

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BERNARDO DA FONSECA ORCINA

Evaluation of the efficacy of an oral antiseptic containing an iron phthalocyanine derivative in improving the clinical picture, decreasing viral load and length of hospital stay in patients with COVID-19

Avaliação da eficácia de um antisséptico oral contendo derivado de ftalocianina de ferro na melhora do quadro clínico, diminuição da carga viral e tempo de internação em pacientes com a COVID-19

BAURU

2022

BERNARDO DA FONSECA ORCINA

Evaluation of the efficacy of an oral antiseptic containing an iron phthalocyanine derivative in improving the clinical picture, decreasing viral load and length of hospital stay in patients with COVID-19

Avaliação da eficácia de um antisséptico oral contendo derivado de ftalocianina de ferro na melhora do quadro clínico, diminuição da carga viral e tempo de internação em pacientes com a COVID-19

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Versão Corrigida

BAURU

2022

Orcina, Bernardo da Fonseca

Evaluation of the efficacy of an oral antiseptic containing an iron phthalocyanine derivative in improving the clinical picture, decreasing viral load and length of hospital stay in patients with COVID-19/Bernardo da Fonseca Orcina. -- Bauru, 2022.

61 p.: il.; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Nota: A versão original desta dissertação se encontra disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:



Data: 05/09/2022

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 34070620.6.0000.5417
Data: 13/08/2020

ERRATA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação



FOLHA DE APROVAÇÃO


Dissertação apresentada e defendida por
BERNARDO DA FONSECA ORCINA
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 21 de outubro de 2022.





Prof. Dr. **VICTOR TIEGHI NETO**
HCB





Prof. Dr. **MARCELO LUPION POLETI**
IFPR

Prof.^a Dr.^a **FLAVIA SIROTHEAU CORRÊA PONTES**
UFPA

Prof. Dr. **PAULO SERGIO DA SILVA SANTOS**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP

 Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901 | C.P. 73
 <https://posgraduacao.fob.usp.br>
 14 | 3235-8223 / 3226-6097 / 3226-6096
 posgrad@fob.usp.br

 [posgraduacaofobusp](#)
 [@posgradfobusp](#)
 [fobuspoficial](#)
 [@Fobpos](#)

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desta etapa tão fundamental para o meu amadurecimento e crescimento profissional, pessoal e espiritual àqueles que me deram, dão e sempre darão seu amor incondicional: meus pais, meu irmão e meu 'vô dindo'.

AGRADECIMENTOS

Iniciar o mestrado no primeiro semestre de 2020 foi algo desafiador para milhares de pós-graduandos no Brasil, porém mesmo no meio da tempestade pontos de luz podem surgir. Então, inicialmente, gostaria de agradecer aos pacientes sob internação hospitalar que se disponibilizaram, apesar do medo e insegurança quanto ao seu prognóstico, a participarem de uma pesquisa científica envolvendo um produto inédito. Ainda, por mais singelo que seja o consolo elevo o meu pensamento com sentimentos de luz, amor e paz aquelas vítimas da COVID-19 e seus familiares e amigos que sofrem com seus lutos.

De maneira similar a minha dedicatória, sou eternamente grato aos meus pais por me darem tudo o que eu sou. Se hoje tenho algum tipo de sucesso na minha profissão é por que tenho amor pelo o que faço; e só posso exercer a Odontologia com amor, pois eles me ensinaram na prática o que é amar. Com a maturidade dos anos consigo perceber nos pequenos detalhes o quão desafiador é criar um filho e o quanto eles superaram tudo para que eu conseguisse chegar até aqui. Amo vocês demais!

Ao meu irmão que é uma das minhas forças diárias de inspiração, motivação e dedicação. Não sei se por eu ser o irmão mais velho me esforço sempre para me tornar cada vez melhor e que possa servir de exemplo ou, na falta dos meus pais, que eu possa ampará-lo. Involuntariamente ele me motiva muito e espero sempre poder ajuda-lo de alguma forma.

Ao meu grande vô dindo que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e esteve presente em cada uma delas prestando seu valoroso auxílio e motivação para que sempre continue crescendo.

A minha namorada Carolina que é sempre incansável em me apoiar, incentivar, ajudar e fazer críticas construtivas. Desde o começo do nosso relacionamento minha vida deu um “boom” de crescimento; a vida profissional decolou e me tornei um homem mais completo, feliz, tranquilo e seguro de ter alguém tão amiga do meu lado. A ideia de prestar a prova no mestrado da FOB/USP só foi possível pelo seu apoio e por ter topado a mudança para Bauru. Sem palavras para o tanto que significas para mim.

Aos meus tios Zelso e Maria da Graça, pois participaram diretamente da minha formação odontológica e ainda eram “meu hotel” nas viagens a Bauru. Sou eternamente grato a eles.

Aos meus amigos Ricardo e Italo que são eternos apoiadores das minhas escolhas. Em momentos de adversidades e insegurança me motivam com suas falas mostrando-me que existe um caminho para vencer. Na realidade, são mais que amigos, são irmãos concebidos ao longo de diversas encarnações. Vocês são incansáveis e verdadeiros.

Quem me conhece sabe que sempre tive dificuldades de ficar longe de casa e de pessoas especiais. Nesse sentido, a mudança para Bauru só demonstra o quanto eu queria passar por esse tipo de formação e que as amigadas que formei por lá foram fundamentais para a adaptação na cidade e tornaram essa passagem a mais prazerosa o possível. Então, minha gratidão a Verônica que foi minha primeira amiga de Bauru; você é demais Vê, teu brilho próprio nos cativou e nos sentimos muito bem acolhidos por ti que foste uma excelente anfitriã. Ao excelentíssimo e impecável Mailon companheiro de todas as horas, um ombro amigo que assim como eu vêm de fora de Bauru em busca do crescimento e da excelência. A Mariel pela sua energia e jeito ímpar de ser, alegrando e cativando todos ao seu redor; parceira no intra e extramuros da FOB. Aos queridos Silas e Ludimila que se tornaram uma grande referência de amizade em Bauru, com vocês as adversidades se tornaram mais simples, vocês são sensacionais.

Aos queridos funcionários da FOB/USP, Marco, Alexandre, Déia e Ivana. Vocês acolhem como ninguém os alunos da FOB, são parceiros incansáveis. Muito obrigado.

Aos queridos amigos/parceiros de pesquisa e de atuação no HEB: Juliana, Emilene e Lucas. Vocês me acolheram logo na minha chegada a Bauru, tendo que lidar com a adaptação na nova cidade e as inseguranças de fazer pesquisa científica com a COVID-19 em um momento de curva ascendente de casos infectados, internações e óbitos. Vocês tornaram esse período mais leve e prazeroso. Muito obrigado.

Aos diversos amigos formados na FOB: Raquel, Reyna, Brena, Aloízio, Caroline, Matheus, Rose, Daniel e Caique. Vocês tornaram esse período mais brilhante pelos seus convívios, obrigado pela amizade e parceria.

Ao amigo e grande parceiro de pesquisa Fabiano Vieira Vilhena. Ele foi um cara incansável e que corria muito para que os trabalhos acontecessem. Sempre pontual e que foi um parceiro fundamental para o meu período em Bauru. Junto com o professor Paulo fizeram a minha estadia na cidade ser mais viável. Muito grato.

Ao meu querido orientador e amigo, o professor Paulo Sérgio da Silva Santos. Antes do mestrado o professor Paulo “era o cara do livro” que eu utilizava como bíblia durante meu período de residência no HE/UFPel; o fato dele ter feito um convite para estagiar no Hospital Estadual de Bauru (HEB) e conhecer a FOB me causou grande honra e alegria; imagina, posteriormente, ser seu orientado?! Nessa pequena “timeline” observo o quanto ainda tinha que o conhecer, pois ele passou de algo inatingível até um amigo proferindo palavras de consolo e incentivo. Não adiantaria nada ele ser um exímio pesquisador e docente (QUE COM CERTEZA É) se não tivesse essa sensibilidade para ouvir desabafos e dar conselhos como uma espécie de “pai científico” (batizado carinhosamente por seus orientados). Professor, esse período na FOB foi grandioso em boa parte por causa sua. Muito Obrigado.

A conquista do título de mestre do Bernardo, pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo apenas formaliza o quanto esse cara sonhou e almejou sua formação contínua. Ao mesmo tempo isso representa o ápice de uma pirâmide de construção coletiva, pois o gigantesco e imensurável apoio recebido de familiares e amigos, sejam eles ajudas materiais, financeiras ou uma simples conversa informal serviram de combustível para construção desta etapa e demonstra que sem nossos pares não temos uma base sólida para nos superarmos e aprimorarmos. Esse fechamento visa abraçar todas aquelas pessoas que com certeza colaboraram no meu caminho até aqui; são diversos detalhes que fizeram toda a diferença na construção de um degrau fundamental de cada etapa da evolução progressiva.

RESUMO

A seguinte dissertação de mestrado está composta pela seleção de dois artigos científicos oriundos do projeto de pesquisa aprovado para este fim. O primeiro artigo, consta de uma série de 11 pacientes com a COVID-19 confirmada através do exame de RT-PCR e que se encontravam sob internação hospitalar. Os mesmos foram orientados a utilizar um spray oral contendo derivado de ftalocianina, ficando estabelecida a posologia 3 borrifadas em cada região da boca, sendo elas: garganta, língua e mucosa jugal bilateralmente. Ainda, após as borrifadas a solução deveria ser alternada entre bochechos e gargarejos, durante 30 segundos, 5 vezes ao dia (após acordar, depois do café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir). Além disso, amostras salivares foram coletadas antes dos pacientes fazerem uso do produto e 2 e 4 dias após a sua incorporação e, ainda, avaliadas quanto a positividade ou negatividade para o SARS-CoV-2 através do RT-PCR. Como resultados, 48 horas após o uso do produto 5 pacientes já apresentaram RT-PCR negativo para as amostras salivares; já para 96h após o uso do produto 4 deles já tinham recebido alta hospitalar e 4 outros pacientes negativaram suas amostras. No segundo artigo, foi realizado um ensaio clínico randomizado triplo-cego com pacientes, também, COVID-19 positivos diagnosticados através do exame de RT-PCR e que se encontravam sob internação hospitalar. Os grupos formados aleatoriamente utilizaram um enxaguante bucal contendo ou não o mesmo derivado de ftalocianina, sendo orientados a bochechar/gargarejar 5 ml da solução durante 1 minuto nos mesmos 5 momentos já citados. As variáveis analisadas foram tempo de internação hospitalar, evolução clínica, necessidade de transferência para UTI e morte. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as médias de idades, número de comorbidades e duração de sintomas antes da hospitalização. Já para avaliação da necessidade de internação na UTI e mortes o teste exato de Fisher foi utilizado. Os pacientes randomizados formaram o grupo ativo (n=20) e o grupo não-ativo (n=21). Este último apresentou idade média significativamente menor ($p=0,0069$) do que o grupo experimental. Também, o grupo experimental apresentou menor tempo de internação ($p<0,05$) e ausência de necessidade de encaminhamento para UTI ($p<0,05$). Apesar de não ter ocorrido significância estatística o grupo placebo apresentou 3 óbitos, enquanto o grupo ativo nenhuma. Sendo assim, esses resultados demonstram o potencial de coadjuvância terapêutica do enxaguatório bucal contendo derivado de ftalocianina em pacientes com a COVID-19 sob internação hospitalar. Por fim, a utilização dos produtos spray oral e enxaguatório bucal

contendo derivado de ftalocianina não excluem a utilização dos protocolos médicos contra a COVID-19 estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Palavras-chave: Antissépticos bucais. Carga viral. COVID-19.

ABSTRACT

Evaluation of the efficacy of an oral antiseptic containing an iron phthalocyanine derivative in improving the clinical picture, decreasing viral load and length of hospital stay in patients with COVID-19

The following master's thesis is made up of two scientific articles chosen from the approved research project for this purpose. The first article is a series of 11 patients who were admitted to the hospital and had COVID-19 confirmed by RT-PCR. They were told to use an oral spray containing a phthalocyanine derivative, and the posology was three sprays in each region of the mouth: throat, tongue, and jugal mucosa bilaterally. Still, after spraying, alternate between mouth rinses and gargling for 30 seconds, 5 times per day (after waking up, after breakfast, lunch, dinner and before bed). Furthermore, salivary samples were collected before the patients used the product, as well as 2 and 4 days later, and were tested for SARS-CoV-2 positivity or negativity using RT-PCR. As a result, 48 hours after using the product, 5 patients had negative RT-PCR for salivary samples; 96 hours later, 4 of them had already been discharged from the hospital, and 4 other patients had negative samples. In the second article, a triple-blind randomized clinical trial was conducted with patients who were also COVID-19 positive, as determined by RT-PCR, and were hospitalized. The randomly assigned groups used mouthwash that contained or did not contain the same phthalocyanine derivative and were instructed to rinse/gargle 5 ml of the solution for 1 minute during the same 5 moments mentioned above. The variables studied were length of hospital stay, clinical evolution, need for ICU transfer, and death. To compare the means of age, number of comorbidities, and duration of symptoms prior to hospitalization, the non-parametric Mann-Whitney test was used. The Fisher's exact test was used to assess the need for ICU admission and death. The active group (n=20) and the non-active group (n=21) were formed by randomly assigned patients. The latter had a significantly lower mean age than the experimental group ($p=0.0069$). Furthermore, the experimental group had a shorter length of stay ($p<0.05$) and did not require ICU referral ($p<0.05$). Despite the lack of statistical significance, the placebo group had three deaths while the active group had none. Thus, these findings suggest that phthalocyanine derivative-containing mouthwash can be used as a therapeutic adjuvant in patients with COVID-19 who are hospitalized. Finally, the use of phthalocyanine derivative-containing oral spray and mouthwash products does not preclude the use of World Health Organization-established COVID-19 medical protocols (WHO).

