



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUIZA MARA VENÂNCIO

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE  
UM ANTISSÉPTICO BUCAL E SPRAY NASAL NA  
DIMINUIÇÃO DA CARGA VIRAL EM PORTADORES DE  
SARS-COV-2**

---

Londrina  
2022

LUIZA MARA VENÂNCIO

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE  
UM ANTISSÉPTICO BUCAL E SPRAY NASAL NA  
DIMINUIÇÃO DA CARGA VIRAL EM PORTADORES DE  
SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni.

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão.

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

VENÂNCIO, LUIZA MARA .

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE UM ANTISSEPTICO BUCAL E SPRAY NASAL NA DIMINUIÇÃO DA CARGA VIRAL EM PORTADORES DE SARS-COV-2 / LUIZA MARA VENÂNCIO. - Londrina, 2022.  
84 f.

Orientador: Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Phtalox® - Tese. 2. ANTISSEPTICO BUCAL E SPRAY NASAL - Tese. 3. CARGA VIRAL - Tese. 4. SARS-COV-2 - Tese. I. Alesandra Stingham Garcia Lonni, Audrey . II. Name Colado Simão, Andréa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

LUIZA MARA VENÂNCIO

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE  
UM ANTISSEPTICO BUCAL E SPRAY NASAL NA  
DIMINUIÇÃO DA CARGA VIRAL EM PORTADORES DE  
SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Audrey Alesandra  
Stinghen Garcia Lonni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de outubro de 2022.

## Dedicatória

Dedico esta dissertação a meu amado filho  
Evandro Mansur de Oliveira Filho.

## **AGRADECIMENTOS**

Uma dissertação é a construção do conhecimento, fruto do esforço de muitos pesquisadores que fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço imensamente a minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Audrey Lonni, primeiramente por ter me aceitado para orientação, pela inspiração, pelo apoio e por sua disposição. Minha gratidão não só se estende a esse trabalho, mas a tudo que ele me atribuiu para o resto da minha vida.

A minha coorientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Andréa Name Simão pelo apoio e orientação durante este trabalho.

Ao Dr. Fabiano Vilhena, que nos conduziu a essa pesquisa.

Agradeço a Dra. Nicole Perugini Stadtlober, Guilherme Lerner Trigo, Pedro Luis Candido de Souza Cassela, Enfermeira Thais Mastellini Sanches Silva, Enfermeira Maria De Fátima Oliveira Hirth Ruiz, Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy, Dra. Zuleica Naomi Tano, Dr. Bernardo da Fonseca Orcina e ao Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos.

Agradeço a todos que fizeram parte da pesquisa, pois com a ajuda de vocês conseguimos a realização desse trabalho.

Gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Agradeço ao meu filho, Evandro Mansur de Oliveira Filho, minha fonte de amor e inspiração para tudo que eu realizo em minha vida.

À minha mãe, Maria Venâncio, razão de minha força e iluminação da minha vida.

Aos membros da banca que dispuseram parte do seu tempo para contribuir na melhoria deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina por todo suporte e para a conclusão desse mestrado.

A ciência não é uma ilusão, mas seria uma  
ilusão acreditar que poderemos encontrar  
noutro lugar o que ela não nos pode dar.  
Sigmund Freud

## RESUMO

VENÂNCIO, Luiza Mara. **Avaliação clínica da eficácia da associação de um antisséptico bucal e spray nasal na diminuição da carga viral em portadores de SARS-CoV-2.** 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

O novo coronavírus, o SARS-CoV-2, causador do Covid-19 trouxe ao mundo uma pandemia, e levou a adoção de medidas sem precedentes em nível global. Sabe-se que 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. A detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é crucial no controle do surto na comunidade e nos hospitais, sendo que as amostras preconizadas para o diagnóstico são coletadas nas regiões nasofaríngeas e orofaríngeas. A contaminação pela boca e nariz podem ser evitadas com medidas simples de prevenção, sendo a manutenção da higiene bucal e nasal uma importante forma preventiva. Assim, o antisséptico bucal e solução nasal apresentam papel fundamental à prevenção de infecções respiratórias superiores e inferiores. Uma nova substância, patenteada de Phtalox® a base de ftalocianina, demonstrou redução da carga viral (CV) de SARS-CoV-2 e não apresenta efeitos tóxicos e carcinogênicos. Diante do exposto o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia clínica do antisséptico bucal utilizado individualmente ou em associação com o *spray* nasal, contendo Phtalox® na CV em pacientes portadores de SARS-CoV-2. Foi realizado um estudo longitudinal, prospectivo, triplo-cego randomizado, em que foram selecionados 125 pacientes diagnosticados com COVID-19, atendidos pelo setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, dos quais 75 pacientes participaram do estudo. Foram subdivididos em 3 grupos: G1 (n=25): uso de antisséptico bucal contendo placebo e *spray* nasal placebo; G2 (n=25): uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e *spray* nasal placebo; G3 (n=25): uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e *spray* nasal contendo Phtalox®. A detecção do SARS-CoV2 foi realizada por reação em cadeia polimerase com transcriptase reversa (qPCR) em amostras de naso-orofaringe dos pacientes com Covid-19, cujo resultado foi expresso em número de ciclos (CT) necessários para iniciar a detecção do material genético amplificado (ORF1ab, N e S), sendo que quanto maior o CT menor a CV do paciente. Foi considerada CV alta com valores de CT <25, intermediária com CT 25-30 e baixa com CT >30. Foram realizadas 3 avaliações, sendo, antes do início do estudo (D0 – dia zero), após 24 h (D1) e após 72 h (D3) do início do estudo. Após 72 horas, a redução na CV foi significativamente maior no G3 com diminuição do CT (-11,21) em comparação ao G1, que mostrou diminuição média do CT (-5,53). Além disso, apenas a CV média no G3 foi reduzida a um nível não contagioso após 72 horas. Desta forma, este estudo sugere que o uso do antisséptico bucal e *spray* em associação, contendo Phtalox®, foi eficaz em reduzir a infectividade por SARS-CoV-2 para níveis baixos ou não contagiosos após 3 dias de uso.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; COVID-19; Phtalox®; ftalocianina; antisséptico bucal; *spray* nasal.

## ABSTRACT

VENÂNCIO, Luiza Mara. **Clinical evaluation of the effectiveness of the association of an oral antiseptic and nasal spray in reducing the viral load in SARS-CoV-2 patients.** 2022. 80 p. Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) - Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences - State University of Londrina, Londrina, 2022.

The new coronavirus, SARS-CoV-2, which causes Covid-19, brought a pandemic to the world, and led to the adoption of unprecedented measures at a global level. It is known that the oral cavity is directly associated with the evolutionary process of sars-cov-2 in the inhalation of environmental particles in the air and in sputum, because it can also be transmitted through saliva. The rapid and accurate detection of SARS-CoV-2, is crucial in controlling the outbreak in the community and in hospitals, and the samples recommended for diagnosis are collected in the nasopharyngeal and oropharyngeal regions. Contamination through the mouth and nose can be avoided with simple preventive measures, and maintaining oral and nasal hygiene is an important preventive way. Thus, mouthwash and nasal solution play a key role in preventing upper and lower respiratory infections. A new substance, patented Phtalox® based on phthalocyanine, has been shown to reduce the viral load (VL) of SARS-CoV-2 and has no toxic and carcinogenic effects. In view of the above, the present study aimed to evaluate the clinical efficacy of mouthwash, used individually or in association with nasal spray, containing Phtalox® in VL patients with SARS-CoV-2. A longitudinal, prospective, randomized triple-blind study was carried out, in which 125 patients diagnosed with Covid-19 were selected, attended by the Infectious Diseases sector of the University Hospital of the State University of Londrina, of which 75 patients participated in the study. They were subdivided into 3 groups: G1 (n=25): use of mouthwash containing placebo and placebo nasal spray; G2 (n=25): use of mouthwash containing Phtalox® and placebo nasal spray; G3 (n=25): use of mouthwash containing Phtalox® and nasal spray containing Phtalox®. The detection of SARS-CoV2 was performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (qPCR) in naso-oropharyngeal samples from patients with Covid-19, whose result was expressed in number of cycles (CT) required to start detection of the material. amplified gene (ORF1ab, N and S), and the higher the CT, the lower the patient's VL. High VL was considered with values of TC <25, intermediate with TC 25-30 and low with TC <30. Three evaluations were performed, being, before the beginning of the study (D0 – day zero), after 24 h (D1) and after 72 h (D3) of the beginning of the study. After 72 hours, the reduction in VL was significantly greater in G3 with a decrease in CT (-11.21) compared to G1, which showed a mean decrease in CT (-5.53). Furthermore, only the mean VL in G3 was reduced to a non-contagious level after 72 hours. Thus, this study suggests that the use of mouthwash and nasal spray in association containing Phtalox® was effective in reducing SARS-CoV-2 infectivity to low or non-contagious levels after 3 days of use.

**Key words:** SARS-CoV-2; COVID-19; Phtalox®; phthalocyanine; mouthwash; nasal spray.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação estrutural da molécula de ftalocianina tetracarboxilada de ferro, adaptado de CHAVES et al., 2003 .....23
- Figura 2** - Diagrama de fluxo do CONSORT 2010 .....26
- Figura 3** - Esquema demonstrando a utilização do antisséptico bucal e spray nasal durante os três dias de tratamento .....27
- Figura 4** - Demonstração da coleta de secreção em nasofaringe .....29
- Figura 5** - Carga viral média, estimada pelo valor de CT (valores limiares do ciclo) obtido na reação de RT-PCR, em função dos grupos (G1, G2 e G3) e do tempo.....34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Comparação entre grupos quanto às características dos pacientes.....31
- Tabela 2** - Resultado da carga viral média estimada pelo valor de CT, obtida na reação de qPCR em função do grupo e do tempo .....31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
%	Percentual
°C	Graus Celsius
CT	Limiar médio do ciclo
CV	Carga viral
D0	Dia zero (antes do início do estudo)
D1	Após 24 h do início do estudo
D3	Após 72 h do início do estudo
G	Gramas
G1	Grupo controle que utilizou o antisséptico bucal placebo e spray nasal placebo
G2	Grupo que utilizou o antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal placebo
G3	Grupo antisséptico contendo Phtalox® e spray nasal contendo Phtalox®
HU	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
h	Hora
MI	Enfermaria de Moléstias Infecciosas
MTV	meio de transporte viral
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFU	<i>Plaque forming units</i>
PS	Performance Status
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RT-PCR	Reação em cadeia polimerase com transcriptase reversa
qPCR	PCR em tempo real
s	segundos
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
3.1	SARS-CoV-2 E A CAVIDADE BUCAL .....	17
3.2	SOLUÇÕES TÓPICAS PREVENTIVAS .....	17
3.2.1	Enxaguatórios Bucais .....	18
3.2.2	Solução Nasal .....	21
3.2.3	Insumo Farmacêutico Ativo .....	22
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
4.1	FORMULAÇÃO .....	24
4.2	ENSAIO CLÍNICO .....	24
4.2.1	Delineamento do Estudo .....	25
4.2.2	Critérios de Inclusão e Exclusão .....	28
4.3	COLETA DE MATERIAIS .....	28
4.3.1	Procedimentos para Coleta das Amostras Respiratórias .....	28
4.4	DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 .....	29
4.4.1	Extração de RNA e Realização da qPCR .....	29
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
	<b>ANEXOS</b> .....	43

ANEXO 1 - Laudo da eficácia do composto Phtalox® na inativação do vírus SARS-CoV-2 em culturas de células VERO – CCL81 .....	44
ANEXO 2 - Carta de Aprovação do Hospital Universitário – UEL.....	52
ANEXO 3 - Parecer Consubstanciado do CEP .....	53
<b>APÊNDICE</b> .....	60
Manuscrito enviado para a Revista German Medical Science.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o SARS-CoV-2, vírus da família do coronavírus que, ao infectar humanos, causa uma doença chamada Covid-19. Por ser um microrganismo que até pouco tempo não era transmitido entre humanos, ele ficou conhecido, no início da pandemia, como “novo coronavírus”, e surgiu na província de Hubei, na China, se espalhando rapidamente pelo mundo e causando uma pandemia, o que levou à adoção de medidas sem precedentes em nível global. O modo de transmissão do SARS-CoV-2 é por pessoa a pessoa, como espirros, tosse, transmissão por inalação de pequenas gotículas ou contato com as mucosas nasais, orais e oculares (WHO, 2019; HERRERA *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2021).

Desta forma, 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 (CARROUEL *et al.*, 2020; KAI-WANG-TO *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2020; ZHANG; LIU, 2020; HUANG *et al.*, 2021).

A detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é crucial no controle do surto na comunidade e nos hospitais (COULTHARD, 2020). Os tipos de amostras recomendados são as naso-orofarínge para o diagnóstico molecular 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 (KAI-WANG TO *et al.*, 2020).

No contexto da pandemia global instalada, a precisão da análise da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), pode promover uma melhora no diagnóstico clínico, assim como, monitoramento e prognóstico dos pacientes. Além do mais, a detecção de ácido nucléico viral por qPCR 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 (WHO, 2019; NHC, 2019; WINICHAKOON *et al.* 2020; WU *et al.* 2020).

