



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THAIS BONATTO BORGHI E SILVA

Aplicação da Luz Ultravioleta sobre o coronavírus MHV-3 como
modelo padrão para testes de redução de carga viral do coronavírus
SARS-CoV-2.

CAMPINAS
2023

THAIS BONATTO BORGHİ E SILVA

Aplicação da Luz Ultravioleta sobre o coronavírus MHV-3 como modelo padrão para testes de redução de carga viral do coronavírus SARS-CoV-2.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLARICE WEIS ARNS

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela Aluna Thais Bonatto Borghi e Silva, e orientada pela Profa. Dra. Clarice Weis Arns.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38a Silva, Thais Bonatto Borghi, 1997-
Aplicação da Luz Ultravioleta sobre o coronavírus MHV-3 como modelo padrão para testes de redução de carga viral do coronavírus SARS-CoV-2 - . / Thais Bonatto Borghi e Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. SARS-CoV-2. 2. Raios ultravioleta. 3. COVID-19. 4. Esterilização. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Application of Ultraviolet Light on the MHV-3 coronavirus as a standard model for testing the viral load reduction of the SARS-CoV-2 coronavirus

Palavras-chave em inglês:

SARS-CoV-2

Ultraviolet rays

COVID-19

Sterilization

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Mariangela Ribeiro Resende

Luís Antonio Peroni

Data de defesa: 09-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5917-5006>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/1857441803617601>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

NOME DO ALUNO – COMO CONSTA NA ATA DE DEFESA

ORIENTADOR: Clarice Weis Arns

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. Clarice Weis Arns
2. PROF. DR. Mariangela Ribeiro Resende
3. PROF. DR. Luís Antonio Peroni
4. PROF. DR.
5. PROF. DR.

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 09/02/2023

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Agradeço aos meus pais que estiveram sempre ao meu lado nessa jornada. Agradeço aos meus guias que estiveram comigo nesse processo evolutivo. Agradeço aos meus amigos do laboratório por me lembrarem que não estou sozinha.

RESUMO

A pandemia provocada pelo coronavírus SARS-CoV-2 tornou-se um problema global de saúde rapidamente. À vista disso, a procura por novos métodos de desinfecção do ambiente hospitalar e de fômites teve uma alta demanda devido à alta transmissão e virulência deste patógeno. Neste contexto, a avaliação da eficácia da luz ultravioleta C, como um método alternativo visando a rápida e eficiente desinfecção do ambiente, fez-se necessário. Nesse trabalho, utilizou-se o coronavírus hepatite murina (MHV-3), pertencente ao mesmo gênero do SARS-CoV-2 (*Betacoronavirus*) como modelo padrão substituto na realização dos experimentos. O ambiente utilizado para os testes foi uma sala para exame de tomografia, onde três pontos principais de maior contato humano foram previamente estabelecidos: P1 maca onde o paciente se deita para o exame; P2 painel de controle do aparelho de ressonância; P3 armário onde guardava insumos para utilizar durante o exame. Uma torre de UVC com comprimento de onda de 254nm foi utilizada para a realização de dois tipos de testes, sendo primeiro o teste de medição e o segundo o teste de exposição viral. O teste de medição foi realizado 10 vezes em cada ponto por 1 min e 30s com a finalidade de encontrar a dose média mínima eficaz de 22 mJ/cm². O teste com vírus MHV-3 foi exposto 5 vezes em cada ponto pelo mesmo período de tempo, sendo posteriormente inoculado em células L-929 e o resultado acompanhado através da microscopia, verificando a ausência de efeitos citopáticos como resposta de eficácia. Os resultados obtidos foram: uma redução de 4 logs (99,99%) nos pontos 1 e 2 e uma redução de 5 logs (99,999%) no ponto 3. O experimento conclui a eficácia de utilizar a UVC com alta potência em um período menor de tempo para a desinfecção do ambiente, tornando-se viável a utilização em lugares com alto fluxo de pessoas, que buscam um ambiente mais seguro.

Palavras-chave: UVC; SARS-CoV-2; COVID-19; Desinfecção.

ABSTRACT

The pandemic caused by the SARS-CoV-2 coronavirus has quickly become a global health issue. In view of this, the search for new methods of disinfection of the hospital environment and fomites had a high demand due to the high transmission and virulence of this pathogen. In this context, the evaluation of the effectiveness of ultraviolet C light, as an alternative method aimed at the rapid and efficient disinfection of the environment, became necessary. In this work, coronavirus murine hepatitis (MHV-3) belonging to the same genus of SARS-CoV-2 (*Betacoronavirus*) was used as a standard model surrogate in carrying out the experiments. The environment used for the tests was a CT scan room, where three main points of greater human contact were previously established: P1 stretcher where the patient lies down for the scan; P2 MRI machine control panel; P3 cabinet where I kept supplies to use during the exam. A UVC tower with a wavelength of 254nm was used to carry out two types of tests, the first being the measurement test and the second the viral exposure test. The measurement test was performed 10 times at each point for 1 min and 30s in order to find the minimum effective average dose of 22 mJ/cm². The MHV-3 virus test was exposed 5 times at each point for the same period, being subsequently inoculated into L-929 cells and the result followed through microscopy, checking for absence of cytopathic effects as an efficacy response. The results obtained were: a reduction of 4 logs (99.99%) in points 1 and 2 and a reduction of 5 logs (99.999%) in point 3. The experiment concludes the effectiveness of using UVC with high potency in a period shorter time to disinfect the environment, making it feasible to use in places with a high flow of people, who seek a safer environment.

Keywords: UVC; SARS-CoV-2; COVID-19; Disinfection.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Vírus	Erro! Indicador não definido.
1.2 Pandemia da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2)	11
1.3 Uso do coronavírus MHV-3 como modelo de ensaios para SARS-CoV-2....	12
1.4 Infecções Associadas aos cuidados de saúde (IACS).....	13
1.5 Viabilidade do vírus em superfícies	14
1.5 Luz e suas propriedades.....	14
1.6. Radiometria Versus Fotometria	16
1.8. Desinfecção de salas através da luz UVC.....	18
1.9. Efeito do UVC no microrganismo.....	20
1.10. Desvantagens da UVC	21
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivos Gerais	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Teste Virucida.....	30
4.1.1. Exposição do vírus	Erro! Indicador não definido.
4.1.2. Teste <i>in vitro</i>	34
4.1.3. Leitura microscópica.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Resultados das medições.....	37
5.2. Discussão	42

6.	CONCLUSÃO.....	45
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	46
8.	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Coronavírus-SARS-CoV-2

O coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) foi descoberto em dezembro de 2019, em Wuhan, na China e rapidamente se espalhou pelo globo devido a sua capacidade de transmissão antes da manifestação de sintomas, causando a pandemia conhecida como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (1,2). De acordo com o Comitê Internacional da Taxonomia de Vírus, os coronavírus pertencem à ordem Nidovirales, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, sendo o último subdividido em quatro gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. A origem do nome coronavírus decorre da aparência semelhante a uma coroa quando são visualizados através de microscopia eletrônica (1). Os coronavírus são pleomórficos ou esféricos, possuem 80-220 nm de diâmetro, e um envelope glicolipídico. O genoma consiste em uma única molécula de RNA de fita simples linear de sentido positivo, com tamanho de 25 a 31 kb, que se replica no citoplasma (2).

Os coronavírus podem possuir quatro ou cinco proteínas estruturais, a glicoproteína de pico principal (S), uma proteína de envelope (E), uma proteína de membrana (M), uma nucleoproteína (N) e, em alguns vírus, como o MHV-3, uma hemaglutinina esterase (HE), que forma a espícula mais curta do envelope viral (3). A proteína do "S" do envelope (proteína Spike) do SARS-CoV-2 reconhece a enzima conversora de angiotensina humana II (ACE2) como um receptor de entrada e infecta preferencialmente as células epiteliais pulmonares (14, 15). O domínio de ligação ao receptor da proteína Spike se liga ao receptor ACE2 e, em seguida, a protease TMPRSS2 do hospedeiro quebra a proteína Spike para expor os peptídeos de fusão capazes de fundir as membranas viral e celular (16). O tropismo celular de um vírus é determinado pela suscetibilidade das células hospedeiras a serem infectadas. Isso é determinado pela presença do receptor necessário para a entrada: o receptor ACE2 no caso específico do SARS-CoV-2.

A ACE2 é expressa em diversos tecidos humanos, incluindo pulmões, intestino delgado, rins, coração, tecido adiposo.

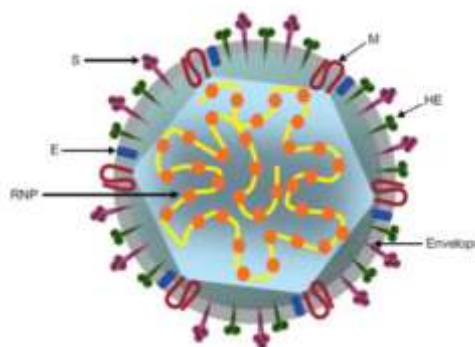


Figura 1. Esquema da partícula do coronavírus. (SANTOS, *et .al*, 2015) (3)

1.2 Pandemia da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2)

O SARS-CoV-2 é responsável pela pandemia de COVID-19, que é uma infecção respiratória aguda, potencialmente grave, de elevada transmissibilidade e de distribuição global.

Desde o início da década de 1970, uma variedade de condições patológicas tem sido atribuída a infecções por coronavírus (CoV) causando infecções respiratórias e intestinais em animais e humanos (3, 4).

Os coronavírus não eram considerados altamente patogênicos para os seres humanos até o surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1) em 2002 e 2003 na província de Guangdong na China, pois os coronavírus que circulavam antes desse período em seres humanos geralmente causavam infecções leves em pessoas imunocompetentes. Dez anos após o SARS, outro coronavírus altamente patogênico, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), surgiu em países do Oriente Médio. SARS-CoV-1 e MERS-CoV compartilham o mesmo gênero, *Betacoronavirus*, mas pertencem a linhagens distintas, linhagem A e linhagem B respectivamente (5,6,7). Em dezembro de 2019, houve um surto de uma nova infecção por coronavírus do gênero *Betacoronavirus*, linhagem C, denominada coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) em Wuhan na China. A rápida expansão do SARS-CoV-2 atraiu a atenção mundial, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (8,9) identificou como uma emergência de saúde pública de interesse internacional (10).

