



Profa Dra Clarice Weis Arns
Laboratório de Virologia Animal
Depto. de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia/UNICAMP CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FAX: (19) 3788-6276 / 3289-3124 FONE: (19) 37 88-6258/6267
Email: arns@unicamp.br



Relatório:02

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 18 de agosto de 2006

- Relatório do Ensaio: Ação antiviral da substância teste DESINFETANTE BLANCO frente aos grupos de vírus com o genoma RNA, Envelopado como o grupo dos herpesvirus e HIV.
- Executado por: **Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)-SP**
Rua Monteiro Lobato, SN
Caixa Postal 6109 CEP: 13083-862
Campinas-SP <http://www.ib.unicamp.br/profs/arns/>
- Patrocinador: OLEAK INDÚSTRIA E COMERCIO LTDA
Rua Rondônia, n 186 – Jardim Maria Tereza
Fone: (11) 4616-0855 – FAX: (11) 4616-0138
CEP: 06703-710, Cotia-SP

Paula Salek de Siqueira Porto

- Bióloga Responsável: Paula Salek de Siqueira Porto
(Matricula-Unicamp: 103756)
Fone: (19) 3788-6258

- Professor Responsável: Profa Dra Clarice Weis Arns
(Matricula-Unicamp: 224626)
Fone: (19) 3788-6258

Clarice Weis Arns
Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS
Lab. Virologia Animal
Depto. Microbiologia e Imunologia
Inst. Biologia - UNICAMP

Data de Conclusão: Maio/2006

1. INFORMAÇÕES DA SUBSTANCIA TESTE

| | |
|---|---|
| Substância teste | Substância teste DESINFETANTE BLANCO |
| Data recebimento: | 10/12/2005 |
| Data término do ensaio: | 02/05/2006 |
| Composição declarada pelo patrocinador | Água qsp 100% 95,416 % Barquat 4250Z lote G 4223385(Cloreto de dimetilbenzil amônio 25% + Cloreto de dimetiletilbenzil amônio 25%) 0,500 % EDTA tetrassódico 0,200 % Álcool etílico 2,000 % Nonilfenol etoxilado 9,0 MOE 1,200 % Fragrância 0,500 % Corante Vermelho CI 14.720 sol. 1% 0,084 % Corante Azul Reafix CI 42.090 sol. 1% 0,100 % |
| Origem da Substância teste | OLEAK INDÚSTRIA E COMERCIO LTDA |
| Número da amostra do Laboratório IB-UNICAMP | LVA-AV17 |

2. MATERIAL E MÉTODOS

Antes da avaliação antiviral propriamente dita, foi verificado o efeito tóxico dos extratos utilizados para a cultura de células por dois métodos: a alteração da morfologia celular, com a determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) e a captação do vermelho neutro como medida da viabilidade, com determinação da dose citotóxica para 50% das células em cultura (DICC₅₀).

Foram utilizados dois cultivos celulares de linhagens contínuas, VERO (células derivadas de rim de macaco verde) e CER (Chicken Embryo Related). As células foram inoculadas em placas de 96 orifícios adicionando 50 µl de células com uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/orifício, logo a seguir foi adicionado o desinfetante diluído em meio mínimo essencial de Eagle (MEM), acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB - Sigma Chemical Company), puro, e em diferentes concentrações (0,5% a 5%). As placas foram incubadas por 72 hs em incubadora a 37° e 5% de CO₂. A leitura foi realizada 24, 48, 72 horas após a inoculação para a observação do limite do efeito tóxico do desinfetante.

Após a determinação da CMNT, foram iniciados os experimentos para a avaliação da atividade antiviral. Foram adicionadas 50 µl das diferentes concentrações da substância teste DESINFETANTE BLANCO (0,5% a 5%) e 50 µl dos diferentes vírus no tubo de eppendorf[®], homogeneizados e inoculados 50 µl na placa de 96 orifícios nas diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ (os vírus e a substância teste foram avaliados

com quatro repetições). Após 1 hora de incubação (adsorção vírus+desinfetante) foram adicionados 100 µl de célula por orifício. As placas foram incubadas por diferentes períodos (dependendo dos vírus) em estufa a 37° a 5% de CO₂. O controle da reação foi realizado com as células e MEM e a titulação dos vírus sem o produto desinfetante.