Entretanto, YU e colaboradores (2020) afirmam que o RT-PCR (Reação em Cadeia Polimerase com Transcriptase Reversa) 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.

Assim, a preocupação da contaminação pela boca, pode ser evitada com medidas de prevenção, sendo a manutenção de boa higiene bucal uma importante ferramenta preventiva. O enxaguante bucal e vários outros líquidos comumente utilizados para gargarejar podem ser antimicrobianos, daí a denominação de antisséptico bucal. Desta forma, o gargarejo pode ajudar a prevenir e tratar infecções respiratórias superiores e inferiores (NAGATAKE, AHMED, OISHI, 2002).

Sabe-se que o SARS-CoV-2 é vulnerável à oxidação, sendo recomendável usar um antisséptico bucal e spray nasal contendo agentes oxidantes, para reduzir a carga viral da microbiota oral e nasal (BURTON *et al.*, 2020, ZHANG; LIU, 2020; CARROUEL, 2020).

Em recente publicação do Instituto Cochrane foi recomendado um protocolo de uso de enxaguatórios bucais antimicrobianos (gargarejos) e sprays nasais pelos profissionais de saúde para protegê-los e no tratamento de pacientes com suspeita ou confirmação de infecção por COVID-19 (BURTON *et al.*, 2020).

Algumas novas gerações de enxaguantes bucais atualmente disponíveis no mercado têm insumos farmacêuticos 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 (CARROUEL *et al.*, 2020; REIA *et al.*, 2021).

Os insumos farmacêuticos inseridos em antissépticos bucais terapêuticos podem apresentar mecanismos de ação que reduzem o crescimento de

bactérias e vírus. Por exemplo a adição de nanopartículas metálicas e óxido metálicas, demonstram uma alternativa promissora na inibição destes agentes, visto o amplo espectro de mecanismos de ação evidenciados, como a produção de espécies reativas de oxigênio (CARROUEL *et al.*, 2020). Outro componente promotor de produção de espécies reativas de oxigênio são as Ftalocianinas e apresentam o potencial inibitório de microrganismos (SANTOS *et al.*, 2020; TEODORO *et al.*, 2020).

A patente Phtalox®, baseada num derivado de ftalocianina, foi desenvolvida por pesquisadores da Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos (SP) e demonstrou alta atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade *in vitro* (TEODORO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021). Diversos estudos conduzidos recentemente corroboraram demonstrando a ação virucida do PHTALOX® contra o SARS CoV-2, uma vez que o ativo atuou na prevenção da infecção e progressão do COVID-19 (SANTOS *et al.*, 2020b; VILHENA *et al.*, 2021; POLETI *et al.*, 2021; ORCINA *et al.*, 2021; ORCINA *et al.*, 2022). Além disso, possui ação higienizadora (remoção química do biofilme oral) (REIA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020a), antitártaro, regenerador tecidual (TEODORO *et al.*, 2020), contra halitose e antiulcerativo (POLETI *et al.*, 2021). Uma das características presentes no PHTALOX® que corroboram com sua atividade antimicrobiana está relacionada com promover a produção contínua de espécies reativas de oxigênio em microrganismos (TEODORO *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o desenvolvimento de antissépticos bucais terapêuticos acrescidos do ativo Phtalox® pode ser uma estratégia inovadora para o tratamento viral. Além disso, apresenta como vantagens ser administrado localmente, poder reduzir a carga viral de SARS-CoV-2 e reduzir a microbiota da nasofaringe, que tende a revestir as partículas e gotículas de aerossol da superfície durante a tosse ou espirros, melhorando clinicamente o paciente infectado e reduzindo a contaminação do ambiente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficácia clínica do antisséptico bucal utilizado individualmente ou em associação com o spray nasal, contendo Phtalox® na carga viral em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a eficácia do antisséptico bucal na redução de carga viral em amostras de nasofaringe e orofaringe após o uso;
- Avaliar a eficácia da associação do antisséptico bucal e do spray nasal na redução de carga viral em amostras de nasofaringe e orofaringe após o uso.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SARS-CoV-2 e a cavidade bucal

O risco de contaminação e disseminação por SARS-CoV-2 tem uma forte ligação com a boca, nariz e faringe (CARROUEL *et al.*, 2020; KAI-WANG-TO *et al.*, 2020; ZHANG; LIU, 2020; BRITO *et al.*, 2020). Neste sentido, a cavidade bucal pode ser considerada uma 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 (ZHANG; LIU, 2020).

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 (YAN *et al.*, 2020).

A carga viral demonstra ser importante biomarcador à severidade em SARS CoV-2, cerca de 60 vezes maior nos casos graves, comparado com casos mais leves (ZHANG; LIU, 2020), além de estar correlacionada com o risco de intubação e mortalidade hospitalar (MAGLEBY *et al.*, 2020). Neste contexto, intervenções mitigatórias para a redução viral em regiões orofaríngeas e nasofaríngeas pode ser efetivas, principalmente, nos estágios iniciais da doença.

#### 3.2. Soluções Tópicas Preventivas

O bochecho e gargarejo, bem como a irrigação nasal podem erradicar partículas virais superficiais nessas vias respiratórias, podendo impedir a sua transmissão ou reduzir a carga viral a que o indivíduo está exposto (BURTON *et al.* 2020, CARROUEL *et al.* 2020b).

### 3.2.1. Enxaguatórios bucais

Enxaguatório bucal é uma formulação líquida destinada à complementação da higienização oral feita com a utilização de escova de dentes e fio dental. Dá-se o nome de antisséptico bucal quando esta formulação possui agentes antimicrobianos. Em termos de registro na Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o enxaguatório bucal é registrado como grau 1, ou seja, é notificado e não precisa comprovar sua ação. Já o antisséptico bucal se enquadra como grau 2, sendo necessária a comprovação científica de sua ação com laudos expedidos por laboratórios reblados.

O uso diário dos enxaguantes ou antissépticos bucais pode evitar diversos problemas, como cáries, formação de placa bacteriana, mau hálito e gengivite, entre outros, uma vez que, a cavidade bucal é um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos, tendo sido identificadas em torno de 500 espécies bacterianas, com características morfológicas e bioquímicas distintas.

Sabe-se que o uso de agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (0,5 a 3,0%) ou o povidine (0,1 a 10,0%), podem reduzir a carga viral salivar em decorrência da vulnerabilidade do SARS-CoV-2 à oxidação induzida por esses agentes, uma vez que, demonstraram romper as membranas lipídicas por meio da produção de radicais livres de oxigênio (BRITO *et al.*, 2020).

As evidências disponíveis abordando os efeitos dos enxaguantes bucais antimicrobianos especificamente sobre o SARS-CoV-2 são escassas, entretanto estudos realizados por Nagatake; Ahmed; Oishi (2002) demonstram que o gargarejo pode ajudar a prevenir e tratar infecções respiratórias nos tratos superiores e inferiores (De acordo com Carrouel e colaboradores (2020) enxaguatórios disponíveis no mercado com ação antimicrobiana, podem ter ação antiviral. Neste sentido, Meister e colaboradores (2020) demonstraram em laboratório a capacidade de alguns antissépticos (Cavex Oral Pre Rinse, Chlorhexamed Forte, Dequonal, Dynexidine Forte 0.2%, Iso-Betadine mouthwash 0%, Listerine Cool Mint, Octenident mouthwash e ProntOral mouthwash ) no combate ao SARS-CoV-2.

A elevada carga viral de SARS-CoV-2 oriunda da saliva de pessoas que estão infectadas e em gotículas de aerossol formadas durante o processo de fala, respiração e a tosse demonstram que a saliva pode desempenhar um importante papel na transmissão do SARS-CoV-2 entre os indivíduos (LI *et al.*, 2020; TO *et al.*, 2020). O uso de enxaguantes bucais tem apresentado uma estratégia que mitiga as taxas de transmissibilidade do SARS-CoV-2 durante o diálogo entre os indivíduos, mas também em procedimentos odontológicos, visto sua eficácia na inativação viral (MENDOZA *et al.*, 2022). A ação antimicrobiana está intimamente associada a presença de ativos que possuem mecanismos de ação ao vírus, reduzindo a carga viral ou desestabilizando os componentes estruturais. A presença de moléculas bioativas em enxaguantes bucais podem ser estratégias que permitem reduzir drasticamente as taxas de transmissão viral (SILVA *et al.*, 2022).

Experimentos clínicos conduzidos por Smeets e colaboradores (2022) demonstram a ação de um enxaguante bucal com a presença de hidrocolóide de dihidroclorato de octenidina, associado com a presença de fenoxietanol em pacientes positivados com SARS-CoV-2. Os experimentos foram conduzidos para averiguar a presença viral após 1, 30, 60, 240 e 360 minutos de exposição ao enxaguante bucal. Dentre os resultados observados, após 1 minuto de exposição os níveis virais foram reduzidos, contudo, após 30 minutos posterior pós procedimento, SARS-CoV-2 poderia ser novamente detectado na saliva de todos os participantes. Os resultados demonstrados no estudo fornecem dados de que a associação de hidrocolóide de dihidroclorato de octenidina e fenoxietanol pode reduzir temporariamente a carga de SARS-CoV-2 na cavidade oral. Neste contexto, a lavagem oral antisséptica com hidrocolóide de dihidroclorato de octenidina e fenoxietanol pode representar uma intervenção com a finalidade redutora na taxa de transmissão SARS-CoV-2.

O enxaguante bucal produzido por Anderson e colaboradores (2022) apresentava em sua composição 0,07% de cloreto de cetilpiridínio, inativando quatro variantes de SARS-CoV-2 (Alfa, Beta, Gama e Delta) dentro de 30 segundos de uso em saliva humana. A molécula demonstrou uma redução da

carga viral superior a  $4,0 \log_{10}$  plaque forming units (PFU)/mL, resultado superior a 70% de etanol nas quatro variantes de SARS-CoV-2. A molécula de cloreto de cetilpiridínio age sob o envelope lipídico viral, alterando a membrana por processos de mutação e consequentemente, reduz sua taxa de reprodução (ANDERSON *et al.*, 2022). Os efeitos do cloreto de cetilpiridínio também foram demonstrados por Takeda *et al.* (2022), onde em presença de 0,001%-0,005% (10-50 µg/mL) de cloreto de cetilpiridínio foi observado eficácia na redução da carga viral nas variantes Wuhan, Alfa, Beta e Gama de SARS-Cov-2, corroborando a demonstração de que cloreto de cetilpiridínio apresenta efeito na inibição viral.

A atividade virucida *in vitro* de 0,5% iodopovidona em um enxaguante oral contra SARS-CoV-2 foi avaliado por Shet e colaboradores (2022). A atividade virucida foi mensurada em 15, 30, 60 e 300 segundos de exposição. A presença de 0,5% de iodopovidona demonstrou ação em 15 segundos de exposição, reduzindo 50% da carga viral de SARS-CoV-2. Os resultados foram superiores a tratamentos controle em presença de álcool 70%. Ademais, o enxaguante oral com 0,5% de iodopovidona não apresentou efeitos citotóxicos em células Vero, o que possibilita o potencial deste enxaguante na redução imediata viral. Estudos conduzidos por Barenghi *et al.* (2022) apresentaram os efeitos de Iodopovidona e clorexidina sob a carga viral de SARS-CoV-2. Em seus resultados, a clorexidina a 0,2% como enxaguante bucal e gargarejos utilizando iodopovidona a 1,0%, ambos por um período de 30 segundos, demonstraram efeitos na redução da carga viral em amostras salivares.

Um enxaguante bucal contendo 100 partes por milhão (ppm) de iodo molecular (MIOR) foi avaliado na redução da carga viral de SARS-CoV-2 em saliva por TEAGLE; CLEM; YOON (2022). Seus resultados mostraram que a presença de MIOR em contato com saliva gerou redução da carga viral de  $4,75 \log_{10}$  PFU/mL após 30 segundos de exposição e de valores superiores a  $5,25 \log_{10}$  PFU/mL após 60 segundos de exposição. Os autores demonstram o potencial na utilização do iodo molecular como uma alternativa inibitória viral,

sendo necessário novos testes, principalmente clínicos e comparativos com enxaguantes bucais convencionais.

### 3.2.2 Solução Nasal

A higiene nasal propicia ótimas condições de limpeza e umidade, fundamentais para o funcionamento adequado do sistema respiratório, sendo recomendada no manejo clínico de gripe, resfriado, rinites, rinosinusites, para os cuidados pós-operatórios do trato respiratório, além de propiciar melhor ação dos medicamentos de uso tópico nasal e minimizar a transmissão da infecção (HUIJGHEBAERT; HOSTE; VANHAM, 2021)

A congestão nasal é um sinal frequente que ocorre em decorrência da dilatação dos vasos sanguíneos (KRINSKY *et al.*, 2014). A mucosa nasal fica edemaciada, geralmente com hiperemia e encoberta por secreção mucoide. Durante os primeiros dois dias, a rinorreia é caracterizada por uma secreção nasal clara, rala e/ou aquosa. Nas infecções agudas das vias aéreas superiores, quando acontece a permanência do sinal por mais de dois dias, a secreção torna-se mais espessa e a coloração pode ficar amarelada ou esverdeada por causa da liberação de mieloperoxidase pelas células polimorfonucleares. Isto usualmente não indica uma infecção secundária nos seios da face, a menos que não se resolva de 10 a 14 dias após o início da congestão. Com a melhoria dos sinais e sintomas, a secreção se torna novamente clara, rala e/ou aquosa (KRINSKY *et al.*, 2014).