A maior morbidade e mortalidade de COVID-19 é observada em pacientes mais idosos, imunocomprometidos e pacientes internados em unidade de terapia intensiva (9,11). Em um estudo, utilizando um banco de dados, foi observado que de 169 hospitais na Ásia, Europa e América do Norte, a idade acima de 65 anos foi associada

a um maior risco de morte hospitalar (12, 13).

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode resultar em diversos sintomas (17,18), os mais comuns são a febre, tosse e fadiga. Outros sintomas que também foram observados incluem dor de cabeça, diarreia e perda de olfato (19, 20), demonstrando que o vírus SARS-CoV-2 pode infectar células em outros órgãos humanos (21). Existe a possibilidade também de a infecção ser assintomática causando pouca ou nenhuma manifestação clínica (22).

Na patologia da COVID-19, foi relatado que a resposta imune pode ser, em alguns casos, explosiva e danosa (23). Liberação de citocinas ou Síndrome de Liberação de Citocinas (SRC) no sangue periférico é observada em alguns indivíduos durante a segunda semana de infecção por COVID-19. Aproximadamente 8 dias após o início dos sintomas, quando ocorre em pacientes, a tempestade aguda de citocinas está associada a desfechos desfavoráveis, necessitando de cuidados em UTI e ventilação mecânica em algum momento (19). Metade dos pacientes hospitalizados para COVID-19 tinha uma comorbidade: hipertensão (30%); diabetes (19%); e doença coronariana (8%) (24). A taxa de letalidade foi elevada entre os pacientes com comorbidades preexistentes: doenças cardiovasculares (10,5%); diabetes (7,3%); doença respiratória crônica (6,3%); hipertensão (6,0%); e câncer (5,6%) (11).

A eficiência de transmissão do SARS-CoV-2 provou ser alta, e isso gera implicações importantes para as estratégias de contenção e mitigação. No início da pandemia, o número básico estimado de reprodução (R_0) foi de 2,2, o que significa que, em média, cada pessoa infectada espalhava a infecção para mais duas pessoas. As rotas de exposição que levaram a essa alta transmissão têm sido objeto de considerável discussão (25) e além da infecção por aerossóis, a transmissão indireta, através de contato com superfície contaminada é factível e deve ser considerada.

1.3 Uso do coronavírus MHV-3 como modelo de ensaios para SARS-CoV-2

O vírus da hepatite murina (MHV) é um *Betacoronavírus* de RNA de fita simples de sentido positivo, envelopado, que pertence ao mesmo gênero que o SARS-CoV-2 (71), porém não necessita de laboratório de nível de biossegurança 3 para ser manipulado, uma vez que não são patogênicos para humanos. Por possuir as mesmas características físico-químicas do SARS-CoV-2, o MHV é o substituto ideal para a utilização em experimentos (1, 26).

Ahmed e seus colaboradores (2020) estudaram e avaliaram os vírus SARS-CoV-2 e o MHV-3 no tratamento de efluentes e observaram que o MHV-3 é o melhor e mais adequado modelo substituto para o SARS-CoV-2, além de ser um promissor controle de processo para a vigilância de SARS-CoV-2, pode ser usado como uma medida de controle de qualidade para apoiar a mitigação de epidemias em nível comunitário e avaliação de risco (26, 27).

De acordo com Momtazmanesh et al (2021) , analisando a rápida disseminação da COVID-19 pelo mundo, é notável que as medidas de contenção além de terem sido insuficientes, não foram implantadas com a urgência necessária para interromper a pandemia no início (28). Métodos preventivos, abordagens diagnósticas sensíveis e uso de medicamentos são estratégias para controle da infecção, enquanto se desenvolvem novos tratamentos (28, 29, 30).

1.4 Infecções Associadas aos cuidados de saúde (IACS)

Desde a Idade Média há relatos de infecções misteriosas que não se sabia, ainda, o real motivo ou causa, fazendo com que diversas pessoas fossem a óbito. Somente a partir do século XIX diversas descobertas no âmbito do processo de desinfecção foram feitas. Uma descoberta de grande relevância foi a de Louis Pasteur, sobre a capacidade descontaminação de salas utilizando ácido carbólico (31).

Em 2016, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) dos EUA concluiu que a incidência de organismos causadores de IACS pode ser reduzida em até 35% após implementação de dispositivos antimicrobianos emissores de luz UV-C em conjunto com as estratégias de limpeza padrão, baseado em um estudo dos benefícios da desinfecção em sala terminal. Tal estudo demonstrou que os dispositivos automatizados emissores de UV-C promovem o decaimento da carga biológica de patógenos importantes em quartos de hospital. Foi reportado uma redução de casos clínicos de 30% a 70% em *Clostridium difficile*, com resultados semelhantes para MRSA (*Multiple-resistant Staphylococcus aureus*) e outros. A metodologia funciona, mas a adoção da tecnologia UV-C pelo setor de saúde tem sido esporádica (32).

O grande desafio no controle das infecções está inicialmente em preparar os profissionais de saúde para tal missão e garantir a adesão dos métodos estabelecidos, sendo assim importante que este profissional tenha contato com as

normas e legislações vigentes sobre as doenças e seus controles, porém é perceptível a enorme gama de patógenos existentes, o que dificulta esse controle de forma acirrada (33). Analisando essa dificuldade de controle e as diversas variáveis envolvidas, é importante buscar novas formas de desinfecção dos ambientes hospitalares, sejam eles mais ou menos utilizados, logo a opção de uma desinfecção por luz ultravioleta torna-se viável, como será demonstrado durante este trabalho, principalmente pela eficiência e agilidade empregada.

1.5 Viabilidade do vírus em superfícies

A pandemia da COVID-19 abriu diversas especulações sobre as formas de transmissão e como controlá-las, principalmente por conta da alta taxa de transmissão, motivando discussões a respeito de/ distanciamento social e barreiras de proteção (25).

Ainda que a transmissão direta seja reconhecida como o principal mecanismo de dispersão do vírus, a transmissão indireta por superfícies contaminadas também é possível. Estudos demonstram que superfícies de plástico e aço inoxidável, comparadas com o cobre e papelão, permitem que o vírus permaneça viável e infeccioso por até 72 horas (34). Além disso, SARS-COV-2 pode permanecer ativo por até 3 horas em aerossóis, até 4 horas em superfícies de cobre, em torno de 24 horas em superfícies de papelão, 48 horas em superfícies de aço inoxidável e 72 horas em superfícies plásticas (32).

O longo tempo de viabilidade do vírus em algumas superfícies evidencia a necessidade de encontrar formas eficazes de inativação do vírus (35). Nesse contexto, a UVC é uma alternativa germicida por conta das consequências que a exposição à luz ultravioleta gera na partícula viral, promovendo a sua inativação. É importante ressaltar que a luz UVC é totalmente absorvida nos primeiros micrômetros do objeto que esteja contaminado (35).

1.5 Luz e suas propriedades

A luz corresponde a uma forma de radiação eletromagnética e é constituída por campos oscilantes (elétrico e magnético) que variam com o tempo (36).

As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por sua amplitude (altura da onda em relação a uma linha central) e seu comprimento de onda (distância entre dois pontos mínimos consecutivos). Diferentes comprimentos de onda correspondem a diferentes regiões do espectro eletromagnético, além disso, quanto menor esse comprimento maior o número de oscilações completas que chegam a um determinado ponto em relação ao tempo, representando uma alta frequência. Essa relação é inversamente proporcional. Logo, um comprimento de onda menor corresponde a uma radiação de alta frequência, enquanto um comprimento de onda maior representa radiações de baixa frequência (36,37).

Tabela 1 – Divisões das luzes UVC, UVB e UVA por frequência e comprimento de onda. Adaptado de OKUNO; VILELA (2005).

Radiação Eletromagnética		Frequência(PHz)	Comprimento de onda (nm)	
Raios X e Gama		> 3	< 100	
Ultravioleta	UVC	3 - 1,07	100 - 280	
	UVB	1,07 - 0,952	280 - 315	
	UVA	0,952 - 0,75	315 - 400	
Luz Visível		0,75 - 0,428	400	- 700

1.6. Radiometria Versus Fotometria

Espectroradiometria é a técnica utilizada para aferir a distribuição espectral de potência de radiação (DEP) emitida por uma determinada fonte. A medida de energia associada a radiação eletromagnética é denominada radiometria. Ela envolve a medição da energia radiante total (em Watt) emitida pela fonte quando se trata de um único comprimento de onda (λ) ou sobre todo o espectro magnético. O radiômetro é o instrumento utilizado para medir a irradiância ($\Delta P_{\text{total irradiada}}/\text{área}$) ou fluxo de energia radiante que atinge o detector e possui unidade de W/cm^2 . Já a fotometria corresponde à medida da radiação eletromagnética na faixa da luz visível (380-780 nm). Por operar em uma faixa sensível ao olho humano, geralmente seus resultados estão relacionados com as medidas radiométricas associadas à curva de resposta do olho (39,40).