Após este período as placas foram avaliadas microscopicamente para a avaliação do Efeito citopático (CPE), este efeito é produzido através da infecção lítica das células pela replicação viral do vírus citopatogênico no qual as células são mortas ou alteradas.

O efeito antiviral foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938) que é amplamente utilizado por ser um método simples e rápido. A avaliação é visual através da observação em microscópio dos orifícios e verificação da ocorrência do Efeito Citopático (CPE) ou não. Considerando resultado negativo a ocorrência de CPE e positivo quando não apresentar o CPE isto é, o desinfetante inibiu a ação viral sobre a célula. O cálculo da dose infectante 50% (DICC₅₀), isto é a dose que apresenta CPE em 50% das culturas na mesma diluição viral.

3. RESULTADOS E CONCLUSÃO

O objetivo do teste foi avaliar o potencial ANTIVIRAL da substância teste DESINFETANTE BLANCO frente a diferentes grupos de vírus RNA, Envelopados como o Herpesvírus e o HIV, ou seja, se o produto em análise era capaz de impedir a multiplicação do vírus *in vitro*. Como todo o teste foi realizado em cultivo celular (para que ocorra a replicação do vírus) foi realizado um teste preliminar para a determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). O produto teste (com as diferentes concentrações de 0,5% a 5%) foi adicionado e homogeneizado aos vírus (v/v) e logo a seguir foi realizada a titulação dos mesmos na diluição de 10¹ a 10¹⁰.

Os resultados mostraram que o produto DESINFETANTE BLANCO foi 100% eficiente na concentração de 5% para ambos os grupos de vírus testados.

- Foi realizada uma titulação do homogeneizado (vírus e do DESINFETANTE BLANCO nas diferentes concentrações) na diluição de 10¹ a 10¹⁰ com quatro repetições.
- A melhor concentração do produto testado foi de 5% com uma redução total da atividade viral (100%), ou seja não houve multiplicação dos vírus frente ao produto testado nesta concentração.
- A substância teste DESINFETANTE BLANCO mostrou ser eficiente contra vírus com o genoma RNA, Envelopado (com envelope), concluindo que o mesmo é eficiente para os grupos como herpesvírus e HIV.

- Na determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) onde foram testadas diferentes concentrações do produto desinfetante aplicada nos cultivos de células de linhagem, a substância teste DESINFETANTE BLANCO mostrou ser tóxico em cultivos de células de linhagem (VERO e CER).

De acordo com a metodologia utilizada a substância teste DESINFETANTE BLANCO foi considerada eficiente como desinfetante de uso em geral.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNS, C.W.; KOHN L.K; REHDER, V.L.G.; VILELA, L. & CARVALHO J.E
Antiviral activity of *Phyllanthus niruri* L. and *Phyllanthus Amarus* S. Crude extracts against Avian Pneumovirus.
10th National Meeting of Virology and 2nd Mercosul Meeting of Virology, Curitiba, PR, p. 61-61, 21-24/11/1999.

REED L.J., MUECH, H. – A simple method of estimating fifty percent end points.
Am. J Hyg. 27:493-497, 1938

SIMONI, I.C., FERNANDES, M.J.B., GONÇALVES, C.R., ALMEIDA, A.P., COSTA, S.S.; LIMA, A.P.
A study on the antiviral characteristics of *Persea americana* extracts against Aujeszky's disease virus.
Biomedical Letters, v.54, p.173-181, 1996.

SIMONI, C. I.; FERNANDES, B. M. J.; CUSTÓDIO, R.M.; MADEIRA, A. M. B. N. & ARNS, C.W. (1999)
Susceptibility of cell lines to avian viruses
Journal of Brazilian Society for Microbiology, Vol. 30, p: 373-376

WIGG, M.D.; AL -JABRI, A.; COSTA, S.S.; RACE, E.; BODO, B.; OXFORD, J.
In vitro virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves.
Antiviral Chem. Chemother, v.7, p.179-183, 1996.