Keywords: Mouthwashes. Viral Load. COVID-19.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Indirect immunofluorescence (IIF) <i>assay for the detection of SARS-CoV-2-infected cells</i>	33
Figura 2	CONSORT 2010 Flow Diagram with randomly divided groups AM and NAM.....	34

GRÁFICOS

Gráfico 1	Probability of hospital discharge over time (days) according to each group.....	35
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Case series: Patients data and clinical characteristics.....	27
Tabela 2	Demographic and clinical data of both groups of patients: active mouthwash (AM) and nonactive mouthwash (NAM) groups.....	34
Tabela 3	Duration of hospitalization between groups.....	35
Tabela 4	Need for care in the Intensive Care Unit (ICU) and deaths in the NAM and AM groups.....	35

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

COVID-19	Coronavírus 19
RT - PCR	Reação em Cadeia de Polimerase de Transcrição Reversa
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave-2
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
SPO2	Saturação de Oxigênio Periférico
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
NK	Natural Killer
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
SRAS	Síndrome Respiratória Aguda Severa
SROM	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
PDT	Photodynamic Therapy
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba
Ppm	Parte Por Milhão
HEB	Hospital Estadual de Bauru
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
SAM	S- adenosyl – 1 – methionine
APD	Antiviral Phtalocyanine Derivate
WHO	World Health Organization
APD	Anionic Phtalocyanine Derivative

AM	Active Mouthwash
NAM	Non Active Mouthwash
LOS	Length of Hospital Stay
ICU	Intensive Care Unit
REBEC	Brazilian Registry of Clinical Trials
BSL	Biosafety Level
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
FBS	Fetal Bovine Serum
IIF	Indirect Immunofluorescence
BSA	Bovine Serum Albumin
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
MERS – CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
IgG	Imunoglobulina G
SDS	Standard Deviation
FDA	Food and Drug Administration
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CV	Carga Viral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	ARTIGOS	25
2.1	ARTIGO 1 - Oral antiseptic spray containing phthalocyanine solution reduced saliva SARS-Cov-2 viral load: case series.....	26
2.2	ARTIGO 2 - Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: Randomised trial	29
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNDICES.....	48
	ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus, o SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), surgiu na província de Hubei, na China, e se espalhou rapidamente pelo mundo causando uma pandemia, e levou à adoção de medidas sem precedentes a nível global. Neste sentido, agora a pandemia da COVID-19 é uma zoonose de disseminação mundial, que pode ser praticamente impossível erradicar totalmente este vírus do planeta (1).

Os modos de transmissão do SARS-CoV-2 são transmissões diretas, pessoa a pessoa, através de espirros, tosse, transmissão por inalação de pequenas gotículas e transmissão por contato, como contato com as mucosas nasais, orais e oculares. Portanto, a cavidade oral está diretamente associada ao processo evolutivo do SARS-CoV-2 na inalação de partículas ambientais no ar e nas expectorações, isto porque pode também ser transmitido pela saliva (2,3,4,5).

A partir de uma infecção pelo SARS-CoV-2 a doença pode apresentar-se antagonicamente ou de forma assintomática ou progredir causando o óbito (6). Diante disso, um indivíduo que apresenta a COVID-19 pode apresentar sintomas diversos de acordo com a gravidade da doença, sendo ela: leve, moderada, grave ou crítica. Em uma apresentação leve da doença algumas manifestações clínicas podem ser: febre, tosse, fadiga, falta de ar, dor de garganta, congestão nasal, cefaleia, diarreia, náuseas, vômitos, anosmia e ageusia. Já para os casos moderados, os sintomas em adultos apresentam sinais clínicos de pneumonia como febre, tosse, dispneia e falta de ar, mas não sinais de pneumonia grave, incluindo ainda $SpO_2 \geq 90\%$ em ar ambiente. Com a doença evoluindo para um estágio grave, pneumonia grave, os sinais clínicos da pneumonia estão presentes (febre, tosse, dispneia, falta de ar), assim como frequência respiratória > 30 respirações/minuto, grave dificuldade respiratória, ou $SpO_2 < 90\%$ em ar ambiente. Além disso, em casos críticos, encontra-se a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), onde ocorre o agravamento dos sintomas respiratórios, em exames de imagem (radiografia, tomografia computadorizada ou ultrassom pulmonar) podem ser vistas opacidades bilaterais, colapso lobar ou pulmonar, ou nódulos. Por fim, com uma progressão na piora dos casos podem ocorrer a sepse e até o choque séptico (7,8).

A detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é crucial no controle do surto na comunidade e nos hospitais (9). Os esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos são os tipos de amostras recomendados para as vias aéreas superiores para os testes de diagnóstico do SARS-CoV-2. Entretanto o novo coronavírus foi detectado na saliva dos pacientes. Dessa maneira, a

avaliação da saliva, uma amostra não invasiva, é promissora para diagnóstico, monitoramento e controle de infecção em pacientes com infecção do SARS-CoV-2 (3).

Com base na necessidade de comparar a sensibilidade na detecção de SARS-CoV-2 entre as amostras de swab de nasofaringe e amostras de saliva foi realizado um estudo com 70 pacientes hospitalizados portadores deste vírus. Desta maneira, foi observado maior número do RNA do SARS-CoV-2 nas amostras salivares, assim como, até 10 dias após o diagnóstico do COVID-19 houve uma maior porcentagem destas amostras positivas em relação ao esfregaço nasofaríngeo. Também, falsos negativos ocorreram em 3 amostras nasofaríngeas, enquanto nas salivares ocorreu apenas uma vez (10).

No contexto da pandemia global instalada, a precisão da análise de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) pode promover uma melhora no diagnóstico clínico assim como monitoramento e prognóstico dos pacientes. Ainda, sua sensibilidade analítica fornece dados para detectar e quantificar marcadores de doença em estágios iniciais e sua progressão, proporcionando aos profissionais de saúde meios de estabelecer o tratamento mais oportuno (11).

Além do mais, a detecção de ácido nucléico viral por RT-PCR é considerada o padrão-ouro para diagnóstico etiológico do COVID-19. Porém, sua sensibilidade e confiabilidade são questionadas por alguns pesquisadores tendo em vista os resultados falsos negativos em indivíduos que apresentavam grandes suspeitas de ter a doença, com histórico de exposição ao vírus, assim como resultados positivos em alguns casos recuperados (12,13,14,15).

Entretanto, alguns autores (16) afirmam que o RT-PCR se apresentou sensível e confiável quando comparado com outra metodologia de análise laboratorial, afirmando ainda que amostras de escarros se apresentam como o melhor indicador de replicação viral no corpo humano quando comparado a esfregaços nasais e de garganta.

O entendimento da circulação do ar nas vias respiratórias é necessário para a compreensão das infecções respiratórias. Após o ar entrar no trato respiratório superior, através das narinas, ele passará pela cavidade nasal, seguido de naso e orofaringe. Passando pela laringe ele seguirá através das cordas vocais chegando, finalmente, no trato respiratório inferior que é composto pela traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos, onde ocorrerão as trocas gasosas (17). A orofaringe atua como uma encruzilhada onde o alimento e o ar serão direcionados para esôfago e traqueia, respectivamente. O ecossistema microbiano que mais ocupa a orofaringe, provavelmente, também, desempenha um papel na defesa e resistência do hospedeiro contra eventos perturbadores resultantes de inalação, ingestão, ou medidas higiênicas (18,19). Ainda, o microbioma que habita o trato respiratório, também pode estar envolvido na “instrução” do

sistema imunológico local para diferenciar sinais comensais e invasivos, induzindo simultaneamente a regulação imunológica e prevenindo respostas inflamatórias esmagatórias opressivas contra agentes agressores externos e orientando a maturação imunológica (20,21,22).

Embora a maioria dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com sintomas leves se recupere em uma semana, alguns desenvolvem pneumonia grave na segunda semana, seguido por tempestade de citocinas, Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), falência múltipla de órgãos e coagulação intravascular disseminada (CID) na terceira semana da doença (1).

Nos pacientes com quadro grave da infecção pelo SARS-CoV-2 é observado comumente a linfopenia, com uma redução drástica do número de células T CD4+, células T CD8 +, células B e células natural Killer (NK) 1-4, assim como uma redução de monócitos, eosinófilos e basófilos (23,24). Quando na contagem do hemograma se observa aumento na proporção de neutrófilos para linfócitos, geralmente, indica uma maior gravidade da doença do mesmo jeito que um pior desempenho clínico (24).

Desta maneira, a linfopenia associada à COVID-19 torna-se um importante critério patológico de descoberta e gravidade, que exerce o papel de um biomarcador com um possível alvo de intervenção para minimizar o risco de doença grave. As mudanças nas contagens de linfócitos periféricos e a transição de subgrupos destes pode sugerir possíveis mecanismos na patogênese da infecção por SARS-CoV-2 (1, 23). Isto foi observado em um estudo chinês com 90 pacientes hospitalizados positivos para COVID-19, onde nos primeiros 10-12 dias após o início dos sintomas, os pacientes com porcentagem de linfócitos maior que 20% foram classificados como leves a moderados e se recuperaram rapidamente. Também, pacientes com menos de 20% de linfócitos no momento do diagnóstico da doença foram inicialmente classificados como graves. Já no segundo momento, 17-19 dias após o início dos sintomas, pacientes com mais de 20% de linfócitos são aceitos como estando em recuperação, e pacientes com porcentagem de linfócitos entre 5% e 20% ainda estão em grupo de risco, enquanto os pacientes com menos de 5% estão gravemente enfermos com alta taxa de mortalidade. Tendo em vista estes resultados a porcentagem de linfócitos é sugerida como um biomarcador preditivo de gravidade ou recuperação (25).

Entre tantas funções, os eosinófilos possuem uma indicação de efeitos antivirais (26, 27), pois eles contêm e produzem uma molécula com atividade antiviral que participa na imunidade adaptativa, servindo como células apresentadoras de antígeno como demonstrado com alguns vírus respiratórios *in vitro* e *in vivo*, incluindo os vírus sincicial e o influenza. Além

disso, em conjunto com a linfopenia, a eosinopenia foi observada em 52,9% de pacientes hospitalizados infectados com o SARS-CoV-2 (26). Da mesma forma, a eosinopenia já foi relatada em 3 estudos de acompanhamento, onde foi sugerido que as contagens de eosinófilos abaixo dos níveis normais podem ser um biomarcador viável para o diagnóstico de COVID-19 (1).

Ainda sobre o tema, como demonstrado anteriormente, a preocupação da contaminação pela boca, pode ser evitada com medidas de prevenção, sendo a manutenção da higiene bucal uma importante forma preventiva.

Na última década vem sendo discutido a caracterização do microbioma – a totalidade dos microrganismos que colonizam o corpo humano e seus genomas. Através deles há uma colonização das superfícies do corpo como pele, trato gastrointestinal, vias respiratórias e urogenitais e, com isso, podem estar ligados ao reconhecimento imediato de respostas imunes sem ocorrer uma resposta inflamatória em todo organismo e seus efeitos colaterais. Com isso, há a hipótese de que a detecção pelo microbioma nas superfícies corporais precisa ser controlada garantindo uma relação de simbiose entre o hospedeiro e seus microrganismos comensais e permitindo uma resposta imunológica rápida e esterilizante, evitando a penetração de microrganismos em locais não-colonizados. A partir dessa ideia, a microbiota estaria integrada na fisiologia do corpo humano influenciando o organismo de maneira geral, proporcionando homeostase através de seus efeitos sobre o sistema imunológico inato (28,29,30,31).

Sabendo-se que a cavidade oral está ligada ao processo evolutivo do SARS-CoV-2, ela e a região de nasofaringe podem ser consideradas a transição anatômica entre o ambiente externo e interno dos indivíduos contaminados (2). A cavidade oral pode ser considerada a porta de entrada e o ponto inicial da infecção provocada pelo SARS-CoV-2. Isto porque em sua forma anatômica, semelhante a uma coroa, o SARS-CoV-2 apresenta proteínas que permitem sua adesão a receptores específicos da célula hospedeira (32). O receptor mais comum envolvido nesta relação é a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA-2) que está presente em altas concentrações nos pulmões, células miocárdicas e renais, assim como na mucosa oral, especialmente, na língua e glândulas salivares, sendo esta última identificada como reservatório de vírus (33,34). Sabendo desta interação, o entendimento da cinética da carga viral (CV) e da duração da propagação viral são determinantes para a compreensão da transmissão de vírus respiratórios, como por exemplo, o SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) e o MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus). A partir dessas informações há a mensuração da infectividade da doença, que é um parâmetro crítico

para se pensar estratégias de controle eficazes e modulação da doença. Exemplificando esse conceito, o SARS-CoV-2 atinge o pico da CV no trato respiratório superior na primeira semana após o início dos sintomas e, posteriormente, no trato respiratório inferior. Já o SARS-CoV atingia o pico da CV entre 10 e 14 dias do começo dos sintomas; e o MERS-CoV com seu ápice de CV entre os 7 e 10 dias do início da doença (35).

Com isso, entender que a carga viral tem sido apontada como um importante biomarcador para a gravidade da doença COVID-19, mostrando carga viral média nos casos graves cerca de 60 vezes maior que os casos leves (36) e sendo correlacionada com o risco de intubação e mortalidade hospitalar (37) evidencia o quanto intervenções para diminuição dela, em naso e orofaringe, podem ser efetivas, principalmente, nos estágios iniciais da doença.

O bochecho e gargarejo na boca e/ou a irrigação nasal podem erradicar completamente partículas virais nessas vias respiratórias, podendo impedir a sua transmissão ou reduzir a carga viral a que o indivíduo está exposto (38). Alguns antissépticos bucais como a clorexidina 0,12% (39) e a iodopovidona (40,41), comumente utilizados para gargarejar, podem ser antimicrobianos. O gargarejo com iodopovidona (PVPI) pode ajudar a prevenir e tratar infecções respiratórias nos tratos superiores e inferiores (42).

Com a emergência do novo coronavírus, a eficácia de alguns antissépticos bucais contra o SARS-CoV-2 ainda está desconhecida. Recentemente, um estudo piloto com pacientes com COVID-19, internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), mostrou que o bochecho/gargarejo com peróxido de hidrogênio a 1% não reduziu carga viral na cavidade oral (43). Porém, a atividade do antisséptico bucal contendo PVPI contra novos coronavírus similares, como o da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SRAS) e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (SROM) já foi demonstrada (44,45).

O SARS-CoV-2 é vulnerável à oxidação, sendo recomendável usar um antisséptico bucal contendo agentes oxidantes, para reduzir a carga viral da microbiota oral (5,46). Dentre os ingredientes eficazes aplicados aos antissépticos bucais terapêuticos incluem produtos formadores de oxigênio reativo no controle de bactérias virulentas. A estes antissépticos orais terapêuticos foram adicionados metais, óxidos metálicos e outras nanopartículas, que parecem ser alternativas promissoras, dentre elas as Ftalocianinas (2,46,48,49).

Além dos protocolos de uso de água oxigenada, dentre os produtos de higiene oral disponíveis, algumas novas gerações de enxaguantes bucais atualmente disponíveis no mercado têm ingredientes que podem contribuir para diminuir a carga viral SARS-CoV-2 e, assim, facilitar o combate à transmissão oral já que o padrão ouro, a clorexidina, um componente usual do antisséptico bucal, não se mostrou eficiente contra o SARS-CoV-2 (2). Um estudo com uma

baixa amostra mostrou a baixa, por apenas duas horas, na carga viral da saliva quando utilizado bochecho de clorexidina 0,12% (47).