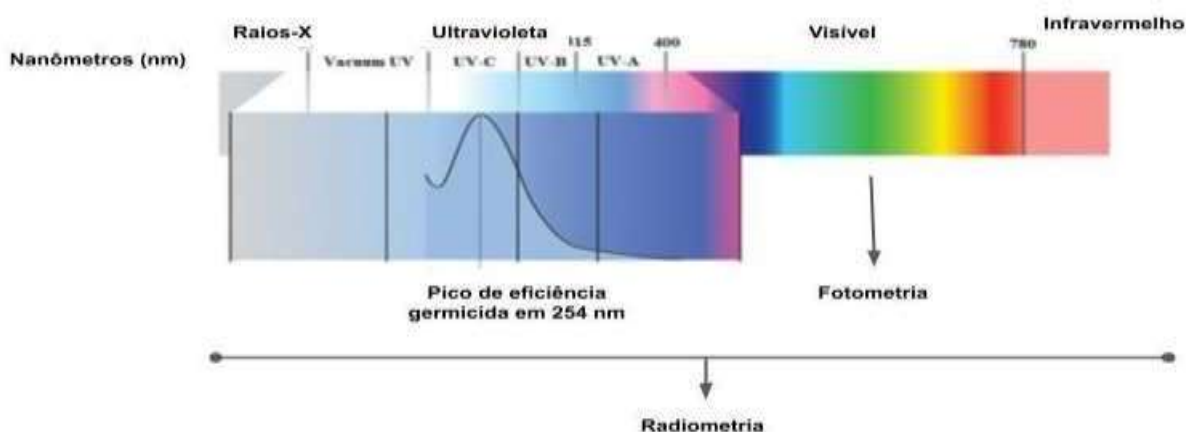


Figura 2. Região luz UV no espectro eletromagnético. **Adaptado de Patras et al. (2020).**

Conhecendo a quantidade de energia irradiada, isto é, a intensidade do feixe UV incidente, é possível calcular a quantidade de energia absorvida e estimar a intensidade germicida da radiação sobre os vírus. Estudos de Bolton e Linden (2003) (42) demonstraram que o valor médio da irradiância representa o comprimento de onda germicida que proporciona a inativação efetiva dos microrganismos. Esse efeito está diretamente relacionado com aspectos fisiológicos particulares desses seres e faz com que o espectro de absorção dos compostos envolvidos desempenhe um papel vital na determinação da irradiância sobre o microrganismo alvo do estudo.

1.7. Luz UVC

A irradiação germicida ultravioleta (UFGI) é definida como o uso de ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de luz na faixa germicida para a desinfecção de ar e superfícies (47, 48). A UV foi classificada e dividida em quatro bandas pelo comprimento de onda: UVA (320- 400 nm), UVB (290-320 nm), UVC (<290 nm) e VUV (100-200 nm).

A exposição a comprimentos de onda ao redor 254 nm altera a composição dos ácidos nucleicos de vírus e bactérias. Quando aplicado a esses patógenos, eles têm a capacidade de fragmentar ligações do DNA ou RNA, então a informação genética se quebra e perde a função de replicação (49).

As fontes de luz UVC mais comuns, têm sido as lâmpadas de descarga de mercúrio, especialmente as lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa pressão, com um forte pico de emissão a 254 nm, que está próximo do máximo de absorção de

RNA, em cerca de 260 nm. Embora seja conhecido que este tipo de radiação UVC tem um efeito inativador em todos os microrganismos e vírus, diferentes patógenos requerem diferentes doses de irradiação UVC para uma inativação bem-sucedida (50).

Tecnicamente, os vírus são moléculas, e por isso é comum referir-se aos vírus como sendo inativados em vez de mortos. Em todos os casos, a ação germicida significa desinfecção que implica na redução da população microbiana, seja no ar, na água ou em superfícies. Bolton e Cotton (51), Kowalski (53), Chevretils e Caron (52) relatam que para a diminuição do Log do rotavírus requer cerca de 25 mJ / cm² de radiação UVC de 254 nm de uma lâmpada de descarga de mercúrio, enquanto para adenovírus (Tipo 40), o valor é aproximadamente 6 vezes maior (140 mJ / cm²).

Nenhuma outra tecnologia atual tem a capacidade, a adaptabilidade e a economia favorável para torná-la viável para uma variedade extremamente ampla de aplicações, contribuindo de forma importante para a erradicação de muitas doenças contagiosas. A contribuição da tecnologia UVC para o controle de epidemias é passível de análise por modelos estatísticos de epidemiologia, que têm demonstrado o potencial de disseminação para, teoricamente, interromper epidemias de doenças contagiosas transmitidas pelo ar (54).

1.8. Desinfecção de salas através da luz UVC

Primeiramente, é necessário ressaltar a diferença entre os processos de descontaminação e esterilização. Descontaminação é um termo relacionado a eliminação parcial ou total de microrganismos, todavia um processo de descontaminação não implica necessariamente, que o material está seguro para sua utilização no paciente. Desinfecção e antisepsia são formas de descontaminação do ambiente (43).

A desinfecção é o processo que elimina todos os microrganismos ou objetos inanimados que são patológicos, com exceção dos endosporos bacterianos. A esterilização consiste na eliminação ou destruição total de qualquer forma de vida microbiana presente naquele material ou local. Assim, a desinfecção não deve ser confundida com a esterilização, tendo em vista que a primeira pode não eliminar totalmente todas as formas de vida microbiana. Por definição, os dois procedimentos diferem quanto à capacidade para eliminação dos esporos, propriedade inerente à

esterilização (44).

A contaminação cruzada entre pacientes é uma preocupação relevante em hospitais e salas de exames. A desinfecção total do ambiente deve ser eficaz, porém rápida para que não interfira no cronograma diário dos exames dos pacientes. O vírus SARS-CoV-2, alvo de estudo deste trabalho, tem alta transmissão e nota-se assim a importância de locais devidamente desinfetados para abrigar novos pacientes. É recomendado que as salas tenham ar condicionado próprio, que não sejam do modelo *split*, cujo princípio de funcionamento é o turbilhonamento do ar, o que consequentemente deixa o vírus mais tempo no ar. Além disso, novas metodologias de desinfecção do ambiente e do ar, devem ser implementadas, visando evitar que o ambiente fique propenso a novas contaminações (45).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrou preocupação com a desinfecção de locais suscetíveis a infecção pelo vírus durante a pandemia. Além do problema da escassez de EPI's, é fato que alguns ambientes inevitavelmente recebem um grande fluxo de pessoas e existe uma grande dificuldade de desinfecção contínua do ar circulante. Nesse contexto, estudos com luz UVC tem se intensificado nos últimos anos para que esse processo de desinfecção se torne mais simples e barato, garantindo assim a integridade dos profissionais de saúde e pacientes (46).

1.9. Efeito do UVC no microrganismo

Os agentes biocidas associados ao mecanismo de inativação podem ser de caráter físico (calor, radiação UV, fotodinâmico/fotocatalítico, radiação ionizante, alta pressão) ou químico (álcoois, agentes oxidantes, alterações de pH, inativantes químicos de uso geral) (26). Estudos de Kowalski e colaboradores (53) demonstraram que a sensibilidade apresentada pelos vírus quando expostos especialmente à radiação UV é determinada por uma série de fatores intrínsecos. Estes incluem o tamanho e composição do genoma, massa molecular, presença de cromóforos, índice de refração relativo, existência de enzimas e mecanismos de reparo, entre outros aspectos.

O fato das bases nitrogenadas presentes nas fitas de DNA e RNA apresentarem alta interação com a luz UVC, faz com estas se tornem altamente sensíveis à ação dessa radiação. Especialmente as bases pirimidínicas (timina, citosina e uracila) são as que mais apresentam danos após a exposição. Para vírus de RNA, o principal mecanismo de inativação é que a radiação UV absorvida pelo RNA leva à formação de dímeros de pirimidina como citosina (C) e uracila (U). A figura 3 (52) mostra um exemplo de dímeros de uracila (55, 56).

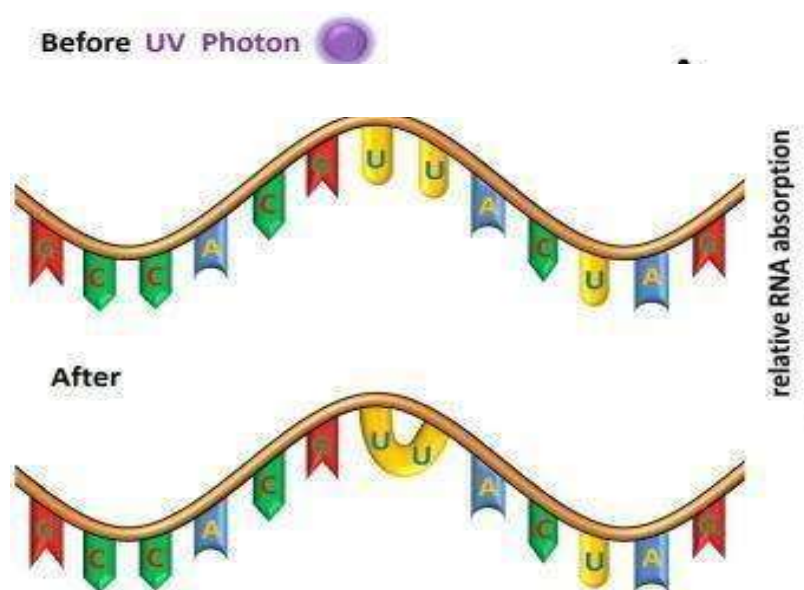


Figura 3. Ilustração do mecanismo de dano de UV-RNA por formação de dímero de uracila. Hebling et al, 2020.

Essas alterações podem também impactar a função dos RNAs mensageiros (mRNA) e outros não codificadores, interferindo assim nos processos de transcrição, tradução e pode alterar as propriedades químicas dos nucleotídeos associados ao RNA ribossomal, afetando também os processos catalíticos no ribossomo. Estudos relataram que esses danos podem ocorrer tanto *in vitro* quando em *in vivo* (sob condições fisiológicas) e especialmente o RNA de fita simples tem maior probabilidade de formar foto-produtos do que o RNA de fita dupla (54-57).

Nem sempre é fácil ou possível elucidar os mecanismos específicos de inativação viral. Mesmo com os esforços feitos pelos pesquisadores, analisando os danos detectados nos microrganismos e propondo os mecanismos possíveis, muitas vezes as modificações observadas podem ser casuais ou associadas à perda natural de funções e não necessariamente induzidas pela luz UV (57). Nesse contexto, o que se tem são aproximações e modelos, essencialmente matemáticos e percentuais, que se aproximam do comportamento real do processo de inativação.