A solução nasal é uma formulação líquida que pode conter diversos fármacos, de forma geral, são administrados anti-histamínicos (Bronfeniramina; Carbinoxamina; Clorfeniramina; Dexclorfeniramina; Mepiramina e Loratadina) e descongestionantes nasais (Fenilefrina e Nafazolina) e solução nasal salina (hipertônica à 3,0% e fisiológica à 0,9%) (TRUVEN, 2014).

Dos dispositivos de aplicação nasal, o spray se mostra como eficiente, uma vez que, possui aplicador anatômico, que limitam a penetração profunda na narina, e, portanto, evita lesões da mucosa nasal (KRINSKY *et al.*, 2014).

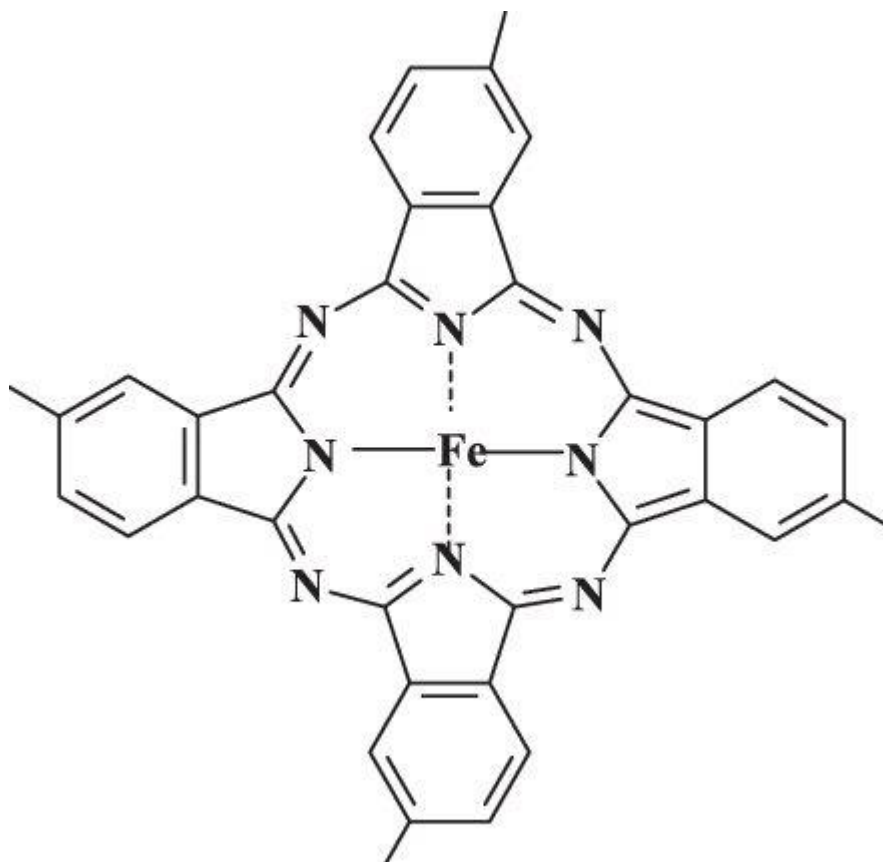
### 3.2.3 Insumo farmacêutico Ativo

A ftalocianina é um insumo farmacêutico registrado e aprovado junto a ANVISA sob o CAS 71667-29-3, sendo amplamente conhecida e utilizada na área de saúde. Uma busca na base de dados *Pubmed*, utilizando os termos, por exemplo, “phthalocyanine” resultou em 1238 artigos, incluindo artigos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos. Apresenta segurança para utilização via oral e pode ser utilizada topicamente, tendo algumas indicações para o tratamento de doenças neoplásicas, degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, doenças virais (herpes), micoses, doenças bacterianas e alguns tratamentos dermatológicos (BONNETT, 1995; MUEHLMANN *et al.*, 2011; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007). Além disso, estudos já demonstraram que as ftalocianinas são estáveis e não tóxicas (GOMER, 1991; MARQUES *et al.*, 2002).

O composto passou por testes de citotoxicidade e foi comparado ao flúor, produto extensamente utilizado em Odontologia. De acordo com estudos conduzidos por Teodoro e colaboradores (2020), a ftalocianina utilizada na concentração à 0,1% demonstrou citotoxicidade inferior ao flúor.

O Phtalox® é um composto derivado de ftalocianina, que foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, em São José dos Campos, São Paulo e patenteado pela empresa Golden Technology. A figura 1 representa a estrutura molecular da ftalocianina.

**Figura 1 – Representação estrutural da molécula de ftalocianina tetracarboxilada de ferro, adaptado de CHAVES *et al.*, 2003**



A ftalocianina apresenta alta atividade eletrocatalítica, no qual, a reação ocorre a partir de uma cinética ao oxigênio dissolvido, um mecanismo envolvendo 4elétrons e associado com o processo redox, com a formação de peróxido de hidrogênio como intermediário da reação (CHAVES *et al.*, 2003). Além disso, a ftalocianina apresenta uma atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade *in vitro* por promover a produção e controle de oxigênio reativo com atividade antimicrobiana (TEODORO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021). A eficácia do composto Phtalox® na inativação do vírus SARS-CoV-2 em culturas de células VERO – CCL81 está comprovada conforme Laudo (Anexo 1).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Formulação

A formulação controle do antisséptico bucal teve a seguinte composição: Fluoreto de sódio (*Sodium fluoride*) a 225 ppm de flúor, sorbitol (*sorbitol*), óleo de rícino hidrogenado (*PEG-40 hydrogenated castor oil*), glicerina (*glycerin*), polivinilpirrolidona (PVP - *Polyvinylpyrrolidone*), metilparabeno (*methylparaben*), fosfato monossódico anidro (*sodium phosphate*), fosfato dissódico anidro (*disodium phosphate*), sucralose (*sucralose*), aroma e água destilada (*aqua*) (FERREIRA, 2010). Destaca-se que o produto não contém etanol.

A formulação controle do spray nasal teve a seguinte composição: fosfato monossódico anidro (*sodium phosphate*), fosfato dissódico anidro (*disodium phosphate*), cloreto de sódio (*sodium chloride*), cloreto de benzalcônio (*benzalkonium chloride*), metilparabeno (*methylparaben*) e água destilada (*aqua*) (FERREIRA, 2010).

A concentração do Phtalox® como insumo farmacêutico ativo, utilizada no antisséptico bucal e spray nasal foi de 0,01% (p/p).

Conforme preconiza o sistema internacional de nomenclatura de cosméticos, INCI (*International Nomenclature Cosmetic Ingredient*) *name* está descrito entre parêntesis.

### 4.2 Ensaio Clínico

Foram selecionados 125 pacientes diagnosticados com COVID-19, atendidos pelo setor de Moléstias Infecciosas (MI) do Hospital Universitário de Londrina da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil de 1º de novembro de 2020 a 1º de fevereiro de 2021, tendo os estudos aprovados pelo Hospital Universitário da UEL (Anexo 2).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE) antes do início do estudo. O protocolo do estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil (parecer CAAE: 37277420.0.0000.5231), conforme Anexo 3 e os procedimentos adotados estavam de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983.

#### 4.2.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo longitudinal, prospectivo, triplo-cego randomizado, registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) sob nº RBR-8tygcz7 e que atendeu ao *checklist Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) 2010, conforme Fig. 1. Dos 125 pacientes selecionados, o ensaio contou com 75 pacientes com diagnóstico de infecção por SARS-CoV-19 confirmada por qPCR, internados na MI do Hospital Universitário da UEL.

Os pacientes foram randomizados em três grupos (G1, G2 e G3), sendo um grupo com tratamento “placebo” e dois grupos com o tratamento contendo o insumo farmacêutico ativo Phtalox® nas formas farmacêuticas em enxaguatório bucal e *spray* nasal durante 3 dias, sendo dia zero (D0) o início do estudo, após 24 h (D1) e após 48 h (D2) e após 72 h (D3). Foi utilizado um *software* de randomização que fez a distribuição aleatorizada do número do *Kit* de tratamento para cada paciente. Foram utilizadas formulações líquidas, de uso tópico, acrescidas ou não da substância ativa, 5 vezes ao dia. Os pacientes foram alocados, após randomização em um dos três grupos abaixo:

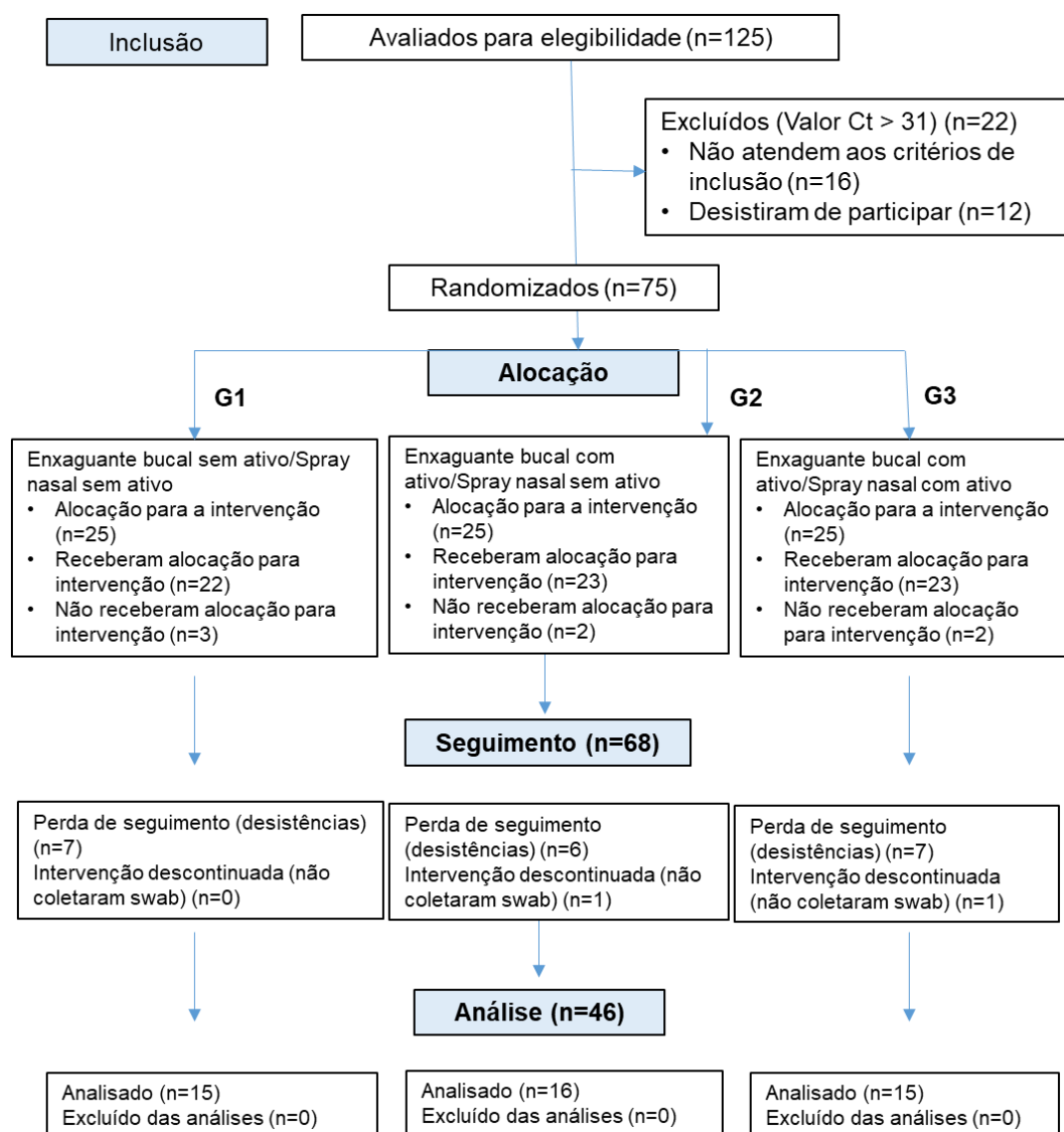
G1 (n=25): grupo controle que utilizou o antisséptico bucal placebo e *spray* nasal placebo.

G2 (n=25): grupo que utilizou o antisséptico bucal com Phtalox® e *spray* nasal placebo.

G3 (n=25): grupo antisséptico bucal com Phtalox® e *spray* nasal com Phtalox®.

Destaca-se que o antisséptico bucal placebo é a formulação de enxaguatório bucal sem álcool e sem nenhum insumo farmacêutico ativo, bem como, o *spray* nasal placebo foi a formulação de solução nasal contendo soro fisiológico sem ativo.