Aliado a isso, a literatura mundial já sugere alguns exemplos de novas drogas contra o SARS-CoV-2, dentre elas as ftalocianinas. A sugestão de sua utilização baseia-se na suposta inibição de pan do sítio de ligação S-adenosyl-l-methionine (SAM) a interface nsp 16/ nsp 10 e o sulco de ligação de RNA do SARS-CoV-2 2'-O-MTase (2'-O- metiltransferase), podendo fornecer uma camada biológica adicional de interesse para o uso de derivados de ftalocianina como moléculas biocidas que podem ser incorporadas em materiais autodesinfetantes como tecidos, filmes de revestimentos que podem desempenhar um papel vital na prevenção da transmissão de SARS-CoV-2, especialmente na área da saúde (50).

A ftalocianina é um arquétipo dos chamados antimicrobianos fotodinâmicos, nos quais a combinação de uma droga sensibilizante e luz visível causam destruição seletiva de vírus, bactérias e outros patógenos quando aplicada ao consumidor ou produtos médicos (51,52,53,54). Algumas indicações têm se destacado no tratamento de doenças neoplásicas, degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, doenças virais (herpes), micoses, doenças bacterianas e alguns tratamentos dermatológicos (55,56,57,58). Estudos já demonstraram que as metaloftalocianinas, são estáveis e não tóxicas e/ou apresentam baixa toxicidade (59,60). Da mesma maneira, em um estudo *in vivo* foi evidenciado um reparo significativamente maior de lesões cutâneas de leishmaniose, causadas pelo protozoário *L. amazonensis*, do que o tratamento padrão ouro convencional quanto utilizado PDT com ftalocianina (61).

Diante do SARS-CoV-2, em testes *in vitro*, um enxaguatório bucal contendo ftalocianina em uma concentração de 0,015% apresentou inativação de 90% do vírus (62). Já quando essa concentração foi aumentada para 0,02% e realizado o mesmo teste houve inibição de 99,9% deste vírus (63). Na realização de testes *in vitro* com enxaguatório bucal a uma concentração de 0,015% de ftalocianina, porém com os microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* 99,9% de inativação deles foi demonstrada (64).

Partindo para a aplicação do enxaguatório bucal contendo ftalocianina em pacientes com a COVID-19 que apresentaram sintomas leve e/ou moderados, a posologia adotada foi de 5ml do produto, bochechando/gargarejando durante 1 minuto, 5 vezes ao dia e obtiveram-se os seguintes resultados. Em uma série de 8 casos em pacientes que não estavam sob internação hospitalar, os mesmos ficaram assintomáticos em poucos dias após a introdução do antisséptico bucal (65). Ainda, em 4 pacientes que apresentaram ulcerações bucais em conjunto com o

diagnóstico da doença e onde nenhum deles apresentava histórico de ulcerações aftosas ou herpes simples, obteve-se o reparo total das lesões intra-orais entre 12 horas e 4 dias após o início da utilização desse enxaguatório bucal (66). Através do controle de RT-PCR de 4 pacientes com diagnóstico da COVID-19, sendo esses contaminados pela variante P.1 do SARS-CoV-2, houve erradicação total em naso e orafaringe em até 72 horas após o início do enxaguante bucal contendo derivado de ftalocianina (67). É importante salientar que esse enxaguatório bucal participou como coadjuvante terapêutico, não impedindo nem excluindo o tratamento médico necessário.

Esse derivado de ftalocianina de ferro também passou por testes de citotoxicidade e foi comparado a outro produto extensamente utilizado em Odontologia (Flúor). Este estudo *in vitro* com cultura de células foi desenvolvido em São José dos Campos na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). A ftalocianina a 0,1% demonstrou citotoxicidade inferior ao flúor. A ftalocianina 0,1% foi considerada levemente citotóxica (60% de viabilidade celular), enquanto o Flúor (1450 ppm) foi considerado severamente citotóxico (29% de viabilidade celular) (48,49). O composto demonstrou ser inerte, não sendo classificado como substância perigosa e com efeitos toxicológicos e de carcinogenicidade negativos. Os dados foram apresentados no Congresso Internacional de Pesquisa Odontológica (IADR, 2020, Washington) e publicados nos anais do evento (48,49). Conforme relatado, o produto é seguro, até mesmo porque já é comercializado em cremes dentais e outros cosméticos no mundo. No Brasil, um exemplo de produto de higiene oral que contém a ftalocianina, é aquele contido na linha Close-up White Now de creme dental da empresa UNILEVER. Nesta linha de produtos a Ftalocianina utilizada é da marca Blue Covarine (corante - CI74160).

Neste sentido, o PHTALOX® é um enxaguatório bucal, que contém ftalocianina, para a prevenção de problemas orais que apresenta além de atividade antimicrobiana e antifúngica, ação antiviral. E com isso, a partir das diversas potencialidades desse enxaguante bucal somado a necessidade de pesquisas clínicas com produtos efetivos contra o SARS-CoV-2 surgiu a linha de pesquisa que deu origem a essa dissertação de mestrado.

2 ARTIGOS

2 ARTIGOS

2.1 ARTIGO 1

Orcina BDF, Pietro ECIN, Kuroda JPG, Alves LMDC, Zangrando MSR, Oliveira RC, Simão ANC, Vilhena FV, Santos PSDS. Oral Antiseptic Spray Containing Phthalocyanine Solution Reduced Saliva SARS-CoV-2 Viral Load: Case Series. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2022 Jul 14;26(3):e293-e295. doi: 10.1055/s-0042-1750202.



Letter to the Editor 293

Oral Antiseptic Spray Containing Phthalocyanine Solution Reduced Saliva SARS-CoV-2 Viral Load: Case Series

Bernardo da Fonseca Orcina¹ Emilene Cristine Izu Nakamura Pietro²
 Juliana Pescinelli Garcia Kuroda² Lucas Marques da Costa Alves²
 Mariana Schutzer Raghianti Zangrando³ Rodrigo Cardoso de Oliveira⁴
 Andréa Name Colado Simão⁵ Fabiano Vieira Vilhena⁶ Paulo Sérgio da Silva Santos¹

¹Department of Surgery, Stomatology, Pathology, and Radiology, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Control Infection Commission, Hospital Estadual de Bauru, Bauru, SP, Brazil

³Department of Oral Rehabilitation and Periodontology, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴Department of Oral Biology, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brazil

⁵Department of Immunology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

⁶TRIALS Oral Health and Technologies

Address for correspondence Paulo Sérgio da Silva Santos, DDS, MD, PhD, Associate Professor Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 975, Vila Universitária, Bauru, SP 17012-901, Brazil (e-mail: paulosss@fob.usp.br).

Int Arch Otorhinolaryngol 2022;26(3):e293–e295.

Introduction

Since the 2019 global dissemination of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), scientific advancements have enabled researchers to develop different types of vaccines and other forms of prevention and treatment against coronavirus disease 2019 (COVID-19).¹ The oral cavity is related to the development of COVID-19 as it allows the virus direct access into the body.^{2–4} According to the literature, clinical evidence has demonstrated that antiviral oral solutions can inactivate SARS-CoV-2 and reduce clinical symptoms and severity of COVID-19.^{2,5–8} Based on previous in vitro studies employing antiviral phthalocyanine derivative (APD) solutions,^{6,9} this case series evaluated the action of an APD oral spray for viral load reduction in COVID-19 hospitalized patients.

Material and Methods

This prospective, single center, and consecutive case series study was conducted at a public hospital in Brazil, in accordance

with the principles of the declaration of Helsinki and the ethical standards of human experimentation, with the approval of the human research ethics committee (CAAE 34070620.6.0000.5417). From November 1, 2020, to January 14, 2021, COVID-19 patients diagnosed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) and admitted to the hospital were invited to participate. To be enrolled in the study, participants had to be 18 years or older and present with SARS for more than a week prior to admission. Participants signed an informed consent form after agreeing to the risks and objectives of the study. The exclusion criteria included patients who had medical contraindications to oral spray, an inability to gargle/spit, and a baseline negative salivary PCR for the presence of SARS-CoV-2. Patients were instructed to use ~ 1.5 mL of the APD solution (3 pumps for each area: throat, tongue, right cheek, and left cheek), switch between gargling/rinsing for 30 seconds, and conduct this regimen 5 times per day: upon awakening, after breakfast, after lunch, after dinner, and before bedtime. This adjunctive protocol was performed for 1 week along with

received
 August 22, 2021
 accepted after revision
 May 2, 2022

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1750202>.
 ISSN 1809-9777.

© 2022, Fundação Otorrinolaringologia. All rights reserved.
 This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)
 Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

standard COVID-19 treatment. Saliva was collected to evaluate the presence of SARS-CoV-2 (PCR) before initiation of the oral spray protocol (baseline), and again after 2 and 4 days of use.

Results

A sample of 11 patients from 14 selected SARS-CoV-2-positive patients was enrolled in this study. According to **Table 1**, 10 patients (91%) were male, and the median age was 58 years (range: 38–77 years). The median onset of symptoms was 5 days before admission, with a 5-day median length of hospital stay. Four patients (36.4%) had no comorbidities, and 1 patient (9%) was admitted to the intensive care unit and subsequently passed. All patients received standard care for COVID-19, including antibiotic, antiinflammatory, anticoagulation, and oxygen support therapy. Regarding salivary SARS-CoV-2 detection, 6 patients (54.5%) tested positive, and 5 patients (45.5%) tested negative after 2 days. After 4 days of APD oral spray use, 3 patients (27.3%) tested positive, and 8 (72.7%) tested negative. No side effects of using an APD oral spray have been reported.

Discussion

In the present case series, the use of an APD oral spray protocol reduced the salivary SARS-CoV-2 viral load in COVID-19 hospitalized patients. According to the literature,^{2–4} the oral environment is directly involved in the pathophysiology of COVID-19.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 can replicate in the oral mucosa and be transmitted by saliva.

Oral antiviral solutions can reduce the viral load in saliva and decrease the spread of the virus. Our previous study⁶ demonstrated clinical improvement and reduction in hospitalization time (4-day median length of hospital stay) when an APD oral solution was used as an adjuvant in a gargle/rinse mouthwash protocol in COVID-19 patients. In the present study, 91% of patients were discharged from the hospital with a 5-day median length of hospital stay. Thus, we hypothesized that the APD oral spray protocol plays a role in faster recovery without any side effects.

Considering the limitations of the present case series, the lack of a comparative placebo control and sample size may have influenced our interpretation of the results. However, the use of APD showed that 45.5% and 72.7% of the samples were PCR-negative for SARS-CoV2 after 2 and 4 days, respectively. Similar results were reported in a chlorhexidine oropharyngeal rinse-treated group (62.1%) and a combined chlorhexidine oropharyngeal rinse and posterior oropharyngeal spray-treated group (86%) after 4 days.¹⁰

Simple and low-cost measures, such as the use of antiviral substances in mouthwashes and mouth sprays, may accelerate COVID-19 recovery, thus reducing the progression of severe, life-threatening cases of the disease.

Conclusion

Considering the limitations of this case series, the results suggest that the use of an APD oral spray may reduce the salivary SARS-Cov-2 viral load. Further randomized controlled clinical trials with larger sample sizes using this protocol are necessary.

Table 1 Case series: patients data and clinical characteristics

Patient no.	Age	Sex	Outcome	ICU need	Symptoms onset	Hospitalization time	PCR baseline	PCR D2	PCR D4	Underlying diseases
1	38	M	discharge	no	5	4	positive	negative	discharge	obesity
2	58	M	discharge	no	5	3	positive	negative	discharge	no comorbidities
3	61	M	discharge	no	5	3	positive	negative	discharge	no comorbidities
4	42	M	discharge	no	6	3	positive	negative	discharge	obesity, arterial hypertension
5	60	M	discharge	no	6	8	positive	negative	negative	no comorbidities
6	48	W	discharge	no	5	5	positive	positive	negative	obesity, arterial hypertension, asthma, anemia
7	67	M	discharge	no	5	26	positive	positive	negative	arterial hypertension, smoking, glaucoma
8	55	M	discharge	no	3	5	positive	positive	negative	coronary heart disease
9	50	M	discharge	no	3	5	positive	positive	positive	no comorbidities
10	65	M	discharge	no	3	12	positive	positive	positive	arterial hypertension, coronary heart disease
11	77	M	death	yes	5	22	positive	positive	positive	serious coronary heart disease, arterial hypertension, chronic renal failure, diabetes, former smoker, arterial hypertension, alcoholism

Abbreviations: ICU, intensive care unit; M, male; PCR, polymerase chain reaction; W, woman.

Funding

Dr. F. V. Vilhena reports grants from TRIALS Inc, during the conduct of the study; in addition, Dr. F. V. Vilhena has a patent.

Conflict of Interests

The authors have no conflict of interests to declare.