Certa resistência à luz UVC monocromática pode ser apresentada por vírus de DNA, do tipo adenovírus (AdVH), baseada no fato de que a exposição à radiação danifica principalmente o DNA, enquanto as proteínas permanecem intactas. A infectividade e capacidade de replicação dos adenovírus não é comprometida, isto porque não dependem que o DNA esteja intacto (58).

Além do mais, é importante ressaltar que fatores externos como umidade, superfícies texturizadas e presença de poeira podem reduzir a eficácia de UV-C e influenciar a dose necessária para atingir a inativação viral completa (59).

1.10. Desvantagens da UVC

Algumas desvantagens da utilização da radiação UVC é que em alguns casos é necessária uma alta dosagem para inativar os microrganismos e estes, por sua vez, podem reverter os efeitos destrutivos da radiação UVC na presença de luz por um processo chamado “photo reactivation” ou “dark repair” na ausência de luz. Outras desvantagens são a necessidade de manutenção preventiva da luz emitida pela lâmpada do equipamento e a atenção em relação à passagem da luz para não haver obstrução da mesma, tornando assim a desinfecção ineficaz (60).

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia de COVID-19 mostrou o quão danoso e fatal os vírus podem ser para os seres humanos. No auge da pandemia, hospitais e clínicas médicas foram as principais áreas de preocupação para transmissão devido ao grande fluxo de pessoas, colocando em risco tanto os médicos e funcionários quanto os pacientes.

Para evitar ou diminuir as chances de uma contaminação cruzada, uma desinfecção do ambiente deve ser eficaz além de atender o tempo exigido pelo hospital, para que não interfira no cronograma diário dos exames. Os testes realizados foram feitos para avaliar a eficácia de um equipamento de UVC que opera em uma sala de tomografia com elevado fluxo de pacientes. Apesar do foco do trabalho ter sido em hospitais, o aparelho emissor de UVC tem grande potencial de oferecer uma desinfecção segura em diversos lugares como: escolas, empresas, casas, shoppings e demais ambiente fechadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar a eficácia de um dispositivo de descontaminação por raio Ultravioleta C (UVC) em uma sala para exames de imagem.

3.2. Objetivos Específicos

- Levantar pontos críticos de maior contaminação dentro da sala de tomografia.
- Mapear a intensidade de cada ponto crítico.
- Expor amostras virais para confirmar a intensidade.
- Teste *in vitro* para validar o experimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar o experimento, foram feitos dois testes baseados nas metodologias de Lindblad et al. (2020) (61) e Katelyn et al. (2020) (62), utilizando uma sala de exame de imagem em uma clínica para imagem (DIAGMED) onde se atente em média 6 pacientes por hora, totalizando 260 pacientes por semana. Para ambos os testes foi estabelecido três pontos estratégicos focados em maior contaminação humana e exposição ao SARS-CoV-2.

Foram determinados diferentes pontos para realizar os testes e verificar a eficácia da ação da luz ultravioleta, a saber: P1, P2, P3 e P4. Esses foram escolhidos conforme indicação do responsável pela sala, que apontou os pontos de maior frequência de contato.

O ponto P1 foi determinado como a maca onde o paciente se deita para o exame, por ser uma superfície que está sempre em contato direto com as pessoas, se torna um ponto crítico para contaminação cruzada. O ponto P2 foi determinado como o painel de controle da máquina, onde existe constante manipulações entre os enfermeiros, para a realização do exame. O ponto P3 foi escolhido o armário onde se guarda materiais utilizados para o exame, uma vez que tem manipulação entre enfermeiros para enfermeiros e enfermeiro para paciente, o que torna um ponto importante de contaminação de uma pessoa para outra.

Abaixo, nas **Figuras: 4 e 6**, apresenta-se uma visão geral da sala. As **Figuras 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14** ilustram os pontos testados.

Equipamento de UVC: Para a emissão da UVC foi utilizada uma torre de UVC (**Figura 7**) com uma dimensão de altura equivalente a 180 cm e base quadrada de 50 cm x 50 cm e potência total de 1800 W. O equipamento de UVC ficou localizada no ponto P4 (**Figura 6**) dentro da sala, visando o alcance direto dos raios nos pontos pré-determinados.



Figura 4. Visão geral da sala de exame de imagem. **Arquivo pessoal**

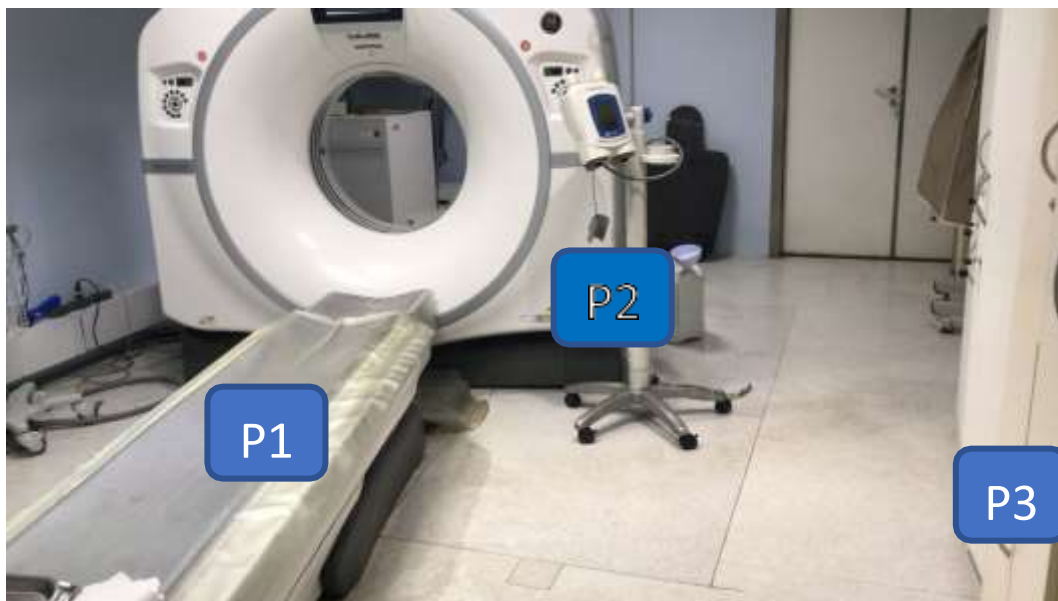


Figura 5. Sala de exame de imagem demarcando os pontos pré-determinados, sendo Ponto 1 (P1): maca para exame; Ponto 2 (P2): painel de controle; Ponto 3 (P3): armário de materiais. **Arquivo pessoal.**



Figura 6. Visão geral da sala de exame de imagem. **Arquivo pessoal**

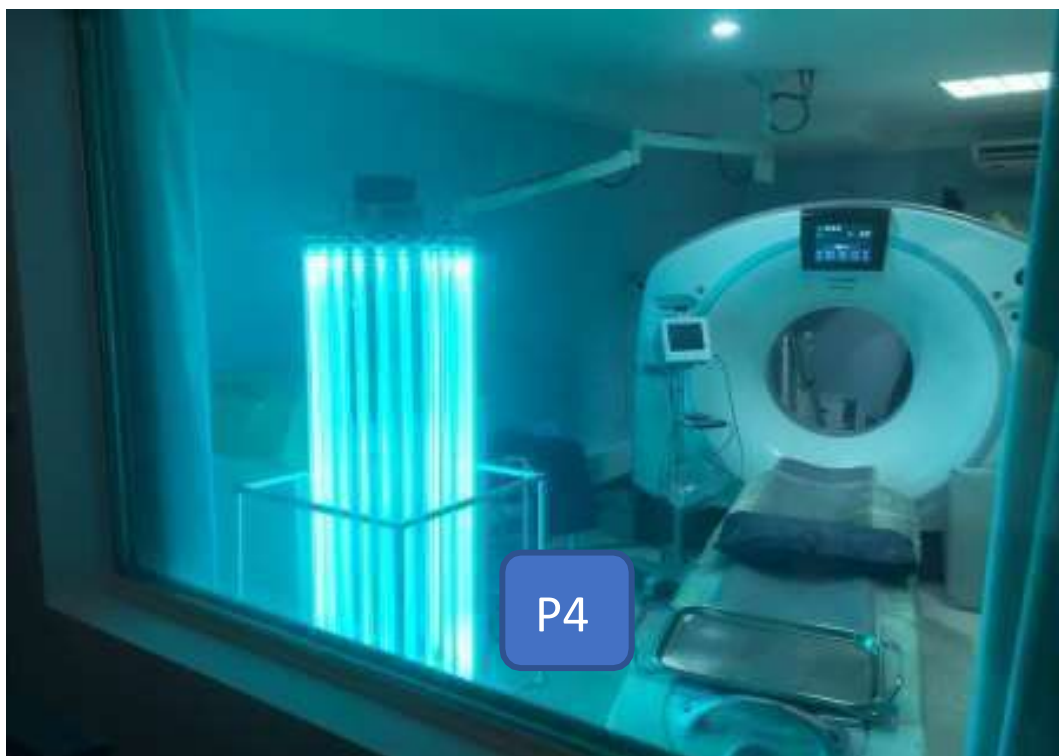


Figura 7. Torre de UVC ligada dentro da sala de exames. Ponto 4 (P4), local onde o equipamento de UVC foi fixada. **Arquivo pessoal.**

Para se ter um parâmetro médio sobre a dose irradiada em cada ponto, foi utilizado um radiômetro X1-1-UV-3726 da Gigahertz Optik GmbH, com certificado de calibração pelo fabricante (Figura 7) por um tempo pré-determinado de 1min e 30s, efetuando 10 medições nos 3 pontos determinados.



Figura 8. Radiômetro X1-1-UV-3726. Gigahertz Optik



Figura 9. Radiômetro localizado em P1. Arquivo pessoal.



