LAUDO TÉCNICO DE AÇÃO VIRUCIDA em até 4 Horas do *PHITTA CREAM* (*creme hidratante com proteção antisséptica para as mãos) CONTRA VIRUS SARS.CoV2 VARIANTE BQ.1.1 (SARS.CoV2/BQ.1.1/human/Bra/SP-HIAE/ICB/11/2022*

Empresa Solicitante: USE PHITTA CREAM LTDA

Lote bisnaga 80ml L2411004 Val 11/26

PHITTA CREAM FÓRMULA QUALI QUANTI

COMPONENTES	%	INCI NAME	%	CAS #	FUNÇÃO
ÁGUA DEIONIZADA	77,85	Water	77,85	7732-18-5	Solvente
EMULFIT 415	2,30	Polyacrylamide	0,9775	9003-05-08	Formador de filme
		Water	0,69	7732-18-5	Solvente
		C13-14 Isoparaffin	0,575	246538-79-4	Emoliente
		Laureth-7	0,0575	3055-97-8 / 68439-50-9 / 9002-92-0	Emulsionante
ÓLEO MINERAL USP 70	1,00	PARAFFINUM LIQUIDUM	1,00	8012-95-1 / 8042-47-5	Emulsionante
ALCOOL ETÍLICO 96	18,00	ALCOHOL	18,00	64-17-5	Antimicrobiano
CHEMYNOL F	0,80	Phenoxyethanol	0,80	122-99-6	Conservante
PHTALOX	0,05	FERRIC TETRACARBOXYPHTHALOCYANIN	0,05	71667-29-3	Condicionador da Pele

Vírus testado: VIRUS SARS.CoV2 VARIANTE BQ.1.1 ***(SARS.CoV2/BQ.1.1 /human /Bra/SP-HIAE/ICB/11/2022);***

ETAPA 01

Material recebidos para teste de inibição viral:
LOTE BISNAGA 80ML L2411004 VAL 11/26

Os experimentos foram realizados 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 obedece às Boas Práticas de Laboratório (BPL).

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

Utilizou-se cultura de células Vero CCL-81 semeadas $1x10^5$ células/poço em placa de 24 orifícios e vírus *SARS.CoV2/BQ.1.1/human/Bra/SP-HIEA/ICB/11/2022* (sem número de acesso Genebank) na concentração $1x10^3$ $TCID_{50}$/mL.

Os testes para avaliar a atividade virucida foram feitos de acordo com a **Normativa EN 14476:2013-A2:2019 como Método Padrão para avaliar a atividade de desinfetantes e antissépticos**.

ETAPA 02

Dois experimentos foram realizados: teste de eficácia de inativação do SARS-CoV-2 e teste de citotoxicidade (propriedade nociva de uma substância capaz de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, que as levam à morte ou perda de suas funções).

Os cremes foram utilizados em tres diferentes diluições: 1/2, 1/4 e 1/8. Em uma das duplicatas foi adicionado 3 mL de SARS-CoV-2, denominado "mix-V" (mix vírus) e nas outras duplicatas foi adicionado 3 mL de meio DMEM puro, denominado "mix-C" (mix citotoxicidade - sem vírus). Também foram realizados controle positivo (vírus sem nenhum tipo de produto) e controle negativo (meio de cultura sem nenhum tipo de produto e ausência de vírus). Todos os tubos foram agitados em "vórtex" e incubados por 1 hora em temperatura ambiente.

Em uma placa de 24 orifícios foram inoculados 50 µL do "mix-V" de cada amostra em duplicata para determinação da eficácia de cada diluição dos cremes. E em outra placa, seguindo o mesmo padrão, foi realizado o experimento de citotoxicidade (mix-C) de acordo com os esquemas apresentados nas Figuras 01 e 02. O experimento foi repetido nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas do início da incubação.

Figura 01: Placa "mix-V" - Representação esquemática do teste de inibição do vírus SARS-CoV-2

Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/2	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/2
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/4	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/4
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/8	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/8
Controle negativo	Controle positivo

Figura 02: Placa "mix-C" - Representação esquemática do teste de citotoxicidade do **PHITTA CREAM (*creme hidratante com proteção antisséptica para as mãos*)**

Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/2	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/2
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/4	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/4
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/8	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/8
Controle negativo	Controle positivo

Após a inoculação a placa foi mantida por 30 minutos em estufa a 37^0C com atmosfera de 5% CO2, com agitação a cada 10 minutos para adsorção viral (placa "mix-V") e efeito citotóxico (placa "mixC"). Após o período de adsorção o inóculo foi retirado e as placas foram observadas em microscópio óptico para determinação da integridade do tapete celular e assim observar se há efeito de citotoxicidade nos cremes testados. Neste experimento apenas a diluição 1/2 dos produtos causaram a perda da borda do tapete celular, mas o tapete se recuperou durante o período de incubação. Nas demais diluições não houve observação de mudanças morfológicas no tapete celular após o período de adsorção. Em seguida, os poços foram completados com 1mL de meio de cultura (DMEM) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino. As placas foram mantidas em estufa a 37^0C com atmosfera de 5% de CO2 por 72 horas em câmara úmida. Foi denominado como "inóculo" 200 µl de vírus ($1x10^3$ $TCID_{50}$/mL) adicionado em 270µl de *"binding Solution"* e armazenado até o momento da realização de *Real-Time RT-PCR*.