References

- 1 Bakadia BM, He F, Souho T, et al. Prevention and treatment of COVID-19: Focus on interferons, chloroquine/hydroxychloroquine, azithromycin, and vaccine. *Biomed Pharmacother* 2021;133:111008. Doi: 10.1016/j.biopha.2020.111008
- 2 Huang N, Pérez P, Kato T, et al; NIH COVID-19 Autopsy Consortium HCA Oral and Craniofacial Biological Network. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med* 2021;27(05):892–903. Doi: 10.1038/s41591-021-01296-8
- 3 Fernandes Matuck B, Dolhnikoff M, Maia GVA, et al. Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: a post-mortem study. *J Oral Microbiol* 2020;13(01):1848135. Doi: 10.1080/20002297.2020.1848135
- 4 Matuck BF, Dolhnikoff M, Duarte-Neto AN, et al. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: a source for saliva contamination. *J Pathol* 2021;254(03):239–243. Doi: 10.1002/path.5679
- 5 Mateos-Moreno MV, Mira A, Ausina-Márquez V, Ferrer MD. Oral antiseptics against coronavirus: in-vitro and clinical evidence. *J Hosp Infect* 2021;113:30–43. Doi: 10.1016/j.jhin.2021.04.004
- 6 Santos PSS, Fonseca Orcina B, Machado RRG, et al. Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: Randomised trial. *Sci Rep.* 2021 Oct 7. PMID: 34620904; PMCID: PMC8497631.11(01):19937. Doi: 10.1038/s41598-021-99013
- 7 da Fonseca Orcina B, Vilhena FV, Cardoso de Oliveira R, et al. A Phthalocyanine Derivate Mouthwash to Gargling/Rinsing as an Option to Reduce Clinical Symptoms of COVID-19: Case Series. *Clin Cosmet Investig Dent* 2021;13:47–50. Doi: 10.2147/CCIDE.S295423
- 8 Carrouel F, Valette M, Gadea E, et al. Use of an antiviral mouthwash as a barrier measure in the SARS-CoV-2 transmission in adults with asymptomatic to mild COVID-19: a multicentre, randomized, double-blind controlled trial. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(10):1494–1501
- 9 Santos C, da Fonseca Orcina B, Brito Reia VC, et al. Virucidal activity of the antiseptic mouthwash and dental gel containing anionic phthalocyanine derivative: in vitro study. *Clin Cosmet Investig Dent* 2021;13:269–274. Doi: 10.2147/CCIDE.S315419
- 10 Huang YH, Huang JT. Use of chlorhexidine to eradicate oropharyngeal SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *J Med Virol* 2021;93(07):4370–4373. Doi: 10.1002/jmv.26954

2.2 ARTIGO 2

da Silva Santos PS, da Fonseca Orcina B, Machado RRG, Vilhena FV, da Costa Alves LM, Zangrando MSR, de Oliveira RC, Soares MQS, Simão ANC, Pietro ECIN, Kuroda JPG, de Almeida Benjamim IA, Araujo DB, Toma SH, Flor L, Araki K, Durigon EL. Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: randomised trial. *Sci Rep.* 2021 Oct 7;11(1):19937. doi: 10.1038/s41598-021-99013-5.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports



OPEN

Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: randomised trial

Paulo Sérgio da Silva Santos^{1,9,✉}, Bernardo da Fonseca Orcina¹, Rafael Rahal Guaragna Machado², Fabiano Vieira Vilhena³, Lucas Marques da Costa Alves⁴, Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando⁵, Rodrigo Cardoso de Oliveira¹, Mariana Quirino Silveira Soares⁵, Andréa Name Colado Simão⁶, Emilene Cristine Izu Nakamura Pietro⁴, Juliana Pescinelli Garcia Kuroda⁴, Ivanilda Aparecida de Almeida Benjamim⁴, Danielle Bastos Araujo², Sérgio Hiroshi Toma⁸, Lourival Flor⁷, Koiti Araki^{8,9} & Edison Luiz Durigon^{2,9}

The risk of contamination and dissemination by SARS-CoV-2 has a strong link with nasal, oral and pharyngeal cavities. Recently, our research group observed the promising performance of an anionic phthalocyanine derivative (APD) used in a mouthwash protocol without photoexcitation; this protocol improved the general clinical condition of patients infected with SARS-CoV-2. The present two-arm study evaluated *in vitro* the antiviral activity and cytotoxicity of APD. Additionally, a triple-blind randomized controlled trial was conducted with 41 hospitalized patients who tested positive for COVID-19. All the included patients received World Health Organization standard care hospital treatment (non-intensive care) plus active mouthwash (experimental group AM/n = 20) or nonactive mouthwash (control group NAM/n = 21). The adjunct mouthwash intervention protocol used in both groups consisted one-minute gargling/rinsing / 5 times/day until hospital discharge. Groups were compared considering age, number of comorbidities, duration of symptoms prior admission and length of hospital stay (LOS). The associations between group and sex, age range, presence of comorbidities, admission to Intensive care unit (ICU) and death were also evaluated. The *in vitro* evaluation demonstrated that APD compound was highly effective for reduction of SARS-CoV-2 viral load in the 1.0 mg/mL (99.96%) to 0.125 mg/mL (92.65%) range without causing cytotoxicity. Regarding the clinical trial, the median LOS of the AM group was significantly shortened (4 days) compared with that of the NAM group (7 days) ($p = 0.0314$). Additionally, gargling/rinsing with APD was very helpful in reducing the severity of symptoms (no ICU care was needed) compared to not gargling/rinsing with APD (28.6% of the patients in the NAM group needed ICU care, and 50% of this ICU subgroup passed way, $p = 0.0207$). This study indicated that the mechanical action of the protocol involving mouthwash containing a compound with antiviral effects against SARS-CoV-2 may reduce the symptoms of the patients and the spread of infection. The use of APD in a mouthwash as an

¹Bauru School of Dentistry of University of São Paulo, Al. Dr. Octavio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, Bauru, São Paulo 17012-901, Brazil. ²Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil. ³TRIALS – Oral Health & Technologies, Bauru, SP, Brazil. ⁴Hospital Estadual de Bauru, Bauru, Brazil. ⁵Faculdade São Leopoldo Mandic, Instituto de Pesquisa São Leopoldo Mandic, Campinas, Brazil. ⁶Londrina State University, Paraná, Brazil. ⁷Golden Technology Corp, São Paulo, Brazil. ⁸Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil. ⁹These authors contributed equally: Paulo Sérgio da Silva Santos, Koiti Araki and Edison Luiz Durigon. ✉email: paulossss@fob.usp.br

adjuvant the hospital COVID-19 treatment presented no contraindication and reduced the hospital stay period.

Trial registration: The clinical study was registered at REBEC—Brazilian Clinical Trial Register (RBR-58ftdj).

Abbreviations

APD	Anionic phthalocyanine derivative
WHO	World Health Organization
AM	Active mouthwash
NAM	Nonactive mouthwash
LOS	Length of hospital stay
ICU	Intensive care unit
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
FBS	Fetal bovine serum
BSA	Bovine serum albumin
REBEC	Brazilian clinical trial register
IIF	Indirect immunofluorescence
ACE-2	Angiotensin-converting enzyme 2

SARS-CoV-2 was first recognized at the end of 2019, and its outbreak caused a global pandemic that is affecting people all over the world due to its higher contamination rate, spreading capacity and index of lethality than those of previous coronaviruses^{1–3}. Patients who test positive for COVID-19 are admitted to hospitals and receive intensive care at unprecedented rate⁴. The patients who are most vulnerable to the development of COVID-19 are elderly people who suffer from comorbidities, such as high blood pressure, obesity, heart diseases, breathing problems and neoplasia⁴. Thus, according to the World Health Organization (WHO), an early and accurate diagnosis is crucial to control the spread of SARS-CoV-2 because a higher viral load is related to more severe disease^{5,6}.

It is clear that washing hands, wearing masks, and social distancing are effective measures to fight the pandemic^{6,7}. In addition, considering that COVID-19 contagion, evolution and dissemination have strong associations with the mouth^{8,9}, gargling with antiseptic mouthwashes has been suggested as an extra preventive measure against COVID-19^{7,8,10–17}. However, in the cases of diseases, such as influenza, which are caused by SARS-type viruses, virucidal activity is essential for such measures to be effective⁸.

Phthalocyanines are analogues of synthetic and aromatic planar porphyrin macrocycles consisting of four indol units linked together by nitrogen atoms¹⁸, and have shown good inactivation of various microbial pathogens¹⁹. Furthermore, they are dyes awaiting which, with the combination of a sensitizing drug with visible light, will promote the selective destruction of viruses, bacteria and other microorganisms²⁰. The potential of phthalocyanines for biological and medical applications has been recognized^{20–23}, especially in photodynamic therapy, since phthalocyanines in the excited state can promote the reactive oxygen species generation or redox processes, while no such properties are observed in the absence of light. Recently, our research group observed the promising performance of an anionic phthalocyanine derivative (APD) used in a mouthwash protocol without photoexcitation; this protocol improved the general clinical condition of patients with SARS-CoV-2 infection^{14,15}.

Hence, the following study aimed to (1) evaluate the antiviral activity and cytotoxicity of APD *in vitro* and (2) clinically assess the use of an APD-containing mouthwash in hospitalized patients who tested positive for COVID-19 to reduce the severity of the disease and minimize the LOS.

Methods

This two-arm study consisted of laboratory experiments to evaluate the antiviral activity and cytotoxicity of the anionic iron tetracarboxyphthalocyanine derivative (APD) (Golden Technology Corp., Brazil) and a triple-blind randomized controlled trial.

Laboratory studies. All the *in vitro* experiments were conducted in Biosafety Level (BSL) BSL-2 and BSL-3 facilities at the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil, according to the laboratory biosafety guidance recommended by the WHO for the novel coronavirus (SARS-CoV-2)⁴.

- **Antiviral and cytotoxic activity of APD**

To determine the antiviral activity and cytotoxicity of APD, a 2.0 mg/mL (I) stock solution prepared in sterile distilled water was serially diluted by twofold (1.0 mg/mL to 0.39×10^{-2} mg/mL, i.e., 1/2 to 1/512) in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 2.5% fetal bovine serum (FBS) in a 96-well cell culture plate to a final volume of 100 μ L per well. The dilutions were made in quadruplicate to determine both virus neutralization and cytotoxicity.

After dilution, 100 μ L of SARS-CoV-2 (SARS-CoV2/SP02.2020.HIAE.Br) at 10^3 TCID₅₀/mL (MOI = 0,02) was added to the wells and incubated for 30 min at 37 °C. Then, 150 μ L of the mixture (APD plus virus) was transferred to a 96-well cell culture plate previously seeded with 1×10^6 Vero CCL-81 cells/mL and grown to 80–90% confluence. The cells were then incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 72 h²⁴.

The plate was visually evaluated using an optical microscope to determine cell integrity and morphology, and then, samples were collected (in quadruplicate) for RNA extraction and real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for the quantitative detection of the amount of active virus. The cells were fixed with Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich).

- **Nucleic acid extraction and real-time RT-PCR for SARS-CoV-2 RNA detection**

The extraction of total nucleic acids (RNA and DNA) was carried out using the semiautomated NucliSENS[®] easyMag[®] platform (BioMerieux, Lyon, France) following the manufacturer's instructions. The detection of viral RNA was carried out using the AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems Inc., EUA) on an ABI 7500 SDS real-time PCR machine (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) using a published protocol and primers and probes specific for the E²⁵ RNA copies/mL were quantified by real-time RT-PCR using a specific in vitro-transcribed RNA quantification standard kindly provided by Christian Drosten, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Germany, as described previously²⁶.

The antiviral activity was expressed as the percent reduction in the active SARS-CoV-2 virus RNA/mL, calculated according to Eq. (1), after contact with the test specimen compared to the number of virus particles in the positive control.

$$\text{Reduction (\%)} = [(B - A)/B] \times 100. \quad (1)$$

where A and B are the numbers of RNA copies/mL recovered from the supernatant of APD-treated and APD-untreated cells, respectively.

- **Indirect Immunofluorescence (IIF)**

The methodology described here was adapted from Sales-Medina et al.²⁷. Briefly, at 72 h.p.i., the plates were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde in 1X PBS (pH 7.4) and subjected to indirect immunofluorescence detection of viral cellular infection. After washing twice with 1X PBS 0.05% Tween 20 (PBST), the plates were blocked with bovine serum albumin (BSA) (3% w/v in 1X PBS; Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature and washed twice with PBST. Convalescent serum from a Brazilian patient with COVID-19 diluted 1:1000 in PBS was used as a primary antibody to detect SARS-CoV-2 in Vero cells. The primary antibodies were incubated for 30 min, and the plates were washed twice with PBST. Subsequently, goat anti-human IgG labeled with Alexa 488 (Thermo Scientific) diluted to 4 µg/mL in PBS was used as the secondary antibody, and the cells were incubated for 30 min with 5 µg/mL 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) in PBS to stain the nucleic DNA. The plates were washed twice with PBST and imaged in an Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer) using a 20× magnification objective. Five images were acquired per well and analyzed using Harmony software (Perkin Elmer), version 3.5.2. Image analysis consisted of identifying and counting the Vero E6 cells based on the nuclear segmentation, viral infection, and cytoplasmic staining detected by the immunofluorescence assay²⁷.

Clinical trial design and oversight. This triple-blind randomized controlled trial was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and ethical standards of human experimentation with the approval of the Human Research Ethics Committee of Bauru School of Dentistry of the University of Sao Paulo, Brazil (CAAE 34,070,620.6.0000.5417). This clinical study was also registered at REBEC—Brazilian Clinical Trial Register (RBR-58ftjd) in 10/28/2020. The study complied with the Consort 2010 checklist of information to include when reporting a randomized trial. This study was carried out as a controlled trial from 10th August to 4th November 2020 at Bauru State Hospital, Bauru, with hospitalized patients who tested positive for SARS-CoV-2. All the participants received the World Health Organization standard care hospital treatment (world medical protocol—antibiotics, corticoids and anticoagulants)⁶ plus one of the two mouthwash interventions (active and nonactive mouthwashes). Based on previous studies, APD antimicrobial compound-containing mouthwash was chosen as the active mouthwash (AM)^{14,15,28} for comparison with a nonactive mouthwash (NAM) negative control. Both mouthwashes were produced with exactly the same formula (color, flavor, other ingredients) except for the presence or absence of the active ingredient. Once the mouthwash intervention was given to patients receiving medical treatment for COVID-19, the use of a negative control mouthwash was necessary. The active compound concentration used was between the 1:8 and 1:16 titer according to the in vitro arm of the study. All the oral care materials used during the study (mouthwashes, toothbrushes, toothpaste and dental floss) were produced by Rabbit Corp, Brazil.

Patient inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria were patients aged 18 years or older, who were hospitalized less than 7 days after the onset of severe acute respiratory syndrome (SARS), who were suspected and who were confirmed positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR test, admitted to the hospital with a mild or moderate clinical condition, classified according WHO recommendations⁶ with no need for intensive care unit (ICU). To be enrolled in the study, each participant read and signed the informed consent form after understanding the risks and objectives of the study. The exclusion criteria included patients who had contraindications to using mouthwash due to medical reasons or the inability to gargle and spit.

Randomization and masking. Sample randomization was performed as follows: the mouthwash bottles (AM and NAM) were placed in a closed package with consecutive numbers according to the patients selected. An EXCEL[®] database was created from these numbered packages and used for randomization. After randomiza-

tion, packages with mouthwash bottles and oral care kits were delivered to the hospitalized patients. This study was considered triple-blind because the patients, the examiner and the statistician were blinded to the treatment groups.

Mouthwash intervention. The eligible participants were randomly assigned to one of the following groups: AM or NAM. The patients were instructed to use 5 mL of the mouthwash and to switch between gargling/rinsing for 1 min up to 5 times a day: upon awakening, after breakfast, after lunch, after dinner and before bedtime^{14,15}. Each patient followed this adjunctive therapeutic protocol until the outcome associated with COVID-19 medicine treatment was recorded.