Figura 10. Radiômetro localizado em P2. Arquivo pessoal.



Figura 11. Radiômetro localizado em P3. Arquivo pessoal. **Arquivo pessoal.**

4.1. Teste Virucida

Este estudo foi conduzido utilizando a metodologia descrita em "BS EN 14476:2013+A2:2019 Incorporating corrigendum August 2019: Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1), com adaptações pertinentes. Os ensaios foram realizados Laboratório de virologia e Biotecnologia Aplicada, NB-2 (Biosafety Level 2), Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas- SP- Brasil.

4.1.1. Vírus e Célula Utilizadas:

Vírus e procedência	Linhagem Celular
Coronavírus MHV-3 Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp; GenBank (MW620427), (73)	L-929: NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

4.1.2. Multiplicação viral

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² utilizando uma concentração inicial de 1.5×10^5 células/mL em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco® livre de antibióticos e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a propagação viral, as amostras foram inoculadas nas garrafas de cultivo celular e quando a monocamada apresentar 70% de efeito citopatogênico (CPE) irá proceder-se a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares. Vírus com $10^{8.0}$ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) foram estocadas a -80°C para uso posterior.

4.1.3. Titulação viral

Amostra de Coronavírus MHV-3 foi diluída em DMEM, titulada na base 10 (10^1 a 10^{10}) e inoculada em quadruplicata em microplacas 96 orifícios de cultivo celular com volume de 100 µL/orifício. Em seguida foram adicionados 100 µL de célula na concentração de 1.5×10^5 células/mL células/orifício às placas que foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por até quatro dias, A leitura das placas foi feita em busca do efeito citopático (ECP) característico para

cada vírus às respectivas células, utilizando o microscópio de luz invertida (ZEISS®). O título viral foi definido em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT50) e foi calculado pelo método de Spearman & Karber (75).

Fórmula Spearman & Kaerper:

$$\log_{10} 50\% \text{ end point dilution} = - (x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i)$$

x_0 = $\log_{10}$ of the reciprocal of the highest dilution (lowest concentration) at which all cells/CPE*

are positive;

d = $\log_{10}$ of the dilution factor;

n_i = number of cell used in each individual dilution (after discounting accidental deaths);

r_i = number of positive CPE/cell (out of n_i).

* CPE: Cytopathic effect (ECP: Efeito citopático provocado pelo vírus nas células)

4.1.4. Determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT)

Para a determinação das concentrações/diluições a serem utilizadas nos testes virucidas foi necessário determinar a **concentração máxima que não causa toxicidade** para as células. Definir a concentração ideal para realizar a atividade antiviral/virucida, na diluição ideal para realizar o ensaio virucida.

As células foram cultivadas em microplacas de 96 orifícios e após a sua aderência foi adicionado 100 μ L substância teste diluída em água dura em diferentes diluições (10^1 a 10^{10}), incubadas por 48 horas e o resultado é lido através de microscópio invertido.

4.1.5. Cálculo e verificação da atividade virucida

A atividade virucida do teste foi avaliada calculando a diminuição do título em comparação com a titulação de controle sem aplicação de UVC. A diferença é dada como fator de redução (FR). Onde: **FR= TV-TT** (TV: Título de vírus do controle/não tratado e TT: Título de vírus do teste tratado).

De acordo com a EN 144476: 2019, a eficácia de inativação de vírus no título é reduzida em pelo menos quatro $\log_{10}$, dentro do período de exposição recomendado. Isso corresponde a uma inativação de $\geq 99,99\%$.

4.1.6. Preparo das células:

Para os estudos virucidas foram distribuídas 100µL de célula (L929) nas microplacas de 96 orifícios com uma concentração de 1.5×10^5 células/mL células/orifício diluída em meio de cultura (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino. As microplacas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 24 hs para que ocorra aderência das células às placas.

4.2. Execução dos procedimentos:

Já com a dose média mínima calculada, foi realizado o teste com exposição do vírus da Hepatite Murina cepa 3 (MHV-3), com titulação 10^8 TCID₅₀/ml (61). Em cada ponto foram realizadas 5 exposições de 1 min e 30 segundos, onde foi alocado em cada ponto uma placa de Petri contendo filtro estéril embebido com 2 ml de vírus. Após cada teste realizado, a placa de Petri foi devidamente vedada, identificada e congelada a -80°C. O tempo mínimo de exposição foi baseado em Katelyn et al. (2020), onde foi proposto 1 min e 30 segundos para uma inativação segura sem que atrapalhasse o fluxo de um exame para outro.



Figura 12. Exposição do vírus localizado em P1. **Arquivo pessoal.**



Figura 13. Exposição do vírus localizado em P2. **Arquivo pessoal.**



Figura 14. Exposição do vírus localizado em P2. **Arquivo pessoal.**

4.2.1. Teste *in vitro*

Para início desta parte do experimento, foi mantida a linhagem celular de fibroblastos de camundongo (L-929) em meio essencial mínimo Eagle (MEM, Nutricel®) +10% de soro fetal bovino (SFB). Após 48h de permanência em garrafa média com filtro em uma estufa com nível de CO₂ e 37°C, foi realizada uma tripsinização para a contagem de células em um contador de células automático (Olympus). Em seguida, a suspensão celular (3×10^5 células/ml) foi transferida para as microplacas 96 poços e mantidas 24h em uma estufa com nível de CO₂ à 5% (**Figura 15**).

A suspensão de MHV-3 submetida a radiação UVC no hospital foi descongelada e adicionada as placas de diluição (em quadruplicata), onde foram realizadas diluições seriadas na base 10. O mesmo processo foi realizado com o controle de vírus, para comparação do título viral e uma coluna da placa foi reservada para controle de células. As diferentes diluições do vírus foram então transferidas para as microplacas de 96 poços contendo células que foram preparadas 24h antes (100 µL de suspensão viral em cada poço contendo células). Após ter colocado todas as amostras em contato com as células, as microplacas de 96 poços retornaram para a estufa de CO₂.

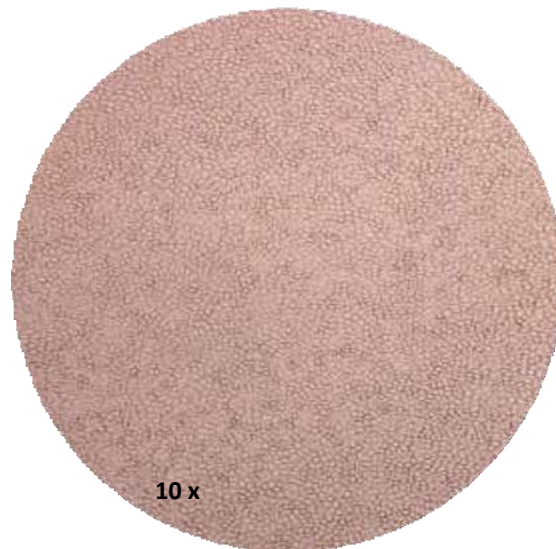


Figura 15. Célula L929 após 48h em estufa com nível de CO₂ à 5%, em escala 10x. Arquivo pessoal.

4.2.2. Leitura microscópica

Para a leitura em microscópio invertido, as microplacas ficaram incubadas por um período de 24h (primeira leitura) e 48h (segunda leitura). Por meio da visualização do efeito citopático (**Figura 16**), o título viral final foi calculado, sendo equivalente a diferença do título do vírus controle (que não foi submetido a radiação) e do vírus exposto a UVC. Dessa forma, foi determinada a atividade da radiação em cada amostra e foram calculadas as porcentagens de inibição (PI%).

PI% foi calculada pela fórmula: $PI = (1-T/C) \times 100$.

Onde T corresponde ao antilog do título viral do vírus submetido a radiação e C é o antilog do título viral controle. Foi considerado positivo o efeito da radiação por UVC que geraram uma PI igual ou maior que 98%.

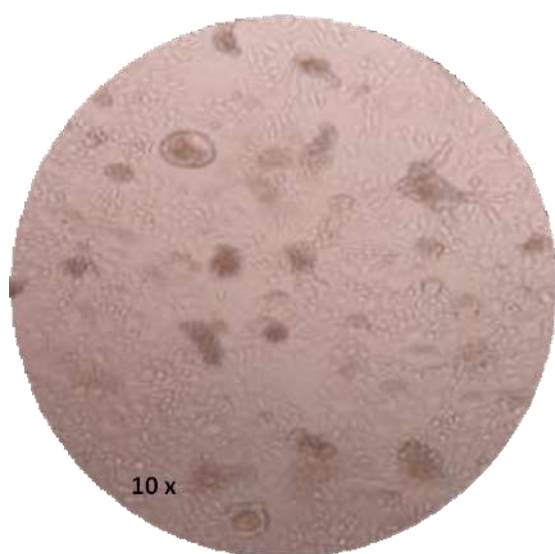


Figura 16. Efeito citopático (ECP) causado pelo vírus MHV-3 em célula L929 após 48h de contato, em escala de 10x. **Arquivo pessoal.**

Após o cálculo do título viral, a redução da infecciosidade do vírus é determinada a partir de diferenças de títulos de vírus log antes e depois do tratamento com o Equipamento com luz UV-C. Os resultados são expressos em percentual inativação viral (**Tabela 3**) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

REDUÇÃO DO LOG	FATOR DE REDUÇÃO	PORCENTAGEM DE INATIVAÇÃO
1	10	90%
2	100	99%
3	1.000	99,9%
VIRUCIDA		
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%
6	1000.000	99,9999%

Tabela 3: Resultados em porcentagem de inativação viral em comparação com o controle de vírus. **Adaptado de Microchem Laboratory** (64).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados das medições

O **Quadro 1** representa as 10 medições realizadas em cada um dos 3 pontos pré-determinados, considerando uma dose média mínima efetiva de 22 mJ/cm² (61), a **Tabela 2** representa as análises estatísticas das medições. O **Gráfico 1** aponta que o intervalo de confiança calculado (IP) foi igual a 95%.