ETAPA 03

Após 72 horas de incubação, as placas foram observadas novamente em microscópio óptico. No teste de citotoxicidade a observação é realizada para verificação da integridade do tapete celular em comparação com o controle negativo. Já no teste viral é feita a determinação de inibição de efeito citopático (mudanças morfológicas na célula hospedeira causadas pelo vírus inoculado) 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 foi fixada e corada com *Naphtol Blue Black* (Sigma-Aldrich).

Figura 03: Leitura da Placa "mix-C" (teste de citotoxicidade) após 72 horas. Observação de poços que receberam produtos (creme) em **comparação com o controle negativo**, representada com cruzes.

Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/2 ok	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/2 ok
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/4 ok	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/4 ok
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/8 ok	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/8 ok
Controle negativo	

Legenda: x - tapete celular íntegro com presença de pouquíssimas células mortas; xx - tapete celular íntegro com presença de algumas células mortas; xxx - tapete celular com células aderidas, porém com muitas células mortas; xxxx - poucas células aderidas e presença de muitas células mortas.

Figura 04: Leitura da Placa "mix-V" (teste viral) após 72 horas. Comparação de poços que receberam produto (creme) em **comparação com o controle positivo**.

Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/2 **Negativo**	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/2 **Negativo**
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/4 **Negativo**	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/4 **Negativo**
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/8 **Redução ECP**	**Bisnaga Lote 2411004** Diluição 1/8 **Redução ECP**
Controle negativo	Controle positivo **Positivo xxxx**

Legenda: Positivo- presença de ECP no tapete celular na mesma intensidade do controle positivo ("xxx"); **Negativo-** ausência de ECP no tapete celular**; Redução ECP-** redução no ECP quando comparado com o controle positivo**;** A quantidade de cruzes representa a intensidade de efeito citopático comparado com o controle positivo representado com intensidade 4 ("xxxx"). Observação: O efeito de citotoxicidade pode ser muito parecido com o efeito citopático causado pelo vírus, podendo ser feita a diferenciação quando analisado os resultados de *Real-Time RT-PCR*.

ETAPA 04

Os sobrenadantes de cada tempo de incubação (em até 4 horas) foram 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 RTPCR Kit* (*Applied Biosystems Inc., EUA*) em máquina de PCR em Tempo Real 7500 (*Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany*), de acordo com protocolo, com "*primers*" e sonda específicos para SARS-CoV-2.

Os resultados de RT-PCR, representados por cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição estão representados na Tabela 5. O experimento foi repetido nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas do inicio da incubação.

Tabela 05: Número de cópias de RNA/reação e porcentagem de inibição viral de teste de inibição do *SARS.CoV2/BQ.1.1/human/Bra/SP-HIAE/ICB/11/2022*.

Amostra em duplicata	Número de cópias/reação	Redução (%)	Citotoxicidade	Número de cópias/reação	Redução (%)	Citotoxicidade
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/2	1,50E+01	100	Neg	1,59E+01	100	Neg
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/4	2,50E+01	100	Neg	1,87E+01	100	Neg
Bisnaga Lote 2411004 Diluição 1/8	1,60E+01	100	Neg	1,62E+01	100	Neg

Legenda da citotoxicidade - Observação em microscópio óptico após 72 horas em comparação com o controle negativo: x - tapete celular íntegro com presença de pouquíssimas células mortas; xx - tapete celular íntegro com presença de algumas células mortas; xxx - tapete celular com células aderidas, porém com muitas células mortas; xxxx - poucas células aderidas e presença de muitas células mortas.

CONCLUSÃO

Com base na observação de efeito citopático, citotoxicidade e comparação de resultados de *Real-Time RT-PCR* obtivemos as seguintes porcentagens de inibição dos vírus *SARS.CoV2/BQ.1.1/human/Bra/SP-HIAE/ICB/11/2022);* O experimento foi repetido nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas do inicio da incubação. (tabela 6):

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 –
CEP: 05508-900
São Paulo, SP – Brasil fone: +55 11 3091.7293
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
e-mail: eldurigo@usp.br

Tabela 06: Resultado do teste de inibição viral de PHITTA CREAM (Bisnaga Lote 2411004) contra SARS-CoV-2 e outros vírus.

Phitta Cream Bisnaga Lote 2411004 - Diluição 1/2	100% de redução viral em até 4 horas de incubação
Phitta Cream Bisnaga Lote 2411004 - Diluição 1/4	100% de redução viral em até 4 horas de incubação
Phitta Cream Bisnaga Lote 2411004 - Diluição 1/8	100% de redução viral em até 4 horas de incubação

A quantificação da citotoxicidade é realizada de forma ocular em microscópio óptico em comparação com o controle negativo e é representada com cruzes. Quando há uma cruz (x) é considerada leve, ou seja, o tapete celular está íntegro, mas existe a presença de pouquíssimas células mortas. Se há duas cruzes (xx) é considerada baixa citotoxicidade, onde o tapete celular está íntegro com presença de algumas células mortas. Na presença de três cruzes (xxx) considera-se citotoxicidade moderada, no tapete celular há células aderidas, porém com presença de muitas células mortas. E por último, na observação de quatro cruzes (xxxx), a citotoxicidade é considerada elevada, pois há poucas células aderidas e presença de muitas células mortas.

Estamos à disposição para maiores informações.

São Paulo, 05 outubro de 2025

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

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