Outcome measures. The primary outcome was the time to clinical improvement, defined as the length of stay in the hospital (patients did not need oxygen therapy support for more than 24 h and no longer showed any symptoms). Secondary outcomes were clinical evolution, need for care in the ICU and death. The criteria for the transfer of a patient to the ICU was the presence of respiratory effort requiring the use of O₂ above 8.0 L/min, which is the initial graduation of nonremovable masks. The mouthwash protocol was also verified regarding the conditions of use and side effects^{14,15}.

Statistical analysis. Statistical analysis was conducted using R (R Core Team) and SAS® software version 3.8 (SAS Institute Inc). Descriptive and exploratory data analyses were performed. A Mann–Whitney U non-parametric test was used to compare the groups regarding age, number of comorbidities, and duration of symptoms prior to hospitalization. The frequency of admission to intensive care and deaths were compared between groups using Fisher's exact test. The time to clinical improvement is presented by a Kaplan–Meier plot and was compared using a Cox regression model, with an estimate of the hazard ratio association measure and 95% confidence interval. Since a significant difference was observed between groups regarding the median age, the survival analysis was adjusted for the patient's age.

The sample of 41 patients included in this investigation provided a test power of 0.80 for a minimum detectable hazard ratio of 2.5, with $\alpha = 0.05$, considering the follow-up time of 22 days and median hospitalization time in the control group of 7 days.

Ethics approval and consent to participate. This research was approved of the Human Research Ethics Committee of Bauru School of Dentistry of the University of Sao Paulo, Brazil (CAAE 34070620.6.0000.5417).

Results

In vitro cytotoxicity and antiviral activity. In the optical microscopy observations, APD demonstrated cytotoxicity only at the initial dilution (2.0 mg/mL, the most concentrated stock solution) since Vero CCL-81 cell monolayer integrity was observed after treatment with all the other dilutions. The integrity of the cell monolayer was observed under a microscope after treatment with APD at dilutions ranging from 1:2 (1.0 mg/mL) to 1:64 (1.56×10^{-2} mg/mL); these results were confirmed by cell fixation and staining with Naphthol Blue Black. The data for both the cell cytotoxicity and antiviral activity of APD were also confirmed by indirect immunofluorescence (IIF) (Fig. 1 and supplementary material). The real-time RT-PCR results showed a significant reduction in viral load when compared to the positive control at the 1:2 (99.96%), 1:4 (99.88%), 1:8 (99.84%) and 1:16 (92.65%) titers, whereas partial virus neutralization was observed at the 1:32 (77.42%) and 1:64 (11.06%) titers. No virus neutralization was observed below the 1:128 titer.

Clinical trial. Patients. According to CONSORT, 129 patients with suspected COVID-19 and admitted to the hospital were recruited for the study. After removing patients based on their oropharynx RT-PCR results, the inclusion and exclusion criteria ($n = 50$), and declining to participate or discontinuing the intervention ($n = 38$), 41 patients positive for COVID-19 were finally eligible for this study. These patients were randomly divided to the AM group ($n = 20$) or the NAM group ($n = 21$) (Fig. 2).

The median age of the patients was significantly higher in the AM group than in the NAM group ($p = 0.0069$). The participants in the NAM group were 48.4 years old on average, ranging from 27 to 70 years old, and those in the experimental group were 59.1 years old on average, ranging from 32 to 78 years old (Table 1). Additionally, 19% and 50% of the patients in the NAM and AM groups, respectively, were aged over 60 years ($p = 0.0367$). There was no significant difference between the groups regarding sex, presence of comorbidities, number of comorbidities, duration of symptoms prior to hospitalization ($p > 0.05$).

Regarding O₂ saturation, in Group AM we found 8 (40%) patients with SaO₂ > 95%, 10 (50%) with SaO₂ between 90–94%, 1 (5%) with SaO₂ < 90%, and 1 patient not informed in the medical chart. In the NAM group we found 5 (23.8%) patients with SaO₂ > 95%, 15 (71.4%) with SaO₂ between 90–94%, and 1 (4.8%) with SaO₂ < 90%. These patients were receiving O₂ support respectively, in the AM group with room air 8 (40%), 1 to 3 l/min of O₂—8 (40%), 4 to 5 l/min of O₂—2 (10%) and more than 5 l/min of O₂—1 (5%). In the NAM group with room air 5 (23.8%), 1 to 3 l/min of O₂—11 (52.4%), 4 to 5 l/min of O₂—3 (14.3%) and more than 5 l/min of O₂—2 (9.5%).

Primary outcome. Table 2 and Fig. 3 show that there was a significant difference between the two groups regarding the occurrence of hospital discharge over time ($p < 0.05$). As there was a significant difference between the groups in terms of age, the survival analysis was performed with adjustment for age. The median LOS, that is, the time at which 50% of patients were discharged, for the NAM group was 7 days. In the AM group, this time was 4 days. It is also noted that the time for 75% of the patients in the NAM group to be discharged was

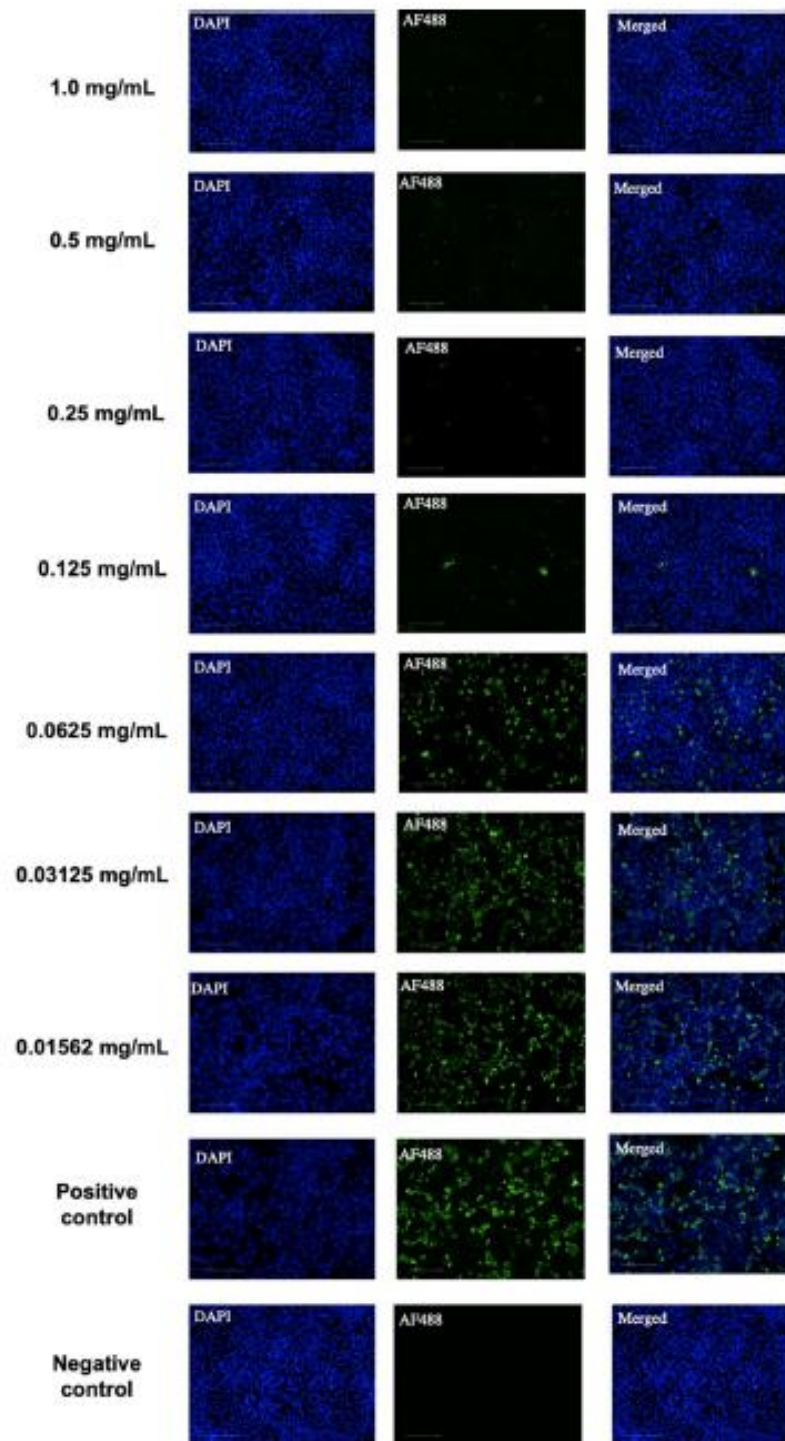


Figure 1. Indirect immunofluorescence (IIF) assay for the detection of SARS-CoV-2-infected cells. Representative images of the noncytotoxic concentrations (1.0 mg/mL up to 0.156 mg/mL) of APD observed with a 20 \times objective. A mixture of MERS-CoV-infected and noninfected Vero cells was stained with convalescent serum monoclonal antibodies, followed by incubation with the Alexa488-conjugated goat anti-human IgG antibodies (green). Cells were counterstained with DAPI to stain the nuclei (blue). Positive (infected nontreated cells) and negative (noninfected cells) controls are shown at the bottom of the image. Images were taken using the Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer). Scale bar, 100 μ m.

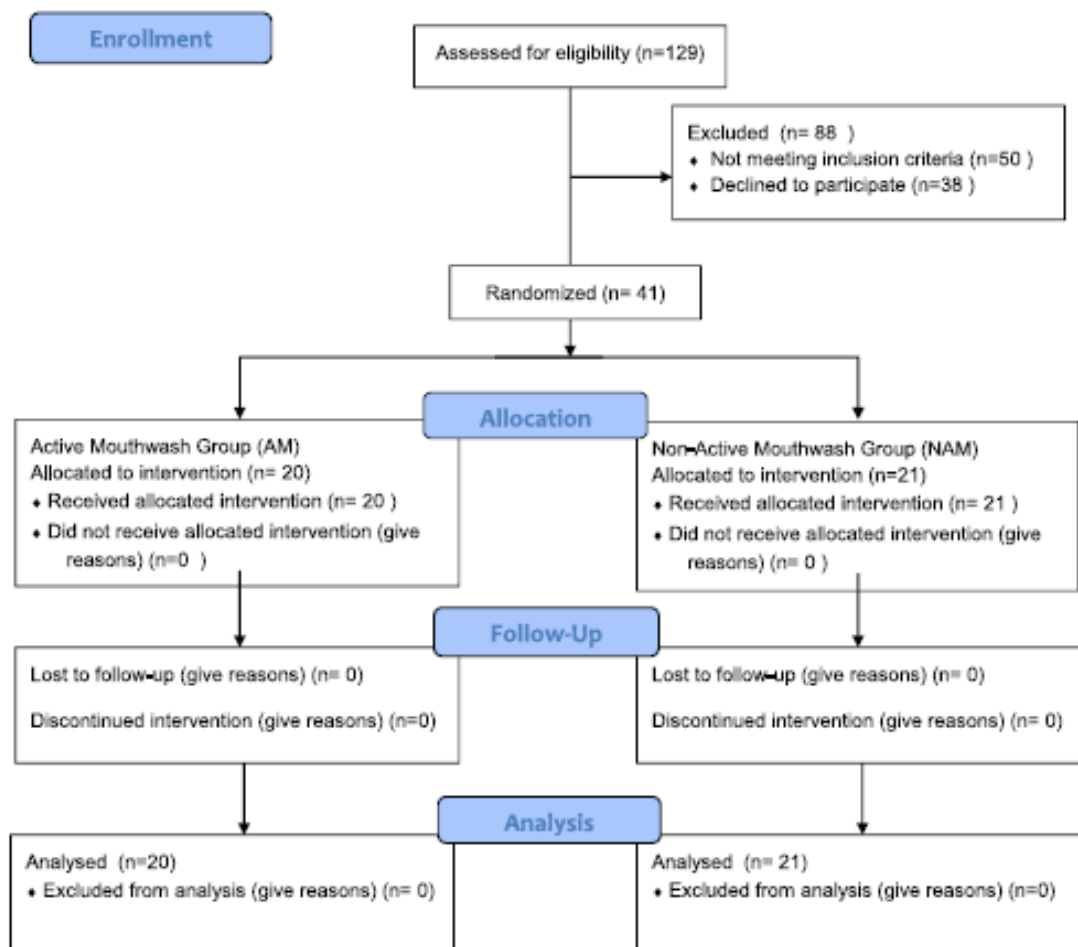


Figure 2. CONSORT 2010 Flow Diagram with randomly divided groups AM and NAM.

	Group				p-value
	NAM		AM		
	Mean (SD)	Median (min-max)	mean (SD)	Median (min-max)	
Age (years)	48.4 (11.4)	47.0 (27.0-70.0)	59.1 (13.0)	59.0 (32.0-78.0)	¹ 0.0069
Number of comorbidities	1.4 (1.4)	1.0 (0.0-4.0)	1.6 (1.3)	1.5 (0.0-5.0)	¹ 0.6481
Duration of symptoms prior to hospitalization (days)	4.3 (2.1)	4.0 (1.0-9.0)	5.3 (1.9)	6.0 (1.0-9.0)	¹ 0.1238
	n	%	n	%	
Males	13	61.9%	13	65.0%	² 0.8370
Age > 60 y	4	19.0%	10	50.0%	² 0.0367
Presence of comorbidities	14	66.7%	16	80.0%	² 0.3355

Table 1. Demographic and clinical data of both groups of patients: active mouthwash (AM) and non-active mouthwash (NAM) groups. ¹Mann Whitney-U; ²Chi-square; SD standard deviation.

12 days, whereas in the AM group, this time was 5 days. The hazard ratio for hospital discharge was 2.16 (95% CI 1.07-4.34).

Secondary outcomes. There was a significant association between the need for admission to the ICU and the group to which patients belonged ($p < 0.05$). In the NAM group, 6 (28.6%) patients needed intensive care during hospitalization, while in the AM group, none of the patients required ICU admission ($p = 0.02$). Three patients (14.3%) in the NAM group and none in the experimental group died during hospitalization ($p = 0.23$) (Table 3).

	Data distribution	Time (days)
NAM	75% (IC95%)	12.0 (7.0–21.0)
	50% (IC95%)	7.0 (4.0–10.0)
	25% (IC95%)	4.0 (3.0–5.0)
	Mean (SD)	8.9 (1.4)
AM	75% (IC95%)	5.0 (4.0–17.0)
	50% (IC95%)	4.0 (2.0–5.0)
	25% (IC95%)	2.5 (1.0–3.0)
	Mean (SD)	5.10 (1.19)

Table 2. Duration of hospitalization between groups. Hazard ratio = 2.16 (IC 95%: 1.07–4.34), $p=0.0314$. AM Active Mouthwash, NAM Non-Active Mouthwash groups, SD Standard deviation.