**Figura 2 - Diagrama de fluxo do CONSORT 2010.**



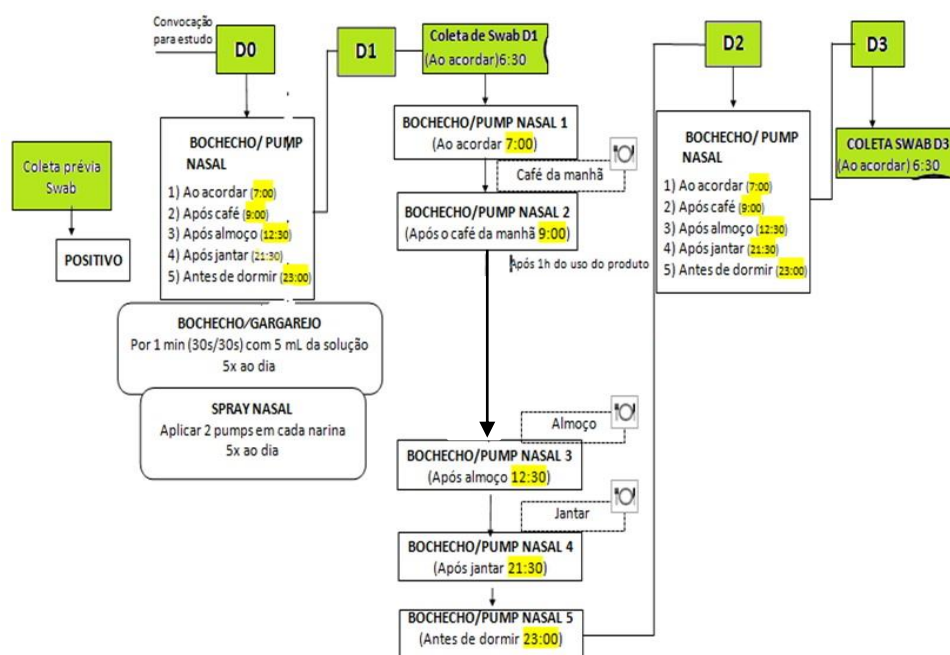
**Fonte:** Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT 2010).

Como pode ser observado no esquema demonstrado na Fig. 1, após a coleta prévia por *swab*, e com resultado positivo para SARS-CoV-2, o paciente foi convocado para o estudo conforme descrito no item 4.2.1. O paciente utilizou o antisséptico bucal e o spray nasal, conforme randomização aleatória, 5 vezes ao dia, ao acordar (7:00 h), após o café da manhã (9:00 h), após o almoço (12:30 h), após o jantar (21:30 h) e antes de dormir (23:00 h), durante os três dias do tratamento (D0, D1 e D2), sendo que D0 foi considerado o primeiro dia do tratamento, D1 o segundo dia e D2 o terceiro dia do tratamento, respectivamente.

O antisséptico bucal foi utilizado pelo paciente através de bochecho e gargarejo por 1 minuto, sendo 30 segundos de bochecho e 30 segundos de gargarejo com 5 mL da solução. Já o spray nasal foi aplicado 2 *pumps* em cada narina. O tempo foi cronometrado através de uma ampulheta utilizada pelos pesquisadores.

Foram realizadas 3 coletas de *swabs* (item 4.3.1), sendo nasofaringe e orofaringe, e posteriormente, 3 avaliações. A primeira coleta foi realizada logo após consulta com a médica infectologista (D0 – dia zero), cujos pacientes positivados e que se enquadravam no nosso estudo foram recrutados. A segunda coleta aconteceu no dia D1 (após 24 h) realizada às 6:30 h, antes do café da manhã. E por fim, a terceira coleta ocorreu no dia D3 (após 72 h) às 6:30 h, antes do café da manhã.

**Figura 3 - Esquema demonstrando a utilização do antisséptico bucal e spray nasal durante os três dias de tratamento.**



Fonte: Próprio autor.

#### 4.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram adotados como critérios de inclusão, ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos e que conseguissem fazer o gargarejo inicial. Foram excluídos do estudo os pacientes com mais de 7 dias do início dos sintomas e aqueles com necessidade de ventilação mecânica, intubação ou em Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

#### 4.3 Coleta de Materiais

##### 4.3.1 Procedimentos para coleta das amostras respiratórias

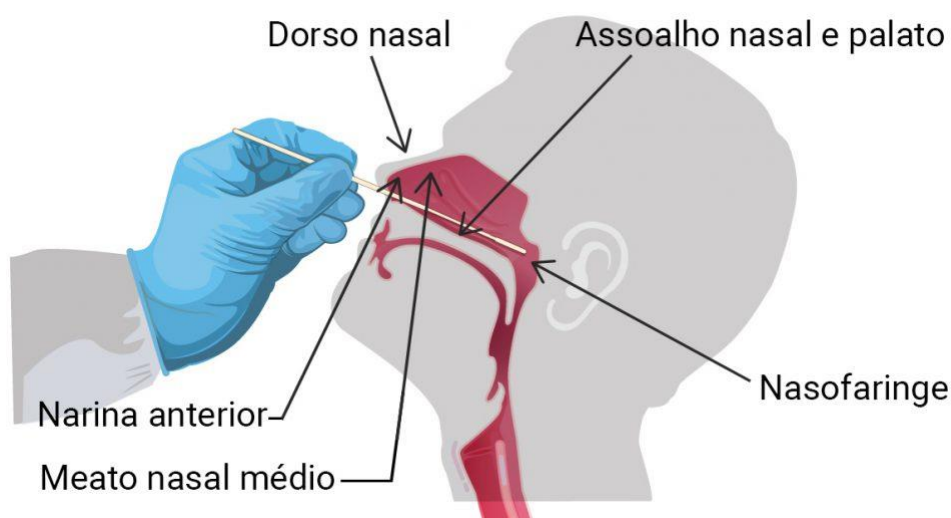
O procedimento de coleta foi realizado pelo profissional de saúde, cuja retirada do meio de transporte viral (MTV) do *freezer* foi feita somente se o paciente já estiver pronto para coleta. Foi aguardado o descongelamento do MTV, conferido a identificação do paciente e realizada a orientação sobre a coleta. Fez-se a identificação do frasco com MTV.

A coleta da amostra foi realizada utilizando três *swabs*, sendo dois para coleta nas narinas (nasofaringe) e um na boca (orofaringe). Para paciente sentado, instruiu-se fletir a cabeça para trás (Fig. 3); e para paciente deitado, foi retirado o travesseiro e erguido o seu queixo. A abertura do plástico dos *swabs* foi realizada pela parte da haste e foi segurado os três *swabs* (COVID-19) na mesma mão. A abertura do frasco com MTV foi feita com o posicionamento da tampa virada para cima sobre uma superfície próxima, onde puxou primeiro o *swab* do plástico.

Na sequência fez-se a introdução na narina pressionando levemente o assoalho até sentir resistência. O *swab* deve atingir profundidade semelhante à distância entre as narinas e a abertura externa da orelha do paciente (Fig. 3). Em seguida, girou-se o *swab* na narina, aguardou alguns segundos e retirou o *swab* girando-o. Introduziu-se o mesmo *swab* (COVID-19) na outra narina e repetiu-se o procedimento. Introduziu-se os *swabs* no frasco com MTV, puxou o

último swab do plástico e esfregou o fundo da garganta (palato posterior). Introduziu o último swab no mesmo MTV e a amostra foi enviada para o setor de Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do HU e acondicionada em freezer -20 °C até a realização da extração do material genético viral.

**Figura 4 - Demonstração da coleta de secreção em nasofaringe.**



Fonte: [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html)

#### 4.4 Detecção do SARS-CoV-2

##### 4.4.1 Extração de RNA e realização da qPCR

Os ácidos nucleicos foram extraídos de 120 µL de *swab* nasofaríngeo ou orofaríngeo coletado por uma enfermeira experiente utilizando o Kit EXTRACTA FAST-DNA e RNA viral de acordo com as instruções do fabricante (Loccus, São Paulo, Brasil) utilizando um extrator automatizado EXTRACTA 32<sup>®</sup> (Loccus, Cotia, Brasil). O RNA extraído foi transcrito reverso em cDNA e amplificado usando o kit TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR (Applied Biosystems)

utilizando o equipamento QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems). Este kit detecta três regiões do SARS-CoV2: ORF1ab, N e S.

Os resultados de RT-PCR, método semiquantitativo, foram expressos em número de ciclos (CT) necessários para iniciar a detecção do material genético amplificado (ORF1ab, N e S), sendo inversamente proporcional à CV. Os valores médios de CT dos três genes foram usados para a análise estatística.

A carga viral (CV) é determinada de forma semiquantitativa e indireta, sendo que quanto maior o CT menor a CV do paciente. A CT varia em média de 20 a 35. Desta forma, foi considerado alta infectividade quando o CT apresentasse valores entre 25 a 20, baixa infectividade ou não contagiante quando o CT for superior a 30.

Foi considerado CV alta, quando os pacientes apresentavam valores de CT abaixo de 25, CV intermediária ou média com valores de CT entre 25 a 30 e valores de CT acima de 30 foi considerada baixa CV (JAAFAR *et al.*, 2021).

#### **4.5 Análise Estatística**

Foram realizadas análises descritivas e exploratórias de todos os dados. Os dados foram sumarizados como número absoluto e porcentagens para variáveis categóricas e como médias e desvios-padrão ou medianas e intervalos interquartis (1º e 3º) para variáveis contínuas. Em seguida, os três grupos foram comparados usando o teste exato de Fisher para variáveis categóricas e teste de ANOVA com pós-teste de Tukey para variáveis contínuas (idade e início dos sintomas). As associações entre os grupos e uma classificação de infectividade (alta, intermediária e baixa) foram analisadas com base nos valores de CT usando o teste de qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas no programa R Core Team (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria), com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo teve início com 125 pacientes, entretanto, atendendo aos critérios de exclusões, um total de 75 pacientes confirmados com COVID-19 participaram efetivamente, os quais foram recrutados para o estudo conforme pode ser observado na Fig. 1.

Dos 75 pacientes, 25 pacientes foram designados para cada grupo (G1, G2 e G3), entretanto, sete pacientes foram removidos, pois não atendiam aos critérios de inclusão. Desta forma, seguiram nos três grupos (G1, G2 e G3) 22, 23 e 23 pacientes, respectivamente (n=68). Após excluir os pacientes que se recusaram a participar ou que descontinuaram a intervenção, efetivamente 15, 16 e 15 pacientes nos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente que completaram a intervenção e foram incluídos na análise (n=46).

**Tabela 1: Comparação entre grupos quanto às características dos pacientes.**

Variável	Grupo		
	G1 (n=15)	G2 (n=16)	G3 (n=15)
Idade (anos): Média (desvio padrão); Mediana (intervalo interquartil); (mínimo e máximo)	33,9 (13,7); 28,0 (24,0-47,0); (20,0-66,0)	36,6 (12,1); 31,0 (26,0-47,5); (23,0-56,0)	41,3 (11,8); 42,0 (31,0-51,0); (21,0-62,0)
<i>p</i> -valor	0,2444		
Sexo			
Feminino	9 (60,0%)	12 (75,0%)	10 (66,7%)
Masculino	6 (40,0%)	4 (25,0%)	5 (33,3%)
<i>p</i> -valor	0,6781		
Início dos sintomas (Média (desvio padrão); Mediana (intervalo interquartil)	5,3 (1,4) 6,0 (5,0-6,0)	5,4 (1,2) 6,0 (4,5-6,0)	5,6 (0,8) 6,0 (5,0-6,0)
<i>p</i> -valor	0,8124		

Obesidade			
Sim	2 (13,3%)	3 (18,8%)	7 (46,7%)
Não	13 (86,7%)	13 (81,2%)	8 (53,3%)
<i>p</i> -valor	0,1425		
Hipertensão Arterial			
Sim	1 (6,7%)	2 (12,5%)	1 (6,7%)
Não	14 (93,3%)	14 (87,5%)	14 (93,3%)
<i>p</i> -valor	1,0000		
Diabetes			
Frequência			
Sim	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)
Não	15 (100,0%)	16 (100,0%)	14 (93,3%)
<i>p</i> -valor	0,6522		
Outras comorbidades			
Frequência			
Sim	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)
Não	15 (100,0%)	16 (100,0%)	14 (93,3%)
<i>p</i> -valor	0,6522		

Os dados categóricos foram avaliados pelo Teste Exato de Fisher e os dados foram expressos como número absoluto e porcentagem. Os dados numéricos foram avaliados por ANOVA com pós-teste de Tukey e expressos como mediana (1-3 interquartil) ou média (desvio padrão).

G1: uso de antisséptico bucal contendo placebo e spray nasal placebo; G2: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal placebo; G3: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal contendo Phtalox®.

Conforme demonstrado na Tabela 1, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à idade e tempo de início dos sintomas. A idade dos pacientes variou de 20 a 66 anos, com médias de  $33,9 \pm 13,7$ ,  $36,6 \pm 12,1$  e  $41,3 \pm 11,8$  anos no G1, G2 e G3, respectivamente. Também não houve diferença entre os grupos quanto à distribuição por sexo, presença de obesidade, hipertensão, diabetes ou outras comorbidades.

