplaca* 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, 200 μ l de solução viral (1x10³ TCID₅₀/mL) adicionada em 270 μ l 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 600 μ l 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 200 μ l do sobrenadante de cada orifício e adicionado em 270 μ l de *Binding Solution* para realização de *Real-Time RT-PCR*. Após a coleta a placa de células foi fixada e corada com *Naphthol Blue Black* (Sigma-Aldrich).



ETAPA 05 – RESULTADO

Os sobrenadantes coletados após 72h foram submetidos a *Real-Time PCR* para detecção do vírus Monkeypox (MPXV - número de acesso Genbank ON751962.1). A extração do material genético foi realizada utilizando sistema automatizado *NucliSENS® easyMag®* (*BioMerieux, Lyon, France*), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do DNA viral foi realizada utilizando o *Kit AgPath-ID One-Step 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 específicos para identificação do gene do MPXV

Os resultados de PCR, representados por cópias de DNA/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 DNA/reAÇÃO e porcentagem de inibição viral de teste de inibição do Monkeypox (MPXV - número de acesso Genbank ON751962.1)

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	5,71E+01	100,00	5,94E+01	100,00	100,00
1hora	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	2,09E+02	100,00	1,95E+02	100,00	100,00
2horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	2,38E+01	100,00	2,25E+01	100,00	100,00
3horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	1,73E+01	100,00	1,03E+02	100,00	100,00
4horas	Creme PHTALOX 0,05%	ok	ok	ausência	1,49E+02	99,96	1,58E+01	99,98	99,97
Controle Positivo		3,49E+07							
Inóculo		5,18E+04							

Legenda: Recup.: tapete celular recuperado.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



DEPARTAMENTO DE
MicroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM)

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



4/5

ETAPA 06 - CONCLUSÃO

Com base na observação de efeito citopático, citotoxicidade e comparação de resultados de *Real-Time PCR* obtivemos as seguintes porcentagens de inibição do vírus Monkeypox (MPXV - número de acesso Genbank ON751962.1) Tabela 2:

Tabela 02: Resultado do teste de inibição viral de SARS-CoV-2- Variante B.1.1.

5min	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
1hora	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
2horas	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
3horas	Creme PHTALOX 0,05%	100% de redução viral
4horas	Creme PHTALOX 0,05%	99,97% 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



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



DEPARTAMENTO DE
MicroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM)

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



5/5

Bibliografia Consultada:

ANVISA - Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 4, DE 2 DE JULHO DE 2013http://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>