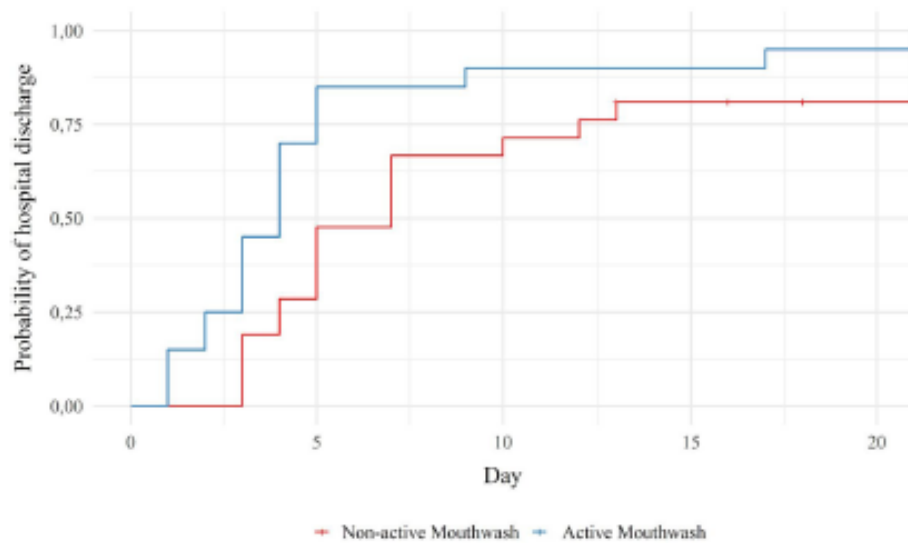


Figure 3. Probability of hospital discharge over time (days) according to each group.

	Group				p-value
	NAM		AM		
	n	%	n	%	
Need of ICU	6	28.6%	0	0.0%	*0.0207
Death	3	14.3	0	0.0%	0.2317

Table 3. Need of Intensive Care Unit (ICU) and deaths in NAM and AM groups. *Fisher’s exact test. NAM Non active mouthwash, AM Active mouthwash.

Safety outcomes. The use of the gargle/rinse protocol was possible and tolerable with no side effects. All the participants reported a pleasant, sweet taste after using both AM and NAM.

Discussion

The in vitro evaluation demonstrated promising antiviral action with the absence of cytotoxic effects in a range of concentrations of APD. The APD concentration used in the AM in this clinical study confirmed an antiviral efficacy between 92 and 99%, without evidence of cytotoxicity. The AM group presented a significant reduction in the length of hospitalization and the additional benefit of less severe symptoms. Moreover, according to the safety outcomes, no side effects were reported by the patients from the AM and NAM groups regarding the gargle/rinse mouthwash protocol.

Data regarding the mean time of hospitalization due to COVID-19 vary between geographic areas, but 14 days was found to be a reliable LOS time for patients in hospitals in China²⁹. In a recent study³⁰ was described

a median hospital stay period of 12 days in Brazil, which decreased to 6 to 7 days, depending on the concentration of propolis intervention used by the patients. In the present study, a promising result was found when the median LOS further decreased to 4 days in the AM group, which differed significantly from the NAM group, which had an average LOS of 7 days. On the other hand, it is possible to hypothesize that NAM itself was effective in reducing LOS when compared to previous studies^{29,30}. This result is probably due to mechanical hygiene of the oral and oropharynx cavities. There is in fact evidence of the effectiveness of the gargle/rinse protocol since local action is associated the regions that are intimately associated with the development of COVID-19 and play an important role in the defense of the host^{7,10,31}. In this sense, mechanical hygiene reduces the superficial viral load of the oropharynx and oral mucosa and could prevent upper respiratory tract infections³². Other authors³³ reported the prevention of respiratory infections by gargling povidone-iodine, where gargling more than four times daily was considered effective in preventing the adherence of pathogenic bacteria to the upper respiratory tract. In our case, however, we believe this mechanical action was just an adjuvant that potentialized the effect of APD in reducing the SARS-CoV-2 load, which was clinically demonstrated by the great reduction in LOS. Recent studies have shown that a higher viral load is the key factor in the severity of the disease and in worse prognosis^{5,34}. For this reason, decreasing the viral load is crucial to restrain the development of the disease, thus preventing the most serious symptoms. The virus enters the cell through the connection between the virus spike and the ACE2 receptor, which can be abundantly found in the salivary glands. Therefore, some recommendations have suggested the importance of controlling and reducing the viral load in the oral and oropharynx cavity by using an antiviral mouthwash^{8–11,13,14,35}.

Several studies have demonstrated the antimicrobial (antiviral) and anti-inflammatory properties of phthalocyanines^{20–23} after photoexcitation. However, in our case, virucidal activity was observed in the dark and with an iron phthalocyanine known to have poor photochemical properties compared to the respective zinc complexes³⁶, indicating different mechanisms of action.

Considering that some known technologies may exhibit an effective antagonistic action against SARS-CoV-2, a virtual screening based on molecular dynamics simulations and the interaction free energies of 8.770 FDA drugs extracted from the DrugBank database (<https://www.drugbank.ca/>) was carried out by a team of researchers²¹ which recently proposed phthalocyanine, hypericin, TMC-647055 and quarfloxin derivatives as the potentially most effective drugs for the treatment of COVID-19. All four molecules are known to have antiviral properties, but the results indicated that their high affinity for the inner cavity of the spike glycoprotein in the prefusion conformation could block the HR1 region, thus preventing the conformational changes necessary for SARS-CoV-2 entry into target cells. In other words, these molecules are potential spike glycoprotein fusion inhibitors able to prevent docking and thus infection of host cells by coronavirus.

The main interaction responsible for this fusion inhibition effect of phthalocyanine is hydrophobic, but very significant polar interactions, including hydrogen bonds, seem to be responsible for this effect of hypericin, the second most potent molecule. Accordingly, a stronger interaction and affinity of APD with the inner spike glycoprotein cavity in the prefusion conformation is expected since APD has a similar size and carboxylic acid groups at the periphery that are prone to hydrogen bond interactions. Consequently, the antiviral properties of APD could be due to its antagonistic effects on SARS-CoV-2, but APD is also known for its capacity to interact and activate oxygen molecules in the air, inducing a very localized production of activated oxygen molecules. These molecules are able to cause oxidative stress/damage to microorganisms, such as the coronavirus, leading to their inactivation. This hypothesis is confirmed by the effect of noncytotoxic, low concentrations (1.0 mg/mL up to 0.0156 mg/mL) in reducing in the active viral load after proliferation in Vero CCL-81 cells as observed by RT-PCR and by the *HTCI immunofluorescence-based assay, which showed the rapid cell nucleus localization based on DAPI staining* (Fig. 1). Thus, the high effectiveness of APD can probably be explained by a dual mode of action, namely, by blocking the HR1 region and by promoting oxidative damage leading to inactivation of the virus, thus making APD a very promising molecule to reduce the SARS-CoV-2 viral load¹³. Thus, it can be suggested that a mouthwash containing APD can help improve the response of the organism to COVID-19 infection. Once the positive response of the phthalocyanine derivative-containing mouthwash in the present study and in previous studies^{14,15} can be observed, the authors also speculate that other properties of phthalocyanines will be identified. In this sense, the possibilities of the local effect of APD associated with the control of secondary infections (antimicrobial activity), the anti-inflammatory effect, and the modulatory effect on the immune response are not excluded^{20,21,37,38}.

Although the COVID-19 distribution patterns in hospitals vary from one country to another^{5,6,29}, in the present study, there were no significant changes when comparing the AM and NAM groups in terms of sex, presence of comorbidities, number of comorbidities, or duration of symptoms prior to hospitalization.

The dynamics of the disease and the hospital environment, medications, stresses due to the pandemic, and sample size are some possible adverse interferences and limitations. Thus, the interpretation and generalization of the results should be performed with reservation. Nevertheless, the clinical trial clearly showed significant differences between the AM and NAM groups. In addition, the way the randomized study was carried out makes it unique since it created 2 nonhomogeneous groups. According to the literature³⁹, elderly patients who were more at risk should have taken longer to recover than younger patients. However, this was not the case, as the elderly patients in the AM group showed similar rates of recovery compared with the patients in different age groups. As a consequence, not only was the LOS decreased in this group of patients (AM) but also no intensive therapy was necessary, indicating that there was no tendency of progression into more severe prognostics. In addition, the probability of discharge (event) among participants in the AM group was twice the probability of discharge among participants in the NAM group at any point in time. Conversely, 28.6% of the patients in the NAM group needed to be admitted to the ICU, and half of this subgroup died. Further investigations are encouraged to confirm these results in larger populations.

The outstanding results achieved in the AM group suggest that mouthwash in addition to other medications can be useful in the strategic planning of COVID-19 treatment by the World Health Organization⁶.

Conclusion

The APD compound was demonstrated to be highly effective in reducing the SARS-CoV-2 viral load in vitro and to exhibit no cytotoxicity in the 1.0 mg/mL to 6.25×10^{-2} mg/mL range. Such a result was also confirmed in a clinical trial where gargling and rinsing five times a day was very helpful in reducing the hospital LOS for patients diagnosed with COVID-19. Further investigation is needed to elucidate this mechanism.

Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 26 March 2021; Accepted: 17 September 2021

Published online: 07 October 2021

References

- Zhou, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 10229 (2020).
- Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **395**, 10224 (2020).
- Zhu, N. *et al.* China novel coronavirus investigating and research team a novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 8 (2020).
- https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2. Accessed 30 Jan 2021.
- Magleby, R. *et al.* Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **2**, 851 (2020).
- <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>. Accessed: 30 Jan 2021.
- Tashiro, A. & Shaw, R. COVID-19 pandemic response in Japan: What is behind the initial flattening of the curve?. *Sustainability* **12**, 5250 (2020).
- O'Donnell, V. B. *et al.* Potential role of oral rinses targeting the viral lipid envelope in SARS-CoV-2 infection. *Function (Oxf)*. **1**, 1 (2020).
- Xu, J., Li, Y., Gan, F., Du, Y. & Yao, Y. Salivary glands: Potential reservoirs for COVID-19 asymptomatic infection. *J. Dent. Res.* **99**, 8 (2020).
- Naqvi, S. H. S. *et al.* Povidone-iodine solution as SARS-CoV-2 prophylaxis for procedures of the upper aerodigestive tract a theoretical framework. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **49**, 1 (2020).
- Carrouel, F. *et al.* COVID-19: A recommendation to examine the effect of mouthrinses with β -cyclodextrin combined with citrox in preventing infection and progression. *J. Clin. Med.* **9**, 4 (2020).
- Meister, T. L. *et al.* Virucidal efficacy of different oral rinses against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Infect. Dis.* **222**, 8 (2020).
- Santos, P. S. S. *et al.* A recommendation of PHTALOX[®] mouthwash for preventing infection and progression of COVID-19. *Acta Sci. Dent. Sci.* **4**, 12 (2020).
- da Fonseca, O. B. *et al.* A phthalocyanine derivate mouthwash to gargling/rinsing as an option to reduce clinical symptoms of COVID-19: Case series. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **13**, 47–50 (2021).
- Orcina, B. E. & Santos, P. S. S. Oral manifestation COVID-19 and the rapid resolution of symptoms post-phthalox treatment: A case series. *Int. J. Odontostomat.* **15**(1), 67–70 (2021).
- <https://vihema.gov.vn>. Accessed 30 Jan 2021.
- <https://www.jica.go.jp/COVID-19/en/index.html>. Accessed 30 Jan 2021.
- Schuster, C., Kraus, M., Opitz, A., Brütting, W. & Eckern, U. Transport properties of copper phthalocyanine based organic electronic devices. *Eur. Phys. J. Spec. Topics*. **180**, 117–134 (2010).
- Nyamu, S. N., Ombaka, L., Masika, E. & Nganga, M. Antimicrobial photodynamic activity of phthalocyanine derivatives. *Adv. Chem.* **2**, 2598062 (2018).
- Moussaron, A. *et al.* Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: Synthesis and photo-physical properties. *Tetrahedron* **69**(47), 10116–10122 (2013).
- Heugebaert, T. S., Roman, B. I. & Stevens, C. V. Synthesis of isoindoles and related iso-condensed heteroaromatic pyrroles. *Chem. Soc. Rev.* **41**(17), 5626–5640 (2012).
- Encinar, J. A. & Menendez, J. A. Potential drugs targeting early innate immune evasion of SARS-coronavirus 2 via 2'-O-methylation of viral RNA. *Viruses* **12**(5), 525 (2020).
- Romeo, A., Iacovelli, F. & Falconi, M. Targeting the SARS-CoV-2 spike glycoprotein prefusion conformation: Virtual screening and molecular dynamics simulations applied to the identification of potential fusion inhibitors. *Virus Res.* **286**, 198068 (2020).
- Araujo, D. B. *et al.* SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **115**, e200342 (2020).
- Corman, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surv.* **25**(3), 200045 (2020).
- Drosten, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**(20), 1967–1976 (2003).
- Sales-Medina, D. F. *et al.* Discovery of clinically approved drugs capable of inhibiting SARS-CoV-2 in vitro infection using a phenotypic screening strategy and network-analysis to predict their potential to treat covid-19. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.09.196337> (2020).
- Teodoro, G. R. *et al.* PHTALOX[®] antimicrobial action and cytotoxicity: In vitro study. *J. Dent. Res.* **99**, 0839 (2020).
- Rees, E. M. *et al.* COVID-19 length of hospital stay: A systematic review and data synthesis. *BMC Med.* **18**(1), 270 (2020).
- Silveira, M. A. D. *et al.* Efficacy of propolis as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.08.20248932> (2021).
- Håkansson, A. P., Orihuela, C. J. & Bogaert, D. Bacterial-host interactions: Physiology and pathophysiology of respiratory infection. *Physiol. Rev.* **98**(2), 781–811 (2018).
- Satomura, K. *et al.* Prevention of upper respiratory tract infections by gargling: A randomized trial. *Am. J. Prev. Med.* **29**(4), 302–307 (2005).