Os valores de CT diminuíram significativamente nos três grupos (Tabela 2). Após 72 horas, a diminuição do CT foi maior no G3 ( $11,21 \pm 4,35$ ) e menor no G1 ( $5,53 \pm 6,28$ ).

**Tabela 2 - Resultado da carga viral média estimada pelo valor de CT, obtida na reação de qPCR em função do grupo e do tempo.**

Tempo	Valor de CT		
	G1 (n=15)	G2 (n=16)	G3 (n=15)
	Média	Média	Média
	(desvio padrão)	(desvio padrão)	(desvio padrão)
Linha de base (D0)	24,19 ( $\pm 6,13$ )		
	Ac	21,51 (4,39) Ac	22,35 (4,28) Ac
Após 24 horas (D1)		26,42 (6,58)	
	25,74 (4,29) Ab	Ab	27,83 (6,15) Ab
Após 72 horas (D3)		30,46 (5,53)	
	29,72 (5,53) Aa	Aa	33,55 (5,15) Aa
p-valor*	p(grupo)=0,6412; p(tempo)<0,0001; p(interação)=0,2899		
<b>Varição no tempo</b>			
Após 24 horas (D1) - (D0)	1,55 (5,54) A	4,91 (4,89) A	5,48 (5,33) A
p-valor	p=0,0959		
Após 72 horas(D3) - (D0)	5,53 (6,28) B	8,96 (4,01) AB	11,21 (4,35) A
p-valor	p=0,0113		

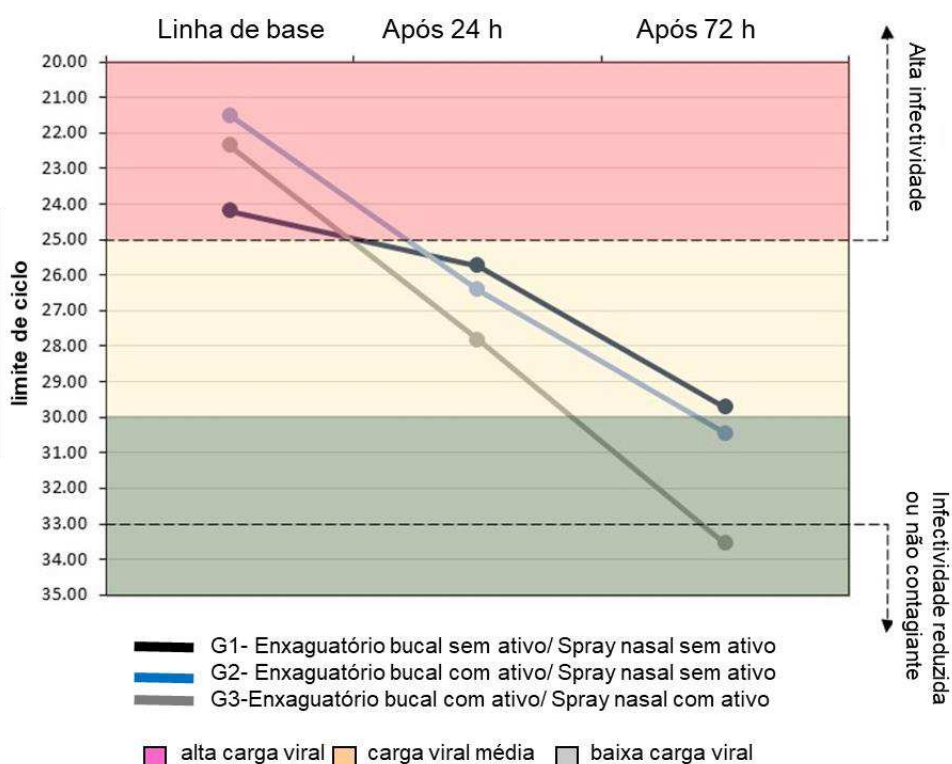
Análise de variância unidirecional (ANOVA) e pós-teste de Tukey. A Carga viral foi estimada indiretamente pelo valor de CT.

Letras diferentes (maiúsculas comparando horizontalmente entre grupos e minúsculas comparando verticalmente entre tempos) indicam diferenças estatisticamente significativas.

G1: uso de antisséptico bucal contendo placebo e spray nasal placebo; G2: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal placebo; G3: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal contendo Phtalox®.

A Figura 5 mostra os valores médios de CT dos três grupos ao longo do tempo, de acordo com o grau de infectividade e a CV. Todos os três grupos tiveram uma alta CV no início do estudo. Setenta e duas horas após o início dos protocolos de tratamento, o G1 apresentou CV intermediário e os G2 e G3, CV baixo. Apenas o G3 teve um valor médio de CT mostrando infectividade reduzida no terceiro dia (D3).

**Figura 5 - Carga viral média, estimada pelo valor de CT (valores limiares do ciclo) obtido na reação de RT-PCR, em função dos grupos (G1, G2 e G3) e do tempo.**



Teste de qui-quadrado. G1: uso de antisséptico bucal contendo placebo e spray nasal placebo; G2: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal placebo; G3: uso de antisséptico bucal contendo Phtalox® e spray nasal contendo Phtalox®.

Com a realização da RT-PCR obtém-se o valor de CT, que representa o número de ciclos necessários para identificar o gene alvo (ORF1ab, N e S), sendo inversamente proporcional à CV.

Verificando a Figura 5 observa-se CV alta com valores de CT abaixo de 25, CV média com valores de CT entre 25 a 30 e valores de CT acima de 30 foi considerada baixa CV.

De acordo com Jaafar *et al.* (2021), a infectividade, definida por crescimento em cultura de células, pode ser considerada alta quando o valor de RT-PCR CT for menor que 25. Além disso, aproximadamente 85% das culturas se mostraram negativas se o valor de CT for maior que 33. Assim, consideramos amostras com valores de CT maiores que 30 para ter baixa infectividade ou não ser contagiante.

No presente estudo, todos os três grupos apresentaram diminuição dos valores de CT ao longo do tempo, indicando redução da CV. Esses resultados estão de acordo com relatos anteriores de que gargarejos e bochechos, assim como, a lavagem da cavidade nasal estão associados à redução da CV do SARS-CoV-2 (STATH *et al.*, 2021; BURTON *et al.*, 2020).

Considerando que a maior CV pode ser encontrada na primeira semana após o início dos sintomas, de acordo com o Guia SARS-CoV-2 RT-PCR (2021) é importante uma rápida redução da CV assim que o paciente for diagnosticado com COVID-19. A CV do SARS-CoV-2 está associada a marcadores de inflamação e gravidade da doença (FAJNZYLBBER *et al.*, 2020). Na presença de inflamação e doença grave, o protocolo de medicamentos da OMS COVID-19 recomenda o uso de terapias adicionais para reduzir a CV e uma redução na CV pode contribuir para um melhor desfecho clínico (SANTOS *et al.*, 2020b; SANTOS *et al.*, 2021; STATHIS *et al.*, 2021; VILHENA *et al.*, 2021).

Neste estudo, houve redução três vezes maior da CV nas primeiras 24 horas e redução superior a 1,5 vezes após 72 horas nos grupos que utilizaram bochechos com ftalocianina (G2 e G3) em relação ao grupo controle, ou seja,

que utilizou bochechos com os placebos (G1). Além disso, apenas nos grupos que utilizaram o bochecho com ftalocianina (G2 e G3) apresentaram CVs baixos (CT>30) 72 horas após o início dos protocolos de enxágue.

O uso de soluções de ftalocianina (Phtalox<sup>®</sup>) mostrou ter um efeito clinicamente importante. Estudos laboratoriais anteriores mostraram uma redução superior a 90% na CV de pacientes com COVID-19 hospitalizados e não hospitalizados quando expostas a alguns dias à ftalocianina (SANTOS *et al.*, 2020a; SANTOS *et al.*, 2020b; ORCINA *et al.*, 2021; VILHENA *et al.*, 2021; ORCINA *et al.*, 2022).

Os estudos acima citados demonstraram algumas limitações, como, por exemplo o tamanho amostral. Além disso, os valores de Ct são semiquantitativos e a avaliação por RT-PCR indica apenas a presença ou ausência de fragmentos de vírus. Resultados mais precisos poderiam ser obtidos se a avaliação medisse a capacidade infecciosa de vírus viáveis após o uso dos protocolos de lavagem.

Ressalta-se que no presente estudo, adotamos a medida de infectividade descrita anteriormente por Jaafar *et al.* (2021) com base em um estudo no qual mais de 3.700 amostras foram avaliadas quanto à viabilidade viral. Os resultados do estudo mostraram que amostras com valores de CT menores que 25 apresentaram alta infectividade e amostras com valores de CT de 33 ou mais tiveram infectividade reduzida. A redução da infecciosidade reduz tanto o agravamento clínico do risco individual quanto o risco de transmissão de SARS-CoV-2 a outros indivíduos. Em nosso estudo, apenas o grupo que utilizou tanto o bochecho de ftalocianina quanto o spray nasal de ftalocianina (G3) apresentou infectividade reduzida 72 horas após o início do protocolo.

O protocolo adotado de uso de antisséptico bucal contendo Phtalox<sup>®</sup>, sendo 5 mL de solução de gargarejo/bochecho por um minuto durante 5 vezes ao dia não apresentou contraindicações (ORCINA *et al.*, 2022). Pelo contrário, o uso de antisséptico bucal contendo Phtalox<sup>®</sup> demonstrou bom desempenho em pacientes com COVID19 como terapia de suporte para reduzir os danos na pandemia de SARS-CoV-2.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que o uso do antisséptico bucal e o spray nasal contendo Phtalox® (derivados de ftalocianina) reduziu a carga viral do SARS-CoV-2 e, também reduziu a infectividade para níveis baixos ou não contagiosos após os três dias de uso, podendo ser uma alternativa promissora em *oral care*. Entretanto, mais estudos com tamanhos de amostra maiores são necessários para confirmar esses resultados.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, E. R. *et al.* CPC-containing oral rinses inactivate SARS-CoV-2 variants and are active in the presence of human saliva. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 2, 2022. Doi: 10.1099/jmm.0.001508.
- BARENGHI, L. *et al.* Recent evidence sustains the use of chlorhexidine-based mouthwash for dental patients during the coronavirus disease 2019 epidemic. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 161, n. 3, p. 322-323, 2022. Doi: 10.1016/j.ajodo.
- BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for Photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**. London, v. 24, p. 19-33, 1995. Doi:10.1039/CS9952400019.
- BRITO, L. N. S. *et al.* Uso de enxaguante bucal na prática odontológica durante a pandemia de COVID-19. **Archives Health Investigation**, v. 9, n. 4, p.325-330, 2020. Doi: 10.21270/archi.v9i4.5150.
- BURTON, M. J. *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. **Journal Cochrane Database Systematic**, v. 16, n. 9, p.1-9, 2020. Doi: 10.1002/14651858.CD013626.pub2.
- CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**. Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2007. Doi: 10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x.
- CARROUEL, F. *et al.* COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses with  $\beta$ -Cyclodextrin Combined with Citrox in Preventing Infection and Progression. **Journal of Clinical Medicine**. Basel, v. 9, n. 4, p.1-8, 2020a. Doi: 10.1111/j.1468-3083.2006.02038.x.
- CARROUEL, F. *et al.* Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. **Journals Nanomaterials**. Basel, 2020, v.10, n. 1, p.1-32, 2020b. Doi: 10.3390/jcm9041126.
- CHAVES, J. A. P. *et al.* Eletrocatalise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina tetracarboxilada de ferro. **Écletica Química**. 2003.
- COULTHARD, P. Dentistry and coronavirus (COVID-19) – moral decision-making. **National Library of Medicine**, London, v. 228, n. 7, p.503-505, 2020. Doi: 10.1038/s41415-020-1482-1.

DA FONSECA ORCINA, B. *et al.* A Phthalocyanine Derivate Mouthwash to Gargling/Rinsing as an Option to Reduce Clinical Symptoms of COVID-19: Case Series. **Clinical Cosmetic Investing Dentistry**, v. 13, n. 4., p. 47–50, 2021. Doi: <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S295423>.

ENGLAND, P. H. Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR. A guide for health protection teams. **Public Health England**. 2020. Disponível em: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/926410/Understanding\\_Cycle\\_Threshold\\_\\_Ct\\_\\_in\\_SARS-CoV-2\\_RT-PCR\\_.Pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/926410/Understanding_Cycle_Threshold__Ct__in_SARS-CoV-2_RT-PCR_.Pdf). Acesso em: 21 jul. 2022.

FAJNZYLBBER, J. *et al.* Massachusetts Consortium for Pathogen Readiness. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. **Nature Communication**, v. 11, n. 1, p. 54-93, 2020. Doi: 10.1038/s41467-020-19057-5.

FERREIRA, A. de O. Guia prático da Farmácia magistral. **Revista Amplificador**, São Paulo: Pharmabooks. 4 ed. v.1, xxii, 736 p. il. 2010. ISBN 10 – 8589731472.

GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizer used in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v. 54, n. 6, p.1093-1107, 1991. Doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02133.x.