Quadro 1. Medições em mJ/cm² de P1, P2 e P3.

P1	P2	P3
23.557	38.624	35.813
23.813	38.786	35.835
23.786	38.415	35.681
23.366	38.445	35.932
23.455	38.628	35.759
23.484	38.535	35.940
22.986	38.226	35.184
23.430	37.627	35.965
23.551	38.484	35.859
23.506	38.090	35.995

Tabela 2. Médias e intervalos de confiança (ic) igual a 95% para o valor medido em cada posição. Utilizado software PAST.

P1		P2		P3	
IC	Média	IC	Média	IC	Média
23,656	23,493	38,623	38,386	35,964	35,796
23,330		38,149		35,629	

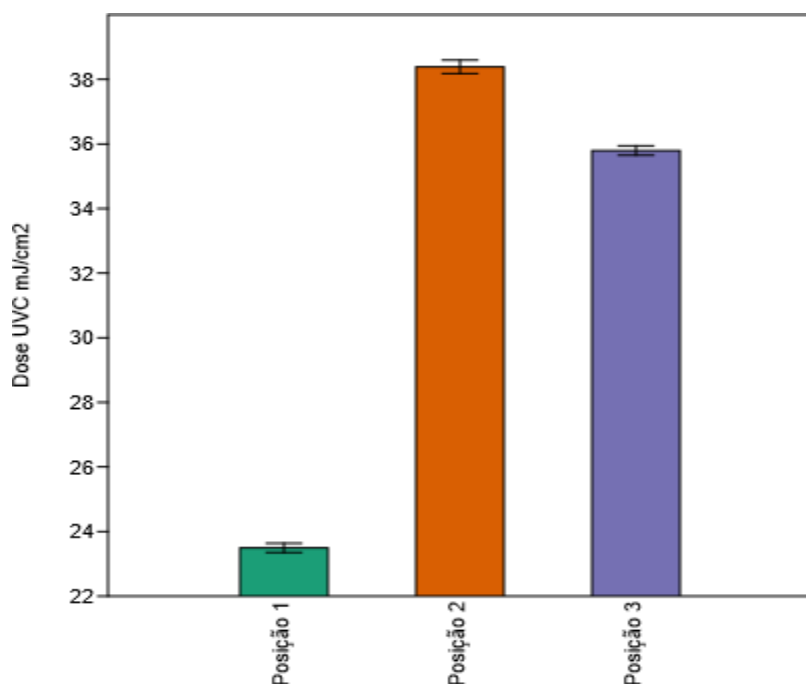


Gráfico 1. Dose média de P1, P2 e P3 mostrando o intervalo de confiança de 95%.

5.2. Resultados testes *in vitro*

Os **Quadros 2, 3, 4, 5, 6 e 7**, mostram os resultados obtidos após as leituras de 48h no microscópio, onde o sinal (+) corresponde a positivo para efeito citopático viral e o sinal (-) como negativo para efeito citopático viral. Foi analisado a ausência do efeito citopático para um resultado onde o vírus foi inativado. As tabelas mostram uma redução viral do P1 sendo efetivo em 10^4 , P2 efetivo em 10^4 e P3 efetivo em 10^3 tendo assim, P1 e P2 uma redução de 4 LOG e P3 uma redução de 5 LOG, nos dando resultado de P1 e P2 uma eficácia de 99,99% na descontaminação e P3 com o resultado de 99,999% de eficácia, como nos mostra a **Tabela 3**.

5.2. Discussão

No presente trabalho, como mostrado na metodologia, foram feitos dois testes de inativação do vírus MHV-3, com a intenção de verificar a eficiência da utilização de uma luz UVC para a descontaminação de superfícies de uma sala de imagem. De acordo com os resultados obtidos, nota-se que a eficácia foi bastante satisfatória, ocorrendo a desinfecção dos locais apresentados na **Figura 4**.

As infecções virais, no caso o SARS-CoV-2, tem aberto discussões sobre como realizar sua inativação, sendo o método de irradiação ultravioleta (UV) muito estudado no atual momento, principalmente pelo alta contaminação que esse vírus tem causado

BIBLIOGRAFIA

O local utilizado para os experimentos é de alta circulação de pessoas e consequentemente o risco de contaminação por SARS-COV-2 é grande, pois muitas vezes uma desinfecção comum não consegue eliminar satisfatoriamente o vírus. Sendo assim, a eficiência e praticidade da desinfecção pela luz UVC torna-se mais viável.

Nota-se que é possível analisar o tempo de decaimento viral, o qual deve diminuir conforme aumenta o tempo de exposição a luz UV, porém é importante ressaltar que existem alguns fatores que podem alterar esses valores de decaimento viral, como a temperatura, umidade e gotículas molhadas (60).

Para Alexandre, Faria, Cardoso et al. (65), quanto maior for o tempo de exposição, maior é o efeito de inibição do vírus, consequentemente quando se trata da distância da superfície a ser irradiada, ela deve ser a mínima possível para aumentar o efeito germicida das fontes emissoras de radiação. No estudo de da Silva et al. (66), quando o tempo foi superior a 30 segundos houve uma redução total da carga microbiana.

Em relação a dose média mínima efetiva, de acordo com Lindblad et al. (61), corresponde a um valor de 22 mJ/cm², o que revela que os três pontos analisados na sala sofreram uma irradiação efetiva para a inativação do vírus, destacando-se o ponto P2 (painel de controle) com maior inativação do vírus a partir da irradiação de ultravioleta.

Ainda analisando as doses médias, segundo Boyce et al. (67), doses médias entre 3,395 µWs/cm² e 8,880 µWs/cm² em ciclos de 5 a 15 minutos são eficazes.

Nota-se que as doses utilizadas em outros estudos são maiores, assim como os tempos dos ciclos, sendo assim é possível constatar, a partir do estudo aqui realizado

que a dose média de 22 mJ/cm² em 1min e 30 segundos também foi eficiente.

Outro fator a ser destacado é o comprimento de onda utilizado, 254nm, segundo Sesti-Costa et al. (68), há um intervalo entre 260-270nm que é muito eficaz para a quebra do ácido nucleico do patógeno, resultando em sua inativação. Nota-se que esse vírus é transmitido via perdigotos respiratórios, sendo assim, os componentes desses fluídos tendem a absorver um UV-C mais curto, logo, uma irradiação maior ou um tempo prolongado são essenciais para que sua inativação seja correta. Como demonstrado por Sesti-Costa et al. (68) irradiações de 222nm levam cerca de 25 minutos para uma inativação de 99%, enquanto 254nm levam cerca de 6 minutos para uma inativação de 99%, comprovando uma melhor eficácia da radiação utilizada neste presente trabalho.

Outro fato que influencia nas diferenças de radiação das superfícies se deve ao material de cada objeto, superfícies lisas e reflexivas tendem a ter menos luz absorvida se comparadas com superfícies rugosas e ásperas, onde paredes pintadas com luz reflexiva ao UV podem auxiliar na descontaminação desses ambientes (65,67).

Nota-se que para ter segurança da eficácia, foi utilizado o método *in vitro* com o coronavírus da Hepatite Murina (MHV), pois é um vírus do mesmo gênero do SARS-CoV-2, sendo assim têm-se os resultados apresentados nos quadros 2 a 7.

Observa-se que houve 99,99% de eficácia na utilização da luz UVC para a inativação do vírus, de acordo com a figura 18, apresentada anteriormente, lembrando que esse valor pode ser afetado por inúmeros fatores.

Portanto é notável a eficácia do decaimento viral e consequentemente a desinfecção de locais através da utilização da luz UV-C, logo o risco de contaminação pelo vírus diminui consideravelmente, desde que o dispositivo seja realocado de lugar e aplicado de formas diferentes para que todas as áreas e locais entrem em contato com a radiação (67).

Em situações *in vitro* o SARS-CoV-2 pode ser inativado 99% em segundos, quando em contato com a radiação UVC, o que comprova os resultados obtidos para o MHV-3, devido a igualdade de gênero dos dois vírus (69,70).

Os resultados para o presente estudo podem ser resumidamente analisados no fluxograma abaixo.