33. Nagatake, T., Ahmed, K. & Oishi, K. Prevention of respiratory infections by povidone-iodine gargle. *Dermatology* **204**(Suppl 1), 32–36 (2002).
34. Liu, Y. *et al.* Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **20**(6), 656–657 (2020).
35. de Toledo, T.-A., Caminha, R. D. G., Kallis, M. S., Sipahi, A. M. & da Silva Santos, P. S. Potential mouth rinses and nasal sprays that reduce SARS-CoV-2 viral load: What we know so far?. *Clinics* **75**, e2328 (2020).
36. Kawachi, K. *et al.* An anionic phthalocyanine decreases NRAS expression by breaking down its RNA G-quadruplex. *Nat. Commun.* **9**(1), 2271 (2018).
37. Sun, S., Jiang, N. & Xia, D. Density functional theory study of the oxygen reduction reaction on metalloporphyrins and metallophthalocyanines. *J. Phys. Chem.* **115**(19), 9511–9517 (2011).
38. Gadotti, A. C. *et al.* Susceptibility of the patients infected with Sars-Cov2 to oxidative stress and possible interplay with severity of the disease. *Free Radic. Biol. Med.* **165**, 184–190 (2021).
39. Thai, P. Q. *et al.* Factors associated with the duration of hospitalisation among COVID-19 patients in Vietnam: A survival analysis. *Epidemiol. Infect.* **148**, e114 (2020).

Author contributions

Manuscript concept and drafting: P.S.S.S., B.F.O., F.V.V., K.A. and E.L.D.; model development: P.S.S.S., B.F.O., R.R.G.M., F.V.V., L.M.C.A., S.H.T., L.F., K.A. and E.L.D.; data collected: B.F.O., R.R.G.M., L.M.C.A., E.C.I.N.P., J.P.G.K., I.A.A.B., D.B.B.; data analysis: M.S.R.Z., M.Q.S.S. and A.N.C.S.; critical revision of manuscript for important intellectual content: P.S.S.S., B.F.O., M.S.R.Z., R.C.O., M.Q.S.S., A.N.C.S., K.A. and E.L.D. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Funding This research was funded primarily by TRIALS – Oral Health & Technologies and Golden Technology Corp. Funders contributed to the scope and design of this study; however, they did not influence the collation, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Finance Code 001). Dr. Araki reports grants from CNPq 401581/2016–0, grants from FAPESP 18/21489–1, during the conduct of the study; in addition, Dr. Araki has a patent null pending. Dr. Da Silva Santos reports from CNPq process nº. 309525/2018–7.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99013-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.S.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

DECLARAÇÃO

Conflitos de interesse

A pesquisa recebeu doação dos antissépticos bucais contendo derivado de ftalocianina, bem como, suporte para a impressão dos termos de responsabilidade pela empresa TRIALS – Oral Health & Technologies. Não há potenciais conflitos de interesses concorrentes dos autores, exceto de Fabiano Vieira Vilhena. Os outros autores são pesquisadores das suas respectivas universidades.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, Veen Wv, Bruggen M, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020; 75(7): 1564 – 1581. Available from: [10.1111/all.14364](https://doi.org/10.1111/all.14364)
2. Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, et al. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses with β -Cyclodextrin Combined with Citrox in Preventing Infection and Progression. *J Clin Med*. 2020; 9(4): 1-8. Available from: [10.3390/jcm9041126](https://doi.org/10.3390/jcm9041126)
3. To KK, Tsang OT, Leung W, Tam AR, Wu T, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20(5): 565-574. Available from: [10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
4. Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int J Oral Sci*. 2020; 12(1): 1-6. Available from: [10.1038/s41368-020-0075-9](https://doi.org/10.1038/s41368-020-0075-9)
5. Zhang L, Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. *J Med Virol*. 2020; 92(5): 479–490. Available from: [10.1002/jmv.25707](https://doi.org/10.1002/jmv.25707)
6. Hussain A, Kaler J, Tabrez E, Tabrez S, Tabrez SSM. Novel COVID-19: a comprehensive review of transmission, manifestation, and pathogenesis. *Cureus*. 2020; 12(5): e8184. Available from: [10.7759/cureus.8184](https://doi.org/10.7759/cureus.8184)
7. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), *Manejo Clínico da Covid-19*. 2020. Available from: <https://www.paho.org/pt/taxonomy/term/13> [Accessed 01th October 2020].
8. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*. 2020; 215: 108427. Available from: [10.1016/j.clim.2020.108427](https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108427)
9. Coulthard P. Dentistry and coronavirus (COVID-19) – moral decision-making. *Br Dent J*. 2020; 228(7): 503-505. Available from: [10.1038/s41415-020-1482-1](https://doi.org/10.1038/s41415-020-1482-1)
10. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020; 383(13): 1283-1286. Available from: [10.1056/NEJMc2016359](https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359)

11. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analyzing clinical samples. *Anal Bioanal Chem.* 406(26): 6471 – 83. Available from: [10.1007/s00216-014-7857-x](https://doi.org/10.1007/s00216-014-7857-x)
12. World Health Organization (WHO), *Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases.* 2020. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> [Accessed 01th October 2020].
13. National Health Commission of the People’s Republic of China website. *Diagnosis and treatment of novel coronavirus pneumonia (trial version sixth).* 2020. Available from: <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml> [Accessed 01th October 2020].
14. Winichakoon P, Chaiwarith R, Liwsrisakun C, Salee P, Goonna A, Limsukon A, et al. Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swab Does Not Rule Out COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(5): e00297-20. Available from: [10.1128/JCM.00297-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00297-20)
15. Wu J, Liu J, Zhao X, Liu C, Wang W, Wang D, et al. Clinical Characteristics of Imported Cases of COVID-19 in Jiangsu Province: A Multicenter Descriptive Study. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15):706-712. Available from: [10.1093/cid/ciaa199](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199)
16. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15):793-798. Available from: [10.1093/cid/ciaa345](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345)
17. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184 (8): 957–963. Available from: [10.1164/rccm.201104-0655OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655OC)
18. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet.* 2014; 384 (9944): 691–702. Available from: [10.1016/S0140-6736\(14\)61136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61136-3)
19. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJJ. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 85. Available from: [10.3389/fcimb.2014.00085](https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00085)
20. Piters WAAS, Sanders EAM, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1675): 20140294. Available from: [10.1098/rstb.2014.0294](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0294).

21. Koppen IJN, Bosch AATM, Sanders EAM, Van Houten MA, Bogaert D. The respiratory microbiota during health and disease: a paediatric perspective. *Pneumonia (Nathan)*. 2015; 6: 90-100. Available from: [10.15172/pneu.2015.6/656](https://doi.org/10.15172/pneu.2015.6/656)
22. Rogers GB, Wesselingh S. Precision respiratory medicine and the microbiome. *Lancet Respir Med*. 2016; 4(1): 73–82. Available from: [10.1016/S2213-2600\(15\)00476-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00476-2)
23. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(15): 762 – 768. Available from: [10.1093/cid/ciaa248](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248)
24. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y, et al. Immune phenotyping based on neutrophil- tolymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *Front Mol Biosci*. 2020; 7: 157. Available from: [10.3389/fmolb.2020.00157](https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00157)
25. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang Y, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5(1):33. Available from: [10.1038/s41392-020-0148-4](https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4)
26. Flores-Torres AS, Salinas-Carmona MC, Salinas E, Rosas-Taraco AG. Eosinophils and respiratory viruses. *Viral Immunol*. 2019; 32 (5):198-207. Available from: [10.1089/vim.2018.0150](https://doi.org/10.1089/vim.2018.0150)
27. Jesenak M, Schwarze J. Lung eosinophils - A novel "virus sink" that is defective in asthma? *Allergy*. 2019; 74 (10): 1832-1834. Available from: [10.1111/all.13811](https://doi.org/10.1111/all.13811)
28. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308 (5728): 1635–1638. Available from: [10.1126/science.1110591](https://doi.org/10.1126/science.1110591)
29. Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(6): G1469–G1473. Available from: [10.1152/ajpgi.00531.2006](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00531.2006)
30. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004; 118(2): 229–241. Available from: [10.1016/j.cell.2004.07.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002)
31. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MAE, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host–microbiota mutualism. *Science*. 2009; 325 (5940): 617–620. Available from: [10.1126/science.1172747](https://doi.org/10.1126/science.1172747)

32. Meng L, Hua F, Bian Z. Coronavirus disease 2019 (COVID- 19): emerging and future challenges for dental and oral medicine. *J Dent Res*. 2020; 99(5): 481-487. Available from: [10.1177/0022034520914246](https://doi.org/10.1177/0022034520914246)
33. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020; 12 (1): 8. Available from: [10.1038/s41368-020-0074-x](https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x)
34. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020; 367 (6485): 1444–1448. Available from: [10.1126/science.abb2762](https://doi.org/10.1126/science.abb2762)
35. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021; 2(1):e13-e22. Available from: [10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5).
36. Liu Y, Yan L, Wan L, Xiagn T, Le A, Liu J, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20(6): 656 – 657. Available from: [10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2)
37. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020; 73(11): E4197-E4205. Available from: [10.1093/cid/ciaa851](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa851)
38. Burton MJ, Clarkson JE, Goulao B, Glenny A, McBain AJ, Schilder AG, et al. Use of antimicrobial mouthwashes (gargling) and nasal sprays by healthcare workers to protect them when treating patients with suspected or confirmed COVID-19 infection. *Cochrane database syst rev*. 2020; 9(9): CD013626. Available from: [10.1002/14651858.CD013626.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD013626.pub2)
39. Kusahara DM, Peterlini MA, Pedreira ML. Oral care with 0.12% chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: randomised, controlled and double blind trial. *Int J Nurs Stud*. 49(11), 1354-63 (2012). doi: [10.1016/j.ijnurstu.2012.06.005](https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2012.06.005). Epub 2012 Jul 7. PMID: 22771160.
40. Tsuda S, Soutome S, Hayashida S *et al*. Topical povidone iodine inhibits bacterial growth in the oral cavity of patients on mechanical ventilation: a randomized controlled study. *BMC Oral Health*. 20(1), 62 (2020). doi: [10.1186/s12903-020-1043-7](https://doi.org/10.1186/s12903-020-1043-7). PMID: 32093667; PMCID: PMC7041202.

41. Satomura K, Kitamura T, Kawamura T *et al.* Prevention of upper respiratory tract infections by gargling: a randomized trial. *Am J Prev Med.* 29(4), 302-7 (2005). doi: 10.1016/j.amepre.2005.06.013. PMID: 16242593.
42. Nagatake T, Ahmed K, Oishi K. Prevention of Respiratory Infections by Povidone-Iodine Gargle. *Dermatology.* 2002; 204(suppl 1):32–36. Available from: [10.1159/000057722](https://doi.org/10.1159/000057722)
43. Gottsauner MJ, Michaelides I, Schmidt B, Scholz KJ, Buchalla W, Widbiller M, et al. A prospective clinical pilot study on the effects of a hydrogen peroxide mouthrinse on the intraoral viral load of SARS-CoV-2. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(10) 3707 – 3713. Available from: [10.1007/s00784-020-03549-1](https://doi.org/10.1007/s00784-020-03549-1)
44. Kariwa H, Fujii N, Takashima I. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. *Dermatology.* 2006; 212 (1): 119-23. Available from: [10.1159/000089211](https://doi.org/10.1159/000089211)
45. Eggers M, Eickmann M, Zorn J. Rapid and effective virucidal activity of povidone-iodine products against Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) and modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). *Infect Dis Ther.* 2015; 4(4): 491-501. Available from: [10.1007/s40121-015-0091-9](https://doi.org/10.1007/s40121-015-0091-9)
46. Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials (Basel);* 2020; 10 (1): 140. Available from: [10.3390/nano10010140](https://doi.org/10.3390/nano10010140)
47. Yoon JG, Yoon J, Song JY, Yoon SY, Lim CS, Seong H, et al. Clinical significance of a high Sars – CoV – 2 viral load in the saliva. *J Korean Med Sci.* 2020; 25 (20): e195. Available from: [10.3346/jkms.2020.35.e195](https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e195)
48. SANTOS, C. et al. Antibiofilm Action of PHTALOX®-containing Oral Care Formulations, *J Dent Res* 99(Spec Iss A): abstract number, 3326, 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA).
49. TEODORO, G. et al. PHTALOX® Antimicrobial Action and Cytotoxicity: in vitro Study, *J Dent Res* 99(Spec Iss A): abstract number, 0839, 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA).
50. Encinar JA, Menendez JA. Potential Drugs Targeting Early Innate Immune Evasion of SARS-Coronavirus 2 via 2'-O-Methylation of Viral RNA. *Viruses.* 2020; 12(5): 525. Available from: [10.3390/v12050525](https://doi.org/10.3390/v12050525)

51. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163 (1): 1-12. Available from: [10.1016/j.micres.2007.08.001](https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001)
52. Nikolaeva-Glomb L, Mukova L, Nikolova N, Kussovski V, Doumanova L, Mantareva V, et al. Photodynamic Effect of some Phthalocyanines on Enveloped and Naked Viruses. *Acta Virol.* 2017; 61(3) 341-346. Available from: [10.4149/av_2017_313](https://doi.org/10.4149/av_2017_313)
53. Remichkova M, Mukova L, Nikolaeva-Glomb L, Nikolova N, Doumanova L, Mantareva V, et al. Virus inactivation under the photodynamic effect of phthalocyanine zinc (II) complexes. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2017; 72(3-4): 123-128. Available from: [10.1515/znc-2016-0119](https://doi.org/10.1515/znc-2016-0119)
54. Korneev D, Kurskaya O, Sharshov K, Eastwood J, Strakhovskaya M. Ultrastructural Aspects of Photodynamic Inactivation of Highly Pathogenic Avian H5N8 Influenza Virus. *Viruses.* 2019; 11(10): 955. Available from: [10.3390/v11100955](https://doi.org/10.3390/v11100955)
55. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 1995; 24:19-33.
56. Sharman WM, Allen CM, Van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999; 4(11): 507-517. Available from: [10.1016/s1359-6446\(99\)01412-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(99)01412-9)
57. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21(3): 293-302. Available from: [10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x)
58. Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: potencial platforms for anticancer photodynamic therapy. *Braz Med Chem Res.* 2011; 44(8): 729-737. Available from: [10.1590/s0100-879x2011007500091](https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500091)
59. Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1991; 54 (6): 1093-1107. Available from: [10.1111/j.1751-1097.1991.tb02133.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02133.x)
60. Marques ADS, Takahata Y, Junior JRL, Souza MC, Simoes SS, Azevedo WM, et al. The species of 8-methoxy-psoralen in hydrophobic and hydrophilic environments and its solubilization in neutral and charged micelles. *J Luminesc.* 2002; 97(3-4): 237-249. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(02\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(02)00230-2)
61. Ribeiro JBP, Miranda-Vilela AL, Amorim AAS, Garcia RD, Moreira JR, Gomes CM, et al. Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (Sb^V) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice.

Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 26: 261-269. Available from: [10.1016/j.pdpdt.2019.04.004](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.004)

62. Santos C, da Fonseca Orcina B, Brito Reia VC, et al. Virucidal Activity of the Antiseptic Mouthwash and Dental Gel Containing Anionic Phthalocyanine Derivative: In vitro Study. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2021; 13:269-74. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S315419>.
63. Vilhena FV, Brito Reia VC, da Fonseca Orcina B, et al. The use of antiviral Phthalocyanine mouthwash as a preventive measure against COVID-19. *GMS Hyg Infect Control.* 2021; 16:Doc24. <https://doi.org/10.3205/dgkh000395>.
64. Orcina BF, Reia VCB, Santos CA, Peres MH, Vilhena FV, da Silva Santos PS. Antibacterial and antifungal activity of intraoral products containing phthalocyanine: in vitro study. *Res Sq [Preprint]*. 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1097185/v1>.
65. da Fonseca Orcina B, Vilhena FV, Cardoso de Oliveira R, et al. A phthalocyanine derivate mouthwash to gargling/rinsing as an option to reduce clinical symptoms of COVID-19: Case series. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* 2021; 13:47-50. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S295423>.
66. Orcina BF, Santos PSS. Oral manifestation COVID-19 and the rapid resolution of symptoms post-phthalox treatment: A case series. *Int. J. Odontostomat.* 2021;15(1):67-70.
67. Vilhena FV, Orcina BDF, Lemos L, Less JCF, Pinto I, da Silva Santos PS. Elimination of SARS-CoV-2 in nasopharynx and oropharynx after use of an adjuvant gargling and rinsing protocol with an antiseptic mouthwash. *Einstein (São Paulo)*. 2022;19:eCE6999. doi: https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021CE6999.

APÊNDICE

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

A cavidade oral está diretamente associada ao processo evolutivo do SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, na inalação de partículas ambientais no ar e nas expectorações, isto porque pode também ser transmitido pela saliva. O gargarejo pode ajudar a prevenir e tratar infecções respiratórias superiores e inferiores. Também, sabe-se que o SARS-CoV-2 é vulnerável à oxidação, sendo recomendável usar um antisséptico bucal contendo agentes oxidantes, para reduzir a carga viral da microbiota oral.

O enxaguatório utilizado nessa pesquisa contém ftalocianina que é uma substância extensamente utilizada na Medicina e na Odontologia há décadas. Sua aplicação possui uma gama de indicações para tratamento, dentre elas a redução de doenças virais.

Sendo assim, conforme relatado, o produto é seguro, até mesmo porque já é comercializado em cremes dentais e outros cosméticos no mundo. No Brasil, um exemplo de produto de higiene oral que contém a ftalocianina, é aquele contido na linha Close-up White Now de creme dental da empresa UNILEVER.

Você, que foi infectado pelo coronavírus e é atendido no Hospital Estadual de Bauru (HEB), está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação da eficácia de um antisséptico oral na melhora do quadro clínico, diminuição de carga viral e sua substantividade em portadores de SARS-CoV-2”** que tem por objetivo avaliar a eficácia de antissépticos bucais na redução de quantidade de vírus na boca e garganta, melhora do da sua condição de saúde geral e sua ação de efeito residual na redução de vírus em pacientes positivos de SARS-CoV-2 assistidos pelo Hospital Estadual de Bauru, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos.

O senhor (a) receberá uma solução escolhida aleatoriamente oferecida a você. Uma das soluções conterà a solução de estudo, a Ftalocianina, e a outra será placebo (sem a substância do estudo). Com esse desenho de pesquisa, metade dos pacientes receberá soluções contendo Ftalocianina (grupo experimental) e outra metade não conterà esse princípio ativo (grupo controle). A utilização de um grupo controle visa minimizar o efeito de algumas variáveis, assim como ter uma base de comparação com o efeito do grupo experimental. Estando com uma delas, você deverá realizar bochecho/gargarejo, por um minuto, pelo menos de 4 a 5 vezes ao dia, de manhã, após o café da manhã, após o almoço, após o jantar, e antes de dormir. Será fornecido um kit de escova e creme dental a base de Ftalocianina, que você deverá utilizar somente ele como creme dental. Pela manhã, em três dias, em um total de seis dias,

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa :

solicitaremos para você cuspir em um pote plástico sua saliva antes e em três horários diferentes (1h, 2h e 4h) após o bochecho e gargarejo, num volume total de 12ml. Durante estes seis dias aplicaremos um pequeno questionário para saber se você está conseguindo usar os produtos para bochechos e o creme dental. Qualquer dificuldade para uso dos produtos, suspenderemos a pesquisa.

Esta pesquisa não lhe custará nenhum gasto adicional. A não concordância em participar desta pesquisa não acarretará nenhum prejuízo ao seu atendimento hospitalar.

Na avaliação odontológica, serão coletados e armazenados no total do período da pesquisa, 12 ml de sua saliva que servirá de amostra para análise da carga viral presente na mesma. A amostra de sua saliva será armazenada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. O armazenamento dessas amostras obedecerá aos requisitos estabelecidos na Resolução CNS Nº 441 de 12 de maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde, para o armazenamento de material biológico humano. A avaliação odontológica completa desta pesquisa contará com o tempo necessário para a produção de saliva pelo paciente e coleta do volume almejado pelo pesquisador.

A amostra de sua saliva e os resultados provenientes dela serão utilizados apenas para as finalidades descritas no protocolo de pesquisa e no presente termo de consentimento livre e esclarecido. Após a conclusão do estudo, as amostras serão armazenadas por até 10 anos, pois poderão ser usadas em estudos futuros. Após este período as amostras serão desprezadas.

Caso o senhor (a) permita que nós utilizemos a sua saliva em pesquisas futuras que venham a beneficiar os pacientes acometidos com o SARS-CoV-2 (coronavírus), por favor assinale abaixo umas das opções:

-Concordo com o uso da minha saliva para a realização de pesquisas futuras. ()

-Disponibilizo o uso da minha saliva somente para a presente pesquisa. ()

Caso haja o descobrimento de alguma alteração com o seu material biológico coletado, se o senhor(a) permitir, entraremos em contato para que as devidas explicações sejam feitas, assim como a nossa conduta odontológica em relação a estas alterações, conforme a Resolução CNS nº 441 de 2011.

Iremos solicitar do Hospital, o qual o senhor(a) realiza os cuidados para os efeitos da infecção de SARS-CoV-2, informações como os resultados de exames de sangue,

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa :

medicamentos utilizados, tempo de diagnóstico da COVID-19, tempo e tipo de tratamento realizado e dos dados referentes a terapia do SARS-CoV-2.

A participação nessa pesquisa é totalmente voluntária e o Sr.(a) poderá recusar-se a participar ou desistir da pesquisa em qualquer momento do exame, sem prejuízos a nenhuma parte envolvida. Não haverá benefício financeiro aos participantes da pesquisa. Após aceitar a participação nesta pesquisa, você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Diante de algum dano causado ao paciente oriundo da pesquisa, o paciente terá a garantia de indenização (Lei 466/12, Item IV3, “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g”, “h”).

O participante da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes, conforme a Resolução CNS nº 441 de 2011.

Os riscos dessa pesquisa são o possível constrangimento no momento da coleta da amostra, cansaço e desconforto pelo bochecho/gargarejo os quais você poderá se reportar ao pesquisador sobre as dificuldades para adequarmos e/ou observarmos as alterações na execução da metodologia proposta. Os benefícios desta pesquisa incluem o recebimento de um kit de higiene bucal (escova, dentífrico e fio dental), além de uma possível redução da carga viral em orofaringe ocasionando melhora clínica dos pacientes, contribuindo de maneira exponencial na melhora daqueles acometidos pelo vírus na pandemia.

Em caso de dúvidas sobre sua participação e os benefícios que esta pesquisa implicará, o (a) senhor (a) poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis no endereço: Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brizolla 9-75 – Bauru SP, pelo telefone (14) 3226-6113 ou e-mail: paulosss@usp.br ; bernardoforcina@usp.br. Para denúncias e reclamações entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa FOB-USP, Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brizolla 9-75 – Bauru SP ou pelo telefone (14) 3235-8356, e-mail: cep@fob.usp.br, quando pertinente.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e

Rubrica do Participante da Pesquisa :

Rubrica do Pesquisador Responsável:

procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3, e IV.4, este último se pertinente, item IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____

Assinatura do Participante da Pesquisa

Nome/Assinatura do Pesquisador(a)
Responsável

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **14hs às 17 horas**, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX(14)3235-8356

e-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO

ANEXO I - QUESTIONÁRIO ENXAGUATÓRIO

1. O bochecho com a solução entregue pelo pesquisador foi possível e tolerável?
2. Quanto tempo conseguiu manter a solução na boca durante o bochecho?
3. Em algum momento este bochecho tornou-se impossível?
4. A solução usada no bochecho apresenta gosto doce ou amargo?
5. Houve ardência durante o bochecho da solução?
6. Houve ressecamento da boca após bochecho com a solução?
7. Houve algum desconforto após bochecho com a solução?

ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP)

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM ANTISSÉPTICO ORAL NA MELHORA DO QUADRO CLÍNICO, DIMINUIÇÃO DE CARGA VIRAL E SUA SUBSTANTIVIDADE EM PORTADORES DE SARS-COV-2.

Pesquisador: PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34070620.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: FABIANO VIEIRA VILHENA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.212.624

Apresentação do Projeto:

Este estudo clínico irá avaliar a ação de um antisséptico bucal contendo ftalocianina, a relação com a carga viral e sua substantividade, além do performance status do indivíduo acometido pela COVID-19 leve e moderada. A pesquisa será aplicada aleatoriamente em 40 pacientes que estarão divididos em 2 grupos: antisséptico com ativo, antisséptico sem ativo, ambos com creme dental com ativo. As amostras de saliva serão coletadas no primeiro, segundo e quinto dia da pesquisa. Ao acordar o paciente deverá produzir 1ml de saliva e coletá-la em um tubo específico; realizar o procedimento estabelecido de cada grupo e após 1h, 2h e 4h produzir separadamente mais 1 ml de saliva nos dias 0, 2 e 5. As amostras serão processadas no laboratório de Farmacologia da FOB (credenciado para testes de COVID) para a análise de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) e armazenadas em biorepositório, após devido consentimento do participante.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia de antissépticos bucais na redução de carga viral em orofaringe em pacientes positivos de SARS-CoV-2 clinicamente os casos leves e moderados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 4.212.624

Para o pesquisador: a possibilidade de contaminação com o SARS-CoV-2.

Para os participantes: o possível constrangimento no momento da coleta da amostra, cansaço e desconforto pelo bochecho/gargarejo.

Como benefícios ao participante, o recebimento de um kit de higiene bucal (escova, dentífrico e fio dental), além de uma possível redução da carga viral em orofaringe ocasionando melhora clínica, contribuindo de maneira exponencial na melhora daqueles acometidos pelo vírus na pandemia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de versão 3 para correção de pendências e solicitação de alteração no Processo de Consentimento. Todas as solicitações foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados.

Recomendações:

Recomenda-se que o processo de consentimento seja feito verbalmente e o TCLE assinado após a liberação do participante, em um momento posterior ao período de risco de contaminação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado sem pendências de ordem ética.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO ad referendum deste CEP, devido à pandemia da COVID-19 e por orientações da CONEP, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	10/08/2020		Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 4.212.624

Básicas do Projeto	ETO_1575834.pdf	15:49:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_Ago.docx	10/08/2020 15:40:11	PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS	Aceito
Outros	Emenda_1.pdf	10/08/2020 15:05:58	PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ago_2020.pdf	10/08/2020 15:03:00	PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulamento_biorepositorio.doc	02/07/2020 12:20:43	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	Termo_trials.pdf	02/07/2020 12:17:41	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	Termo_heb_timbrado.pdf	02/07/2020 12:16:43	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	Oficio_pendencias.pdf	02/07/2020 12:03:42	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorepositorio.doc	02/07/2020 11:43:08	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	Check_listCEP_2019.pdf	24/06/2020 18:11:53	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	AQUIESCENCIA_Estomato.pdf	24/06/2020 18:11:10	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Outros	termo_de_aquiescencia_lab_farmaco.pdf	24/06/2020 18:08:28	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoCompromissoPesquisadorRe sultadosPesquisa.pdf	24/06/2020 18:07:03	Bernardo da Fonseca Orcina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 13 de Agosto de 2020

Assinado por:

Juliana Fraga Soares Bombonatti
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 4.212.624

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO III – AUTORIZAÇÃO INTERNATIONAL ARCHIVES OF OTORHINOLARYNGOLOGY



iaorl@iaorl.org
para mim

seg., 8 de ago. 11:50 (há 8 dias) ☆ ↶ ⋮

🌐 Detectar idioma > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr. Orcina,

Thank you for contacting IAO editorial office.

This journal is open access and published under the Creative Commons license CC BY-NC-ND (Attribution-NonCommercial-NoDerivatives).
License link: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/br/deed.en>

Please feel free to contact me if you have questions or need further assistance.

Sincerely,

Adilson Montefusco, MSc.

Editorial Office Manager

International Archives of Otorhinolaryngology

iaorl@iaorl.org

www.thieme.com/iao

www.internationalarchivesent.org

ANEXO IV – AUTORIZAÇÃO SCIENTIFIC REPORTS

A

Aditi Choksey
para mim ▾

08:15 (há 6 horas) ☆ ↶ ⋮

🌐 Detectar idioma ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr. Bernardo Orcina

Thank you for your mail and please accept my apologies for the delay in responding to you.

As this is your own publication, you do not need any permission to use this work in your master's thesis. Articles are published under a CC BY license (Creative Commons Attribution 4.0 International License). The CC BY license allows for maximum dissemination and re-use of open access materials and is preferred by many research funding bodies. Under this license, users are free to share (copy, distribute and transmit) and remix (adapt) the contribution including for commercial purposes, providing they attribute the contribution in the manner specified by the author or licensor (read full legal code).

<https://www.nature.com/srep/journal-policies/editorial-policies>

Hoping to have been of assistance.

Sincerely,

Aditi Choksey
Editorial Support at [Scientific Reports](#)On Mon, 8 Aug at 2:07 PM , Bernardo da Fonseca Orcina <bernardoforcina@usp.br> wrote:**[External - Use Caution]**