HERRERA, D.; SERRANO, J.; ROLDÁN, S.; SANZ, M. Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? **Clinical Oral Investigation**, v. 24, n. 8, p. 2925-2930, 2020. Doi:10.1007/s00784-020-03413-2.

HUIJGHEBAERT, S; HOSTE, L; VANHAM, G. Essentials in saline pharmacology for nasal or respiratory hygiene in times of COVID-19. **European journal of clinical pharmacology**, v. 77, n. 9, p. 1275-1293, 2021. Doi: 10.1007/s00228-021-03102-3

HUANG, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. **Nature Medicine**, v. 27, n. 5, p. 892-903,2021. Doi: 10.1038/s41591-021-01296-8.

JAAFAR, R. *et al.* Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates. **Journal Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 921, 2021. Doi: 10.1093/cid/ciaa1491.

KAI-WANG TO, K. *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observation cohort study. **Lancet Infectious Diseases**. New York, v. 20, n. 5, p. 565-574, 2020. Doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

KARNOFSKY, D. A.; BURCHENAL, J. H. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MACLEOD, C. M. (Ed). **Journal of Cancer Therapy**, Columbia – University Press, New York, v. 4, p. 196, 1949. Doi: 10.4236/jct.2013.49A2002.

KRINSKY, D. L. *et al.* **Handbook of nonprescription drugs: an interactive approach to self-care**. 18.ed. Washington: American Pharmacists Association, p. 104, 2014.

LI, Y. *et al.* Saliva is a non-negligible factor in the spread of COVID-19. **Molecular oral microbiology**, v. 35, n. 4, p. 141-145, 2020. Doi: 10.1111/omi.12289.

MARQUES, A. D. S. *et al.* The species of 8-methoxy-psoralen in hydrophobic and hydrophilic environments and its solubilization in neutral and charged micelles. **Journal of Luminescence**. v. 97, n. ¾, p. 237-249, 2002. Doi: 10.1016/S0022-2313(02)00230-2.

MAGLEBY, R. *et al.* Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease. **Clinical Infectious Diseases**. v. 6, n. 11, p. 4197-4205, 2021. Doi: 10.1093/cid/ciaa851.

MENDOZA, J. P. I. M. *et al.* Antiviral effect of mouthwashes against SARS-COV-2: A systematic review. **The Saudi dental journal**, 2022. Doi: 10.1016/j.sdentj.2022.01.006.

MUEHLMANN, L. A. *et al.* Liposomal photosensitizers: potencial platforms for anticancer photodynamic therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 8, p.729- 737, 2011. Doi: 10.1590/S0100-879X2011007500091.

NAGATAKE, T.; AHMED, K.; OISHI, K. Prevention of Respiratory Infections by Povidone-Iodine Gargle. **Dermatology**. v. 204, n. 1, p.32–36, 2002. Doi: 10.1159/000057722.

ORCINA, B. F. *et al.* A recommendation of PHTALOX® for preventing infection and progression of COVID-19: a 1-year summarized update of scientific approaches. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 17, n. 17, p. 1-3, 2022. Doi: 10.3205/dgkh000406.

ORCINA, B. F. *et al.* A Phthalocyanine Derivate Mouthwash to Gargling/Rinsing as an Option to Reduce Clinical Symptoms of COVID-19: Case Series. **Clinical Cosmetic Investing Dentistry**, v. 10, n. 13, p. 13:47-50, 2021. Doi: 10.2147/CCIDE.S295423.

PENG, X. *et al.* Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. **International Journal of Oral Science**, v.12, n. 1, p. 9-12, 2020. Doi: 10.1038/s41368-020-0075-9.

POLETI, M. L. *et al.* Toothbrushing with a dentifrice containing antimicrobial phthalocyanine derivative for the intraoral reduction of viral load of SARS-CoV-2: a pilot study. **Research Square**, v. 1, n. 1, p. 8-19, 2021. Doi: 10.21203/rs.3.rs-690819/v1.

REIA, V. C. B. *et al.* Population-based virucidal phthalocyanine gargle/rinse protocol to reduce the risk of coronavirus disease-2019: a community trial [Preprint]. **Research Square**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2021. Doi: 10.21203/rs.3.rs-1065834/v1.

SANDERS, R. *et al.* Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analyzing clinical samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 406, n. 26, p. 6471 – 83, 2014. Doi: 10.1007/s00216-014-7857-x.

SANTOS, C. *et al.* Antibiofilm action of PHTALOX®-containing oral care formulations. **Journal Dentistry Research**, v. 99, n. Spec Iss A, p. 3326, 2020.

SANTOS, P. S. S. *et al.* A recommendation of PHTALOX® Mouthwash for preventing infection and progression of COVID-19. **Acta Scient Dentistry Science**, v. 4, n. 12, p.111-2, 2020. Doi: 10.31080/ASDS.2020.04.0991.

SILVA, A. *et al.* The effect of mouthrinses on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load: A systematic review. **Journal of the American Dental Association**, v. 153, n. 7, p. 635, 2022. Doi: 10.1016/j.adaj.2021.12.007.

SHET, M. *et al.* In vitro inactivation of SARS-CoV-2 using a povidone-iodine oral rinse. **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02082-9>.

SMEETS, R. *et al.* Impact of Oral Rinsing with Octenidine Based Solution on SARS-CoV-2 Loads in Saliva of Infected Patients an Exploratory Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 9, p. 5582, 2022. Doi: 10.3390/ijerph19095582.

STATHIS, C. *et al.* Review of the use of nasal and oral antiseptics during a global pandemic. **Future Microbiology**, v. 16, n. 2, p.119-130, 2021. Doi: 10.2217/fmb-2020-0286.

TAKEDA, R. W., J.; HONG, R. *et al.* Antiviral effect of cetylpyridinium chloride in mouthwash on SARS-CoV-2. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2022.

TEAGLE, V.; CLEM, D. S.; YOON, T. Virucidal Properties of Molecular Iodine Oral Rinse Against SARS-CoV-2. **Compendium**, v. 43, n. 2, 2022.

TEODORO, G. *et al.* PHTALOX® Antimicrobial Action and Cytotoxicity: in vitro Study. IADR/AADR/CADR. **International Association for Dental Research**, 2020.

TO, K. K. *et al.* Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 841-843, 2020. Doi: 10.1093/cid/ciaa149.

Truven Health Analytics (Ed): **Drugdex System**. Thomsom MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado, Estados Unidos da América. Disponível em: [www.micromedexsolutions.com](http://www.micromedexsolutions.com). Acesso em: 4 out. 2022.

VILHENA, F.V.; REIA, V.C.B.; ORCINA, B.F. *et al.* The use of antiviral Phthalocyanine mouthwash as a preventive measure against COVID-19. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 16, n. 9, jul., p. 2-3, 2021. ISSN 2196-5226.

WINICHAKOON, P. *et al.* Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swab Does Not Rule Out COVID-19. **Jornal Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. e00297-20, p. 2020. Doi:10.1128/JCM.00297-20.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance. In: **Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: Interim guidance**. 1 ed. 2020. p. 7-7. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1053420>. Acesso em: 21 jul. 2022.

WU, J. *et al.* Clinical characteristics of imported cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Jiangsu Province: a multicenter descriptive study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 706-712, 2020. Doi: 10.1093/cid/ciaa199.

YOON, J. G. *et al.* Clinical significance of a high SARS-CoV-2 viral load in the saliva. **Journal of Korean Medical Science**, v. 35, n. 20, p. e195, 2020. Doi: 10.3346/jkms.2020.35.e195.

YU, F. *et al.* Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 793-798, 2020. Doi: 10.1093/cid/ciaa345.

ZHANG, L.; LIU, Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 5, p. 479-490, 2020. Doi: 10.1002/jmv.25707.

## **ANEXOS**

## Anexo 1 – Laudo da eficácia do composto Phtalox® na inativação do vírus SARS-CoV-2 em culturas de células VERO – CCL81



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
 São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
 e-mail: eldurigo@usp.br



São Paulo, 15 de janeiro de 2021

**Laudo:** “Eficácia de composto Phtalox da Golden Technology na inativação do vírus SARS-CoV-2 em culturas de células VERO – CCL81

### Laudo

#### 1- Metodologia

Os experimentos foram realizados em Laboratório NB3 no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Uma alíquota de 20 mg do composto foi diluída em 10mL de água destilada estéril. Para a diluição completa do composto foi necessária a adição de NaOH a fim de tornar o pH da solução básico.

A diluição inicial (P) foi diluída no fator 2 nas seguintes concentrações:

P = 2,0 mg/mL

1:2 = 1,0 mg/mL

1:4 = 0,5 mg/mL

1:8 = 0,25 mg/mL

1:16 = 0,125 mg/mL

1:32 = 6,25 x 10<sup>-2</sup> mg/mL

1:64 = 3,12 x 10<sup>-2</sup> mg/mL

1:128 = 1,56x10<sup>-2</sup> mg/mL

1:256 = 0,78x10<sup>-2</sup> mg/mL

1:512 = 0,39x10<sup>-2</sup> mg/mL

A diluição foi realizada num volume final de 100µL, em quadruplicata, em placas de 96 poços de acordo com o esquema abaixo:



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
 São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
 e-mail: eldurigo@usp.br



**Figura 01:** Representação esquemática da diluição de Phtalox para teste de inibição do SARS-CoV-2.

	P	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	C+	C-	
Teste													Quadruplicatas
Citotoxicidade													
Teste													Quadruplicatas
Vírus													

Após a diluição do composto, foram adicionado 100µL do vírus SARS.CoV2/SP02.2020.HIAE.Br na concentração de 1000 TCID50/mL (0,02 MOI). A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO2 por 30 minutos e 150µL foram transferidos para placas de cultura celular de 96 poços com células VERO CCI-81 (1x10<sup>5</sup> céls/poço) com cerca de 90% de confluência.

Após 72 horas de incubação, as placas foram observadas em microscópio óptico para determinação da integridade do tapete celular em comparação com os controles positivo e negativo. O sobrenadante foi coletado para realização de Real-Time RT-PCR e a placa fixada e corada com Naphtol Blue Black (Sigma-Aldrich).

O sobrenadante das quatro réplicas coletado foi submetido a PCR em Tempo Real (RT-PCR) para identificação do SARS-CoV-2. A extração do material genético foi realizada utilizando sistema semi-automatizado NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, France), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada utilizando o Kit AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems)



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
 São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
 e-mail: eldurigo@usp.br



Inc., EUA) em máquina de PCR em Tempo Real (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), de acordo com protocolo, “primers” e sonda para identificação do gene E viral (Corman et al., 2020).

#### **Método de Imunofluorescência indireta (IFI)**

A metodologia aqui descrita foi adaptada de Sales-Medina et al., 2020. Resumidamente após 72 h.p.i, as placas foram fixadas por 30 min em paraformaldeído a 4% em 1X PBS (pH 7,4) e submetidas à detecção de imunofluorescência indireta de infecção celular viral. Após lavagem duas vezes com 1X PBS 0,05% Tween 20 (PBST), as placas foram bloqueadas com soro-albumina bovino (BSA) (3% p/v em 1X PBS; Sigma-Aldrich) por 30 min em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBST. Como anticorpo primário, usamos um soro padrão ICB- COVID-19 diluído 1: 1000 em PBS para detectar infecção por SARS-CoV-2 em células Vero. Os anticorpos primários foram incubados por 30 min, e as placas foram lavadas duas vezes com PBST. Como anticorpos secundários, o IgG anti-humano de cabra marcado com Alexa 488 (Thermo Scientific) foi usado diluído a 4 µg / mL em PBS e incubado por 30 min com 5 µg / mL 4', 6-Diamidina-2'-fenilindol dicloridrato ( DAPI, Sigma-Aldrich) em PBS para corar núcleos. As placas foram lavadas duas vezes com PBST e fotografadas no Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer) usando uma objetiva de ampliação de 20x. Cinco imagens foram adquiridas por poço. As imagens adquiridas foram analisadas no software Harmony (Perkin Elmer), versão 3.5.2. A análise das imagens consistiu na identificação e contagem de células Vero E6 com base na segmentação nuclear e infecção viral com base na coloração citoplasmática detectada pelo ensaio de imunofluorescência.

## **2- Resultados**

A observação por microscopia ótica demonstrou citotoxicidade do composto Phtalox apenas na Diluição Inicial 2,0mg/mL (P). Não foi observada citotoxicidade nas demais diluições. Não foi observado alteração no tapete celular (provável ausência de atividade viral) nas diluições 1:2 (1,0mg/mL) a 1:32 (6,25 x 10<sup>-2</sup> mg/mL). Estas observações em microscópio ótico foram confirmadas após a placa ser corada conforme pode ser observado na Figura 2.