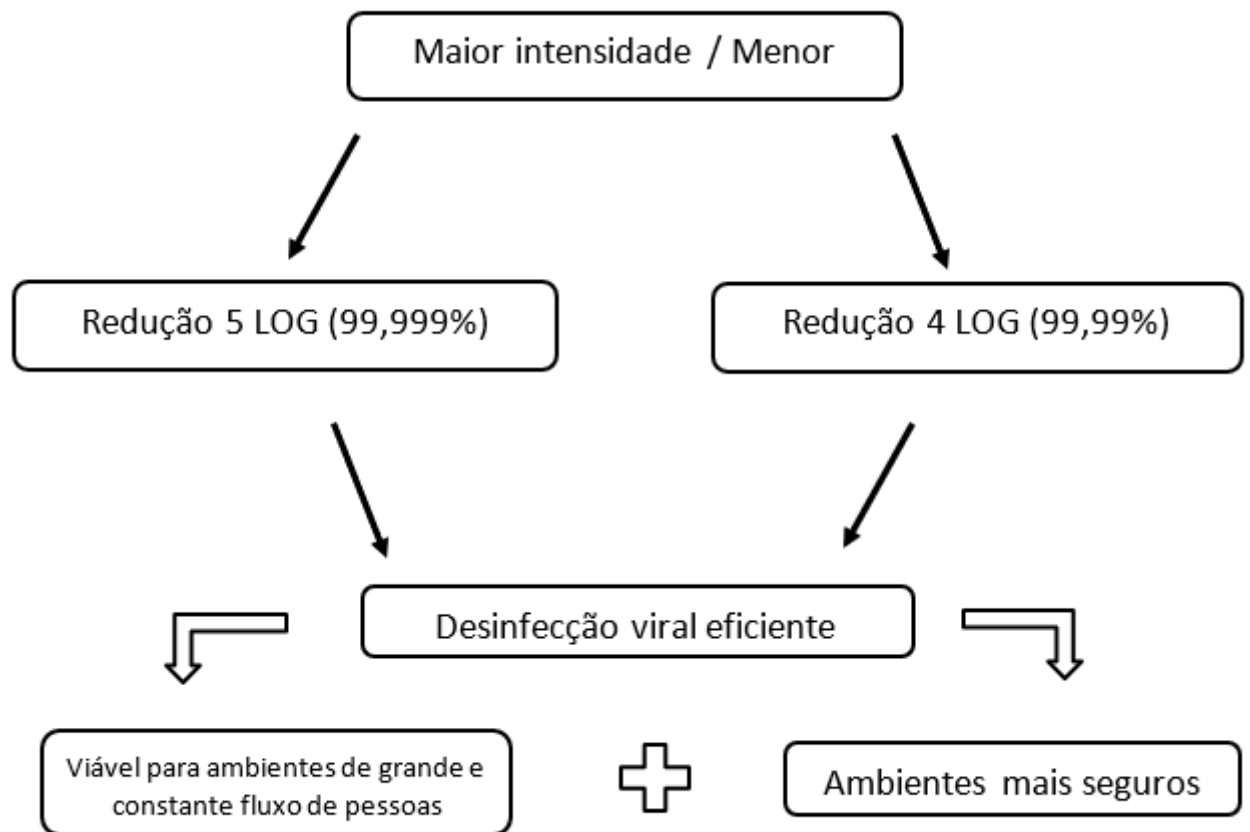


Figura 17. Fluxograma dos resultados obtidos no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a utilização da luz ultravioleta C (UVC) é promissora no combate a transmissão do MHV-3 por fômites e pelo ar, resultado similar pode ser considerado para SARS-CoV-2. A utilização de uma fonte emissora de UVC com alta intensidade demonstrou seu grande potencial de desinfecção ao alcançar rapidamente a dose de radiação eficaz de inativação viral. Após a validação do experimento, obtivemos sucesso com a redução do título viral em todos os pontos analisados. A redução de carga de 99,99% ocorreu nos pontos que atingiram uma menor intensidade de radiação e de 99,999% em pontos com maior intensidade de radiação. Portanto, o dispositivo testado promoveu um ambiente com maior desinfecção e consequentemente mais seguro para o ambiente hospitalar.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A desinfecção por UVC se mostra muito promissora para o combate das transmissões pelo ambiente e pelo ar. O aprofundamento nos estudos em como maximizar os efeitos positivos e minimizar os efeitos negativos são fundamentais para a futura utilização do mecanismo. Com o aperfeiçoamento dessa tecnologia, poderá ser utilizada em escolas, hospitais, shoppings, empresas, casas, materiais, aeroportos, clínicas entre muitos outros.

8. REFERÊNCIAS

- [1] SUN, P. et al., Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: A single arm meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n 6, p. 612-616, jun 2020.
- [2] LI, M-Y. et al., Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide Variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, v 9, p. 45, 2020.
- [3] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 02 Mar 2020; **5**, 536– 544. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>. Acesso: 28 mar. 2021
- [4] KÖRNER, R. W.; MAJJOUTI, M.; ALCAZAR, M. A. A.; MAHABIR, E. Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2. *Viruses*, 12, n. 8, 08 2020.
- [5] SANTOS, N. et. al. *Virologia Humana*. 3ª edição. Editora Guanabara Koogan LTDA, 2015.
- [6] Master PS, Perlman S. *Coronaviridae*. En Knipe DM, Howley PM, editores. *Fieldsvirology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2013.p.825 – 58.
- [7] Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet*. 2003, 362.9393. p.1353-1358. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673603146302?token=F471BA955D22B2EC95C41B2C3FEE560CA4EC3DFC276C637ABA12114139BB52F3CB80D9D023919F3683226F173C8EA73B&originRegion=us-east-1&originCreation=20220815182614>. Acesso em: 28mar. 2021.
- [8] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348: 1953–66.
- [9] Zaki AM, Van Boheemen S, Besterbroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabi *N Engl J Med*. 2012; 367:1814-20
- [10] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infectedwith 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020, 395(10223): 497–506. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159299/>. Acesso em: 05 abril. 2021
- [11] Wang Ls, Wang Yr, Ye Dw, Liu QqA review of the 2019 novel coronavirus

(COVID-19)based on current evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020, 56(3): 106137.

[12] Yang Y, Lu Q-B Liu M-J, Wang Y-X, Zhang A-R, Jalali, N, et al. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China. *Medrxiv*. 2020 Feb 2. doi:10.1101/2020.02.10.20021675.

[13] Hadi J, Dunowska M, Wu S, Brightwell, G. Control measures for SARS-CoV-2: a review on light-based inactivation of single-stranded RNA viruses. *Pathogens*. 2020, 9(9),737.

[14] Mehra MR, Desai SS, Kuy SR, Henry TD, Patel AN. Cardiovascular Disease, Drug Therapy, and Mortality in Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382.25: e102. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2007621>. Acesso em: 11 mar.2021

[15] Salje H, Tran KC, Lefrancq N, Courtejoie N, Bosetti P, Paireau, J, et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science*. 2020. 369(6500), 208-211. Disponível em: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abc3517>. Acesso em: 11 abril, 2021

[16] Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Health*. 2020; 25(3): 278–280. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7169770/>. Acesso em: 27 abril, 2021

[17] Zhang L, Shen FM, Chen F, Lin Z. Origin and Evolution of the 2019 Novel Coronavirus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2020; 71(15), 882–883. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa112>. Acesso em: 27 abril, 2021.

[18] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2): 271–280.e8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/>. Acesso em: 28 abril, 2021.

[19] Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203(2): 631–637. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167720/>. Acesso em: 10 maio, 2021.

[20] Li Y, Zhao R, Zheng S, Chen X, Wang J, Sheng X, et al. Lack of Vertical Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, China. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(6): 1335–1336. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7258467/>. Acesso em: 10 maio, 2021.

[21] Rothan HA, Byrareddy AS. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*. 2020 May. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433.

- [22] Jiang X, Coffee M, Bari A, Wang J, Jiang X. Towards an artificial intelligence framework for data-driven prediction of coronavirus clinical severity, *Computers, Materials & Continua*. 2020; vol. 63, no.1, p.537–551. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Megan-Coffee/publication/340299294_Towards_an_Artificial_Intelligence_Framework_for_Data-Driven_Prediction_of_Coronavirus_Clinical_Severity/links/5f808eb3458515b7cf74993e/Towards-an-Artificial-Intelligence-Framework-for-Data-Driven-Prediction-of-Coronavirus-Clinical-Severity.pdf. Acesso em: 08 julho, 2021
- [23] Lamers MM, Beumer J, Van Der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem T, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*, 2020, 369(6499), 50-54. Disponível em: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abc1669>. Acesso em: 08 julho, 2021.
- [24] Treibel TA, Manisty C, Burton M, McKnight Á, Lambourne J, Augusto JB, et al. COVID-19: PCR screening of asymptomatic health-care workers at London hospital. *The Lancet*, 2020, 395(10237), 1608-1610. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)31100-4/fulltext?utm_campaign=tlcoronavirus20&utm_source=twitter&utm_medium=social](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31100-4/fulltext?utm_campaign=tlcoronavirus20&utm_source=twitter&utm_medium=social). Acesso em: 08 julho, 2021.
- [25] Pedersen S F, Ho Y C. SARS-CoV-2: a storm is raging. *The Journal of clinical investigation*. 2020; 130(5), 2202-2205. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/137647>. Acesso em: 10 julho, 2021.
- [26] Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients, *National Science Review*. 2020, 7(6), 998-1002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041>. Acesso em: 10 julho, 2021.
- [27] Fauci AS, Lane HC, Redfield RR. Covid-19—navigating the uncharted. *New England Journal of Medicine*. 2020, 382(13), 1268-1269. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejme2002387>. Acesso em: 12 julho, 2021.
- [28] AHMED, W; BERTSCH, P. M.; BIBBY, K.; HARAMOTO, E. et al. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ Res*, 191, p. 110092, 12 2020
- [29] Andrade, A. C. S. P. et al. A suitable murine model for studying respiratory coronavirus infection and therapeutic countermeasures in BSL-2 laboratories. 2021.
- [30] Mohamed K, Rodríguez-Román E, Rahmani F, Zhang H, Ivanovska M, Makka S A, et al. Borderless collaboration is needed for COVID-19 - A disease that knows no borders. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2020, 41(10), 1245-1246. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7231663/>. Acesso em: 13 julho, 2021.
- [31] Momtazmanesh S, Ochs H D, Uddin L Q, Perc M, Routes J M, Vieira D N, et

al. All together to fight COVID-19. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2020, 102(6), 1181. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7253116/>. Acesso em: 13 julho, 2021.

[32] Hanaei S, Rezaei N. COVID-19: developing from an outbreak to a pandemic. Archives of medical research, 2020; 51(6), 582-584. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7219390/>. Acesso em: 18 julho, 2021.

[33] Fontana, R. T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. Revista Brasileira de Enfermagem, 59, 703-706. 2006.

[34] POSTER, Dianne L. et al. Innovative approaches to combat healthcare-associated infections using efficacy standards developed through industry and federal collaboration. **Nanoengineering: Fabrication, Properties, Optics, and Devices XV**, v. 10730, p. 138-145, 2018.

[35] Nogueira, P. S. F., Moura, E. R. F., Costa, M. M. F., Monteiro, W. M. S., & Brondi, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. *Rev enferm UERJ*, 17(1), 96-101. 2009

[36] Braga, I. O., Cunha, C. C., Palácio, M. A. V., Brito, S. B. P., & Takenami, I. Pandemia da COVID-19: o maior desafio do século XXI. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 8, n. 2, p. 54-63, 2020.