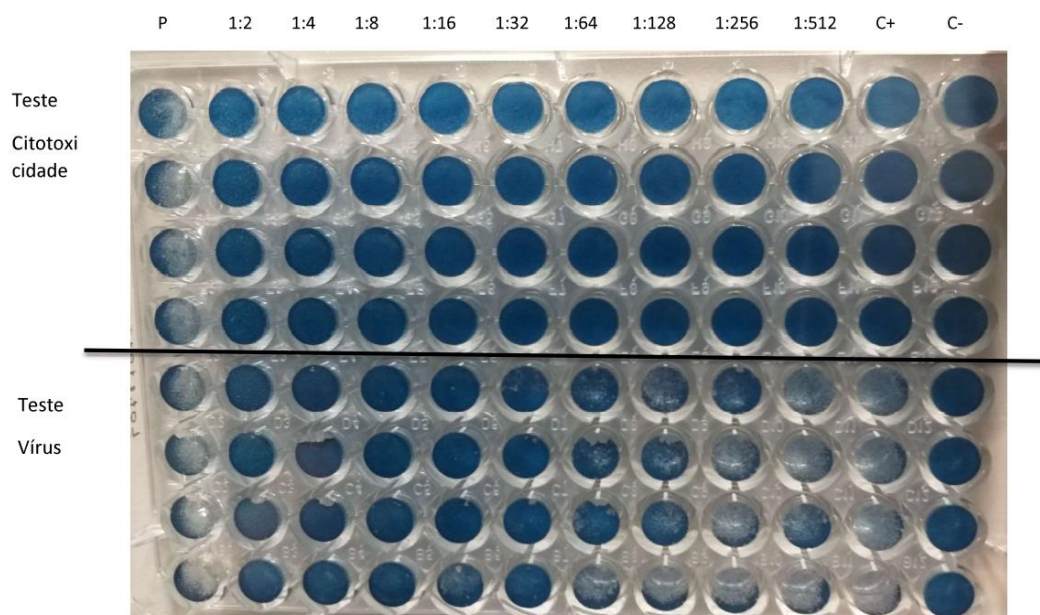


Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br

DEPARTAMENTO DE  
**MICROBiologia**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



**Figura 02:** Representação esquemática da leitura após fixação com “Naphtol Blue Black” para teste de inibição do SARS-CoV-2 em composto Phtalox.



Legenda: P (Diluição Inicial = 2,0mg/mL), C+ Controle Positivo, C- Controle Negativo

Após o crescimento em cultura celular por 72 horas, foi observada uma redução de significativa de Carga Viral na comparação com o Controle Positivo nas diluições 1:2 (99,96%), 1:4 (99,88%), 1:8 (99,84%) e 1:16 (92,65%).

Foi observada redução parcial de Carga Viral nas diluições 1:32 (77,42%) e 1:64 (11,06%). Não houve inibição viral a partir da diluição 1:128.

Os resultados de RT-PCR, representados por cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição referente à média das 04 réplicas realizadas estão representados na Tabela 01. Os resultados da reação de Imunofluorescência e o ensaio de citotoxicidade estão representados nas figuras 3 e 4.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
 São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
 e-mail: eldurigo@usp.br



**Tabela 01:** Diluição, cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição viral de Composto Phtalox submetido a Teste de Inibição do SARS-CoV-2.

Material	SARS-CoV-2 RNA cópias/mL	% de Inibição
Composto Puro	Citotóxico	-
1/2	8,95E+04	99,96%
1/4	2,65E+05	99,88%
1/8	3,65E+05	99,84%
1/16	1,64E+07	92,65%
1/32	5,05E+07	77,42%
1/64	1,99E+08	11,06%
1/128	2,23E+08	0%
Inóculo (0 h.p.i)	8,87E+04	-
Controle + (72 h.p.i)	2,24E+08	-
Controle -	Não detectável	-



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br

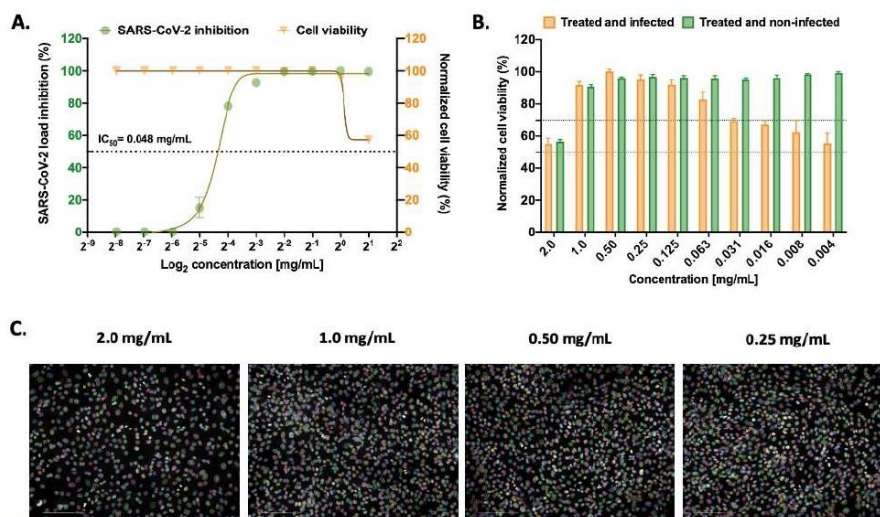


Figura.3: Atividade antiviral do composto Phtalox da Golden Technology contra ensaio in vitro de SARS-CoV-2. A. O Y- esquerdo eixo do gráfico representa a inibição percentual da carga de vírus nas células sobrenadante. As células Vero CCL-81 foram significativamente prejudicadas na presença de 2,0 mg / mL do composto Phtalox da Golden Technology, todas as outras concentrações não mostram citotoxicidade. As células foram tratadas com 8 concentrações de Phtalox (2,0 mg / mL a 0,004 mg / mL). B. Ensaio de imagem celular de alto rendimento (HTCI) para quantificação da viabilidade celular 72 horas após o tratamento e / ou infecção. A viabilidade celular foi normalizada para células não tratadas. Viabilidade abaixo de 70% (morte celular superior a 30%) foi considerada evidência de citotoxicidade. As barras de erro representam a média  $\pm$  SEM de duas experiências independentes realizadas em quadruplicado. C. Imagens representativas de células Vero tratadas com 2,0, 1,0, 0,50 e 0,25 mg / mL de XXX do ensaio HTCI baseado em imunofluorescência mostrando localização automatizada de núcleos de células com base em DAPI corado.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br

DEPARTAMENTO DE  
**MICROBiologia**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

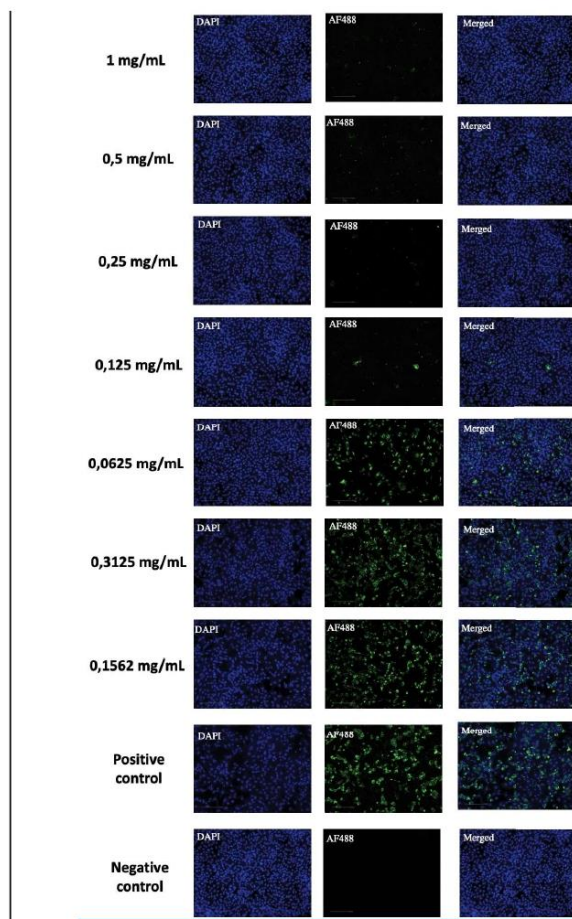


Figura 4. Ensaio de imunofluorescência indireta (IIF) para a detecção de células infectadas com SARS-CoV-2. Imagens representativas das concentrações não citotóxicas (1mg / mL até 0,1562mg / mL) do composto Phtalox da Golden Technology capturadas com uma objetiva 20x. Uma mistura de células Vero infectadas com SARS-CoV-2 e não infectadas foi corada com o anticorpo monoclonal de soro convalescente, seguido de incubação com o anticorpo IgG anti-humano de cabra conjugado com Alexa488 (verde). As células foram contrastadas com DAPI para coloração nuclear (azul). Os controles positivo (células infectadas não tratadas) e negativos (células não infectadas) são representados na parte inferior da imagem. As imagens foram tiradas usando o Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer). Barra de escala, 100  $\mu$ m.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
 São Paulo, SP – Brasil fone : 55 11 - 3091.7293  
 e-mail: eldurigo@usp.br



## Conclusão

Com base na observação de efeito citopático, resultados de RT-PCR e reação de Imunofluorescência indireta IFI foi observada redução significativa de Carga Viral – acima de 92% - nas diluições 1:2 (1,0mg/mL) a 1:16 (0,125 mg/mL) pelo **Composto Phtalox da Golden Technology** . Apenas a diluição inicial (2,0mg/mL) apresentou citotoxicidade na observação ao microscópio e após coloração.

## Referências

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):1–8.

Estamos à disposição para maiores informações.  
 Atenciosamente

---

Dra. Danielle Bastos Araujo  
 Pós – Doutoranda  
 Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Departamento de Microbiologia  
 ICB/USP

---

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon  
 Professor Titular  
 Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 Departamento de Microbiologia  
 ICB/USP

## Anexo 2 – Carta de aprovação do Hospital Universitário - UEL



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ  
GOVERNO DO ESTADO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
DIRETORIA SUPERINTENDENTE  
PARECER Nº508  
PROCESSO 7508.2020.30

À Pesquisadora

**Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni**

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título: **“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM ANTISSÉPTICO ORAL E SPRAY NASAL NA MELHORA DO QUADRO CLÍNICO, DIMINUIÇÃO DE CARGA VIRAL E SUA SUBSTANTIVIDADE EM PORTADORES DE SARS-COV-2”**, apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo.

Informamos que o nosso **parecer é favorável** à realização do projeto acima nominado, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.

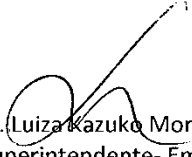
Atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CEP/UEL) para posterior operacionalização.

Conforme **Ofício Circular da Diretoria Superintendente do HU nº 214/2015**, a cópia do parecer de aprovação do CEP/UEL deverá ser apresentado à Chefia e/ou Gerente das unidades envolvidas antes do início da coleta de dados.

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria, para ciência e divulgação.

Em 31/08/2020

  
Dra. Luiza Kazuko Moriya  
Diretora Superintendente- Em Exercício

*Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa Científica (CAPEC) do HU*

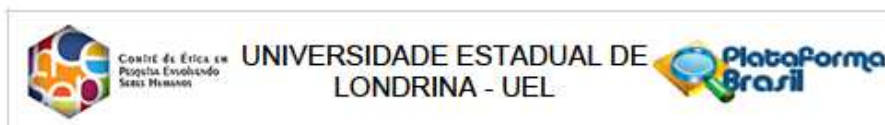
Fone: (43)3371-2301

e-mail: [pesquisahu@uel.br](mailto:pesquisahu@uel.br)

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380-Fone (43) 3371-4000 -PABX – Fax 328-4440 – Caixa Postal 6001 – CEP 86051-990 – www.uel.br  
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 -V.Operária - Fone (43) 3371-2000 PABX- Fax 3337-7495-CEP 86038-440- www.hu.uel.br

LONDRINA – PARANÁ – BRASIL

## Anexo 3 – Parecer Consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 37277420.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** FABIANO VIEIRA VILHENA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.325.882

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de coorte (longitudinal), randomizado e duplo-cego. O novo coronavírus, o SARS-CoV-2, é uma triste realidade que trouxe ao mundo uma pandemia, e tem levado a adoção de medidas sem precedentes à nível global. A transmissão do SARS-CoV-2 é por contato direto com as mucosas nasais, orais e oculares. Desta forma, 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. A detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é crucial no controle do surto na comunidade e nos hospitais, e 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. Além disso, 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. 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. A preocupação da contaminação pela boca, pode ser evitada com medidas de prevenção, sendo a manutenção de boa higiene bucal uma importante forma preventiva, assim, o antisséptico bucal tem atividade antimicrobiana e utilizado para gargarejar apresenta papel fundamental para prevenir e tratar infecções respiratórias superiores e

**Endereço:** LABESC - Sala 14  
**Bairro:** Campus Universitário  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970  
**Telefone:** (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.325.682

inferiores. Uma nova substância, patenteada de Phtalox®, desenvolvida na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), demonstrou redução da carga viral de SARS-CoV-2 e não apresenta efeitos tóxicos e carcinogênicos. Diante do exposto, é evidente que o momento é de extrema urgência no desenvolvimento de produtos eficazes e algumas situações apontam um caminho promissor. Neste estudo de coorte, serão selecionados 45 pacientes atendidos pelo setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Universitário com diagnóstico de COVID-19 subdivididos em 3 grupos: G1 (n=15), uso de antisséptico bucal contendo placebo + spray nasal placebo; G2 (n=15), uso de antisséptico bucal contendo PHTALOX® + spray nasal placebo; G3 (n=15), uso de antisséptico bucal contendo PHTALOX® + spray nasal contendo PHTALOX®. A detecção do SARS-CoV2 será realizada por reação semi quantitativa (carga viral) por RT-PCR em amostra de naso-orofaringe. Serão realizadas 3 avaliações: antes do início do estudo (D0 – dia zero), após 24 h (D1) e após 72 h (D3) após o início do estudo. O uso de antissépticos bucais terapêuticos poderá fornecer um tratamento auxiliar valioso. Além disso, apresenta como vantagens ser administrado localmente, poder reduzir a carga viral de SARS-CoV-2 e reduzir a microbiota nasofaríngea, que tende a revestir as partículas e gotículas de aerossol da superfície durante a tosse ou espirros, melhorando clinicamente o paciente infectado e reduzindo a contaminação do ambiente. Critério de Inclusão: Pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 a 70 anos, com diagnóstico de COVID-19 moderada a grave. Critério de Exclusão: mais do que 7 dias do início dos sintomas, necessidade de ventilação mecânica, intubação e UTI. A hipótese é que o uso do enxaguante bucal contendo PHTALOX® reduz a carga viral do SARS-CoV2 em acidentes com COVID-19 após 24 e 72 horas de uso.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a eficácia do antisséptico bucal individualmente, ou em associação com o spray nasal, contendo PHTALOX nos parâmetros clínicos e na carga viral em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2

Objetivo Secundário:

- Avaliar a melhora dos sintomas clínicos dos pacientes após o uso do antisséptico bucal;
- Avaliar a eficácia do antisséptico bucal na redução de carga viral em amostras de naso-orofaringe após o uso;
- Avaliar a eficácia do spray nasal na redução de carga viral em amostras de naso-orofaringe após o uso.