[37] Wilches-Visbal, J. H., & Castillo-Pedraza, M. C. Luz ultravioleta lejana para inactivar superficies y aerosoles contaminados con SARS-CoV2. *Hacia la Promoción de la Salud*, v.25, n. 2, p. 24-26, 2020.

[38] Hanaei S, Rezaei N. COVID-19: developing from an outbreak to a pandemic. Archives of medical research, 2020; 51(6), 582-584. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7219390/>. Acesso em: 18 julho, 2021.

[39] Costa MF. O que é a luz?. International Commission for Optics [Internet]. 2015 Jun. Disponível em: https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/46926/1/WhatsLight_ICO_BarryMaster_tradu_mfcosta_2015.pdf. Acesso em: 28 mar. 2021

[40] Okuno E, Vilela MAC. Radiação Ultravioleta: características e efeitos. 1ª ed. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005.

[41] Oliveira, DF de. Confiabilidade Metrológica e Validação de Procedimentos Espectroradiométricos para medição de fontes luminosas. 2006. [Dissertação de Mestrado em Metrologia]. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio); 2006. Disponível em: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/9324/9324_4.PDF. Acesso em: 28 mar. 2021

[42] Flores, EF. Virologia Veterinária. Santa Maria: Ed. da UFSM; 2007. Capítulo 1, Estrutura e composição dos vírus; p.22. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1YFYuEgfEWjIGVD4BMTIBldGn7nR1t2Rh/view>. Acesso em: 28 mar. 2021

- [43] Patras A, Bhullar M S, Pendyala B, Crapulli F. Ultraviolet treatment of opaque liquidfoods: from theory to practice. 2021; 182-209. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22941-7.
- [44] Bolton JR, Linden KG. Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of environmental engineering*, 2003, 129(3), 209-215. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/66961436/262Bolton_LindenASCE_QPB2003-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1660594414&Signature=gmJ~16uoURg~MOJBswSw-Gy2SCB6CuXigwltYYPUIJWIG0Lh6pCUbyZTEnl0KOx~qvZl6wgWSYAfg6xZbl1AEUuA FoH3FuN1yH9c6dRPUJQz9xhDzzJO9w~UMqanhuFhQ5WSCeqXRoq1ApM-T95GHadxQsG~mYMf2tk22KRXjAcpGxcyo8r8LSHGkmOvBtHuQI7x8-4lGEefVeNZ4z~oSr~dlQahz2Ol3wWeWPaJjEVTlX1CQgTotoqx9nciDgLoTFr66Ty-i47IP1SzpyP7wGEwl-GFA234oBUsRu~On2xMlc3wIF4LH45lx8bsuirKZB6AhmpuFd4m5Tr2tp1Z3Lw_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 15 agosto, 2021.
- [45] Pereira MS, Rodrigues MAV. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. *Rev. latino-am. enfermagem*. Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 95-105, julho 1998. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/da97/4588b0e93d87bc955eb2388d434a294d37cc.pdf>. Acesso em 30 de Jun de 2022.
- [46] de Meirelles Kalil E, da Costa, A J F.. Desinfecção e esterilização. *Acta Ortop Bras*. 1994, 2(4), 1. Disponível em <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Esterilizacao.pdf>. Acesso em 30 jun de 2022.
- [47] Matte DL, Cacau L, Reis LFF, Assis MC. Recomendações sobre o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) no ambiente hospitalar e prevenção de transmissão cruzada na COVID-19. *Assobrafir Ciência*, 11. 2020, 47-64. doi: 10.47066/2177- 9333.AC20.covid19.005.
- [48] Jureka A S, Williams C G, Basler, C F. Pulsed broad-spectrum UV light effectively inactivates SARS-CoV-2 on multiple surfaces and N95 material. *Viruses*. 2021, 13(3), 460. Disponível em <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/460>. Acesso em: 07 janeiro, 2022.
- [49] Eisberg R, Resnick R. Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. Elsevier. 1979; p.928.
- [50] Kowalski W. Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009.
- [51] Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of radiation research*. 2011; 52(2), 115-125. Disponível em <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8155067>. Acesso em: 10 janeiro, 2022.

- [52] Gerchman Y, Mamane H, Friedman N, Mandelboim M. UV-LED disinfection of Coronavirus: Wavelength effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020; 212, 112044. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134420304942>. Acesso em: 10 janeiro, 2022.
- [53] Bolton JR, Cotton CA. Fundamentals of UV light and photochemistry, p 11–23. Em Bolton JR, Cotton CA (ed), *Ultraviolet disinfection manual*, 1ª ed. 2008, AmericanWater Works Association, Denver, CO.
- [54] Chevretils G, Caron É, Wright H, Sakamoto G, Payment P, Barbeau B, et al. UV doserequired to achieve incremental log inactivation of bacteria, protozoa and viruses. *IUVA News*. 2006, 8(1), 38-45. Disponível em https://www.uvclight.co.uk/media/dosage_for_uvc.pdf. Acesso em: 20 janeiro, 2022.
- [55] Kowalski W. *Ultraviolet germicidal irradiation handbook: UVGI for air and surfacedisinfection*. Springer science & business media. 2010.
- [56] Hebling M, Vatter P. Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation–review and analysis of coronavirus photoinactivation studies. *GMS Hyg. Infect. Control*, 15, 1-8. doi:10.3205/dgkh000343.
- [57] Jagger J. Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology. *Photochem Photobiol*.1968; 7:413. doi: 10.1111/j.1751-1097.1968.tb08029.x
- [58] Budowsky, E. I., Bresler, S. E., Friedman, E. A., & Zheleznova, N. V. Principles ofselective inactivation of viral genome. *Archives of virology*. 1981; 68(3), 239-247. doi: 10.1007/BF01314577.
- [59] Rockey N, Young S, Kohn T, Pecson BM, Wobus C, et al. UV disinfection of humannorovirus: assessing infectivity using a whole-genome PCR-based approach. *Ciência e Tecnologia Ambiental*. 2020 Mar 3. doi: 10.1021/acs.est.9b05747
- [60] Bosshard F, Armand F, Hamelin R, Kohn T. Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Applied and environmental microbiology*. 2013; 79(4), 1325-1332.57. Disponível em <https://journals-asm-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1128/AEM.03457-12>. Acesso em: 25 janeiro, 2022.
- [61] Storm N, McKay L G, Downs S N, Johnson R I, Birru D, de Samber M, et al. Rapid andcomplete inactivation of SARS-CoV-2 by ultraviolet-C irradiation. *Scientific Reports*. 2020; 10(1), 1-5. doi: 10.1038/s41598-020-79600-8.
- [62] Santos, Mickael. *Desenvolvimento de sistemas industriais: desinfecção UVC e robóticaindustrial: estágio na STREAK*. Diss. 2017.
- [63] Lindblad M, Tano E, Lindahl C, Huss F. Ultraviolet-C decontamination of a hospital room: Amount of UV light needed. 2020; *Burns*, 46(4), p. 842-849. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417919300920>. Acesso

em: 01 abril,2022.

[64] Katelyn CJ, Shawn GG, Philip WS, Angela LH, Peter CI, Kendra KS, John JL. Comparison of hospital room surface disinfection using a novel ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) generator. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13:9,690-698, 2020 Jun, doi:10.1080/15459624.2016.1166369.

[65] Roth-Cross JK. Interactions of the murine coronavirus mouse hepatitis virus (MHV) with the type I IFN response [Doctoral dissertation]. United States: University of Pennsylvania; 2008. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/976110380fc770b43a77b17f7fd64597/1?cbl=18750&parentSessionId=7%2BfJzc4GCTiqKYBhgKaNUAKp9qa7lOnX4KHtrTLEewM%3D&pq-origsite=gscholar&accountid=26666>. Acesso em: 12 julho, 2021.

[66] Microchem Laboratory. Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing. Disponível em: <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing/>. Acesso: 25 nov. 2022

[67] Alexandre F A, Faria J D A F, Cardoso C F. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008; 32(5),1524-1530. doi:10.1590/s1413-70542008000500025.

[68] da Silva A C, da Silva E M, Santiago F B, de Lima G P, Milat R S S. Esterilização por luz ultravioleta C (UV-C). 2021. Trabalho final de curso. Graduação em Bacharel em Engenharia Elétrica. São Bernardo do Campo. Disponível em: https://repositorio.fei.edu.br/bitstream/FEI/3324/1/TCC_Monografia_v1.pdf. Acesso em: 11dezembro, 2021.

[69] Boyce, J, Donskey, C. Entendendo a descontaminação da superfície por luz ultravioleta em quartos de hospital: uma cartilha. *Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar*. 2019; 40 (9), 1030-1035. Disponível em <https://doi.org/10.1017/ice.2019.161>. Acesso em: 1 abril, 2022.

[70] Sesti-Costa R, Negrão CVZ, Shimizu, JF, Nagai A, Tavares RSN, Adamoski D, et al. UV 254 nm is more efficient than UV 222 nm in inactivating SARS-CoV-2 present in human saliva. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Jul 14. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103015.

[71] Mahida N, Vaughan N, Boswell T. First UK evaluation of an automated ultraviolet-C room decontamination device (Tru-D™) *Journal of Hospital Infection*. 2013; 84(4), 332–335. Disponível em <https://www.sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0195670113001928>. Acesso em: 10 janeiro, 2022.

[72] Sabino, CP, Sellera, FP, Sales-Medina DF, Machado RRG, Durigon EL, Freitas-JuniorLH, et al. UV-C (254 nm) lethal doses for SARS-CoV-2. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2020 Dec. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101995.

- [73] Garcia, A. B., de Moraes, A. P., Rodrigues, D. M., Gilioli, R., de Oliveira-Filho, E. F., Durães-Carvalho, R., & Arns, C. W. Coding-complete genome sequence of murine hepatitis virus strain 3 from Brazil. *Microbiology Resource Announcements*, v. 10, n. 15, p. e00248-21, 2021.
- [74] Ramakrishnan, Muthannan Andavar. "Determination of 50% endpoint titer using a simple formula." *World journal of virology* 5.2 (2016): 85.