Endereço: LABESC - Sala 14  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970  
 UF: PR Município: LONDRINA  
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.325.682

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

"Riscos:

O tratamento experimental aqui proposto não acarretará qualquer risco à saúde do paciente e nem alteração de qualquer um dos tratamentos. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto durante o uso dos produtos propostos o participante será prontamente atendido e amparado pelas enfermeiras e/ou farmacêuticas responsáveis pela administração local do spray nasal e antisséptico bucal e um dos pesquisadores deste estudo.

Benefícios:

A participação neste estudo não resultará em benefícios diretos à você. No entanto, a participação contribuiu para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, resultando em benefícios para a sociedade como um todo."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

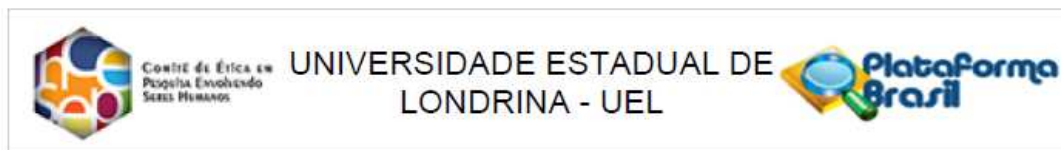
A pesquisadora apresentou folha de rosto assinada pela chefia de Departamento de Ciências Farmacêuticas, orçamento detalhado de R\$ 20 mil reais e declaração de patrocínio da Trial Saúde Bucal & Tecnologias. O cronograma prevê o início da coleta de dados para 01/09/2020. Apresentou também declaração de responsabilidade de armazenamento de material biológico humano em biorrepositório. Quanto aos riscos declara que tratamento proposto "não acarretará qualquer risco à saúde do paciente e nem alteração de qualquer um dos tratamentos" e " caso ocorra algum tipo de desconforto durante o uso dos produtos propostos o participante será prontamente atendido e amparado pelas enfermeiras e/ou farmacêuticas responsáveis pela administração local do spray nasal e antisséptico bucal e um dos pesquisadores deste estudo." Não foram mencionados a possibilidade de desconforto na coleta de material de naso-orofaringe, que será realizada por 3 vezes. O TCLE foi apresentado em forma de convite, em linguagem acessível porém não esclarece ao participante da pesquisa que o mesmo fará uso do spray nasal e do antisséptico bucal por cinco vezes ao dia, e como esses procedimentos serão realizados.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Para a aprovação a pesquisadora deverá:

1. Como não cabe análise ética de estudos já iniciados a pesquisadora deverá apresentar

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR Município: LONDRINA	
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.325.682

declaração de que não iniciou o estudo e fazer a correção no cronograma nas informações básicas.

**ANÁLISE:** A pesquisadora readequou o início do estudo para 05/10/2020 e fez a devida correção nas informações básicas.

**PENDÊNCIA RESOLVIDA**

2. Quanto ao produto:

- a. Esclarecer se é um novo fármaco;
- b. Situação do produto na ANVISA;
- c. Como vários antissépticos bucais são preconizados para serem utilizados por duas vezes ao dia por 30 segundos, esclarecer porque na metodologia estão previstos cinco aplicações diárias;
- d. Esclarecer se o produto já foi testado anteriormente nessas formulações em seres humanos e a concentração do mesmo no antisséptico bucal e no spray nasal.

**ANÁLISE:** A pesquisadora respondeu que "O produto utilizado nesta pesquisa é um derivado de Ftalocianina amplamente conhecido e utilizado na área de saúde e não é considerado um novo fármaco", "O produto é um derivado de Ftalocianina, com atividade antimicrobiana, registrado e aprovado junto a ANVISA sob o CAS 71667-29-3." e " A proposta deste estudo está em sintonia com a literatura a respeito de tratamento auxiliar a COVID-19." e acrescentou a devida bibliografia.

**PENDÊNCIA RESOLVIDA**

3. Nos riscos, citar a possibilidade de desconforto da coleta de material da naso-orofaringe e acrescentar essa informação nas informações básicas e no TCLE.

**ANÁLISE:** A pesquisadora não apresentou informações sobre esta pendência, nem na carta resposta ou nas informações básicas ou no TCLE.

**PENDÊNCIA NÃO RESOLVIDA**

4. Esclarecer nas informações básicas e no TCLE como os pacientes serão randomizados nos três grupos.

**ANÁLISE:** A pesquisadora esclareceu que um software de randomização fará a distribuição aleatorizada do número do Kit para cada paciente. A informação foi inserida no TCLE.

**PENDÊNCIA RESOLVIDA.**

5. Esclarecer nas informações básicas e no TCLE qual a composição do placebo nas duas apresentações.

**ANÁLISE:** A pesquisadora esclareceu a composição e a informação foi acrescentada no TCLE.

**PENDÊNCIA RESOLVIDA.**

6. No TCLE, esclarecer ao participante da pesquisa que o mesmo deverá fazer uso do spray nasal e

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.325.682

do antisséptico bucal por 5 vezes ao dia bem como serão realizados os procedimentos.

ANÁLISE: A informação foi acrescida no TCLE.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

7. Uniformizar as informações referentes ao número de participantes da pesquisa nas informações básicas e na brochura (45x60).

ANÁLISE: A pesquisadora informou que o número de participantes será de 45 e fez as devidas correções.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

PARA APROVAÇÃO DO ESTUDO A PESQUISADORA DEVERÁ RESPONDER A PENDÊNCIA NÚMERO 3 E ATENTAR PARA O CRONOGRAMA TENDO EM VISTA A TRAMITAÇÃO.

Pendência nº3. Nos riscos, citar a possibilidade de desconforto da coleta de material da naso-orofaringe e acrescentar essa informação nas informações básicas e no TCLE.

ANÁLISE: A informação "No entanto, esclarecemos que a coleta de amostra de naso-orofaringe para detecção do vírus pode causar desconforto ao paciente" foi acrescida ao TCLE e as informações básicas do estudo na plataforma Brasil no ítem RISCOS. O cronograma foi readequado para início do estudo em 12/10/2020.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresenta-Lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.325.682

- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1611728.pdf	04/10/2020 17:36:09		Aceito
Outros	CartaResposta2.pdf	04/10/2020 17:35:48	Andréa Name Colado Simão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLerevisado2.pdf	04/10/2020 17:34:06	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	13/09/2020 20:40:29	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCorrigido.pdf	13/09/2020 20:38:09	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaobancoatual.pdf	02/09/2020 12:54:39	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoAudrey.pdf	02/09/2020 12:26:46	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	HU.pdf	02/09/2020 12:22:25	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração do Patrocinador	Patrocinador.pdf	20/08/2020 12:00:59	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	20/08/2020 11:59:51	Andréa Name Colado Simão	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

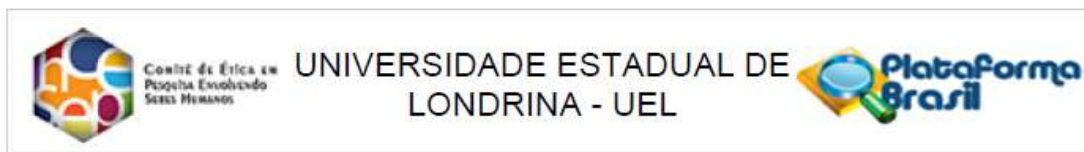
Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.326.682

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 07 de Outubro de 2020

---

**Assinado por:**

**Adriana Lourenço Soares Russo  
(Coordenador(a))**

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

**APÊNDICE - Manuscrito enviado para a revista GMS German Medical Science (ISSN 1612-3174) com 4.43 de fator de impacto.**

Original Research

**Effect of phthalocyanine oral and nasal antiseptic solutions on the infectivity of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A randomized controlled trial**

Authors' names: Luiza Mara Venâncio<sup>1</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2</sup>, Nicole Perugini Stadtlober<sup>2</sup>, Guilherme Lerner Trigo<sup>2</sup>, Pedro Luis Candido de Souza Cassela<sup>2</sup>, Thais Mastellini Sanches Silva<sup>2</sup>, Maria De Fátima Oliveira Hirth Ruiz<sup>2</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>2</sup>, Zuleica Naomi Tano<sup>2</sup>, Bernardo da Fonseca Orcina<sup>3</sup>, Fabiano Vieira Vilhena<sup>4</sup>, Paulo Sérgio da Silva Santos<sup>3</sup>, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni<sup>1</sup>.

Institutional affiliations:

1. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Londrina, Londrina – PR, Brazil.
2. Research Laboratory in Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina - PR, Brazil.
3. Department of Surgery, Stomatology, Pathology and Radiology of the Bauru School of Dentistry of University of São Paulo, Bauru – SP, Brazil.
4. TRIALS – Oral Health & Technologies, Bauru - SP, Brazil.

## **Abstract**

**BACKGROUND:** In individuals with coronavirus disease (COVID-19), the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral load (VL) plays an important role in infectivity.

**OBJECTIVES:** This study aimed to evaluate the reduction in the VL and infectivity induced by phthalocyanine mouthwash and nasal spray in patients with COVID-19.

**METHODS:** Patients with mild COVID-19 were recruited to participate in a triple-blinded randomized controlled trial. Participants were assigned to one of three groups: Group 1, nonactive mouthwash and saline nasal spray (SNS); Group 2, phthalocyanine mouthwash and SNS; and Group 3 phthalocyanine mouthwash and phthalocyanine nasal spray. VL was assessed in nasopharyngeal and oropharyngeal swabs collected at the time of clinical diagnosis at baseline and 24 and 72 hours after starting the rinsing protocols.

**FINDINGS:** Forty-six participants were included in the analysis, 15, 16, and 15 in Groups 1, 2, and 3, respectively. After 72 hours, the reduction in VL was significantly higher in Group 3 (mean cycle threshold (Ct) decrease:  $-11.21$ ) than in Group 1 (mean Ct decrease:  $-5.53$ ). Additionally, only the mean VL in Group 3 was reduced to a non-contagious level after 72 hours.

**MAIN CONCLUSIONS:** Use of phthalocyanine mouthwash and nasal spray is effective at reducing SARS-CoV-2 infectivity.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2 infection; infectivity; phthalocyanine; mouthwashes

Sponsorships: There was no source of financial support

## **Introduction**

The coronavirus disease (COVID-19) pandemic began in December 2019 in China and spread worldwide, causing serious consequences and prompting a race to search for drugs to treat and prevent the disease. The nasal and oral cavities contain a large number of angiotensin-converting enzyme<sup>(1)</sup> (ACE2) and TMPRSS<sup>(2)</sup> receptors, which serve as binding sites by which severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) enters cells. Once infected, person-to-person transmission can occur through human saliva, respiratory droplets, potentially through direct contact and fomites, and by speaking, coughing, sneezing, or breathing, and the respiratory droplets formed may contain a high viral load (VL).<sup>(3,4)</sup> The SARS-CoV-2 VL plays an important role in infectivity and transmission, in addition to affecting the body of infected individuals.<sup>(5-7)</sup> Faced with this situation, preventive measures are necessary, including paying attention to simple measures to promote oral and nasal hygiene. Antiviral solutions ranging from simple universal saline solutions to novel compounds have been proposed for mechanical and chemical oral and nasal antisepsis.<sup>(8-10)</sup> Recently, phthalocyanine has been proposed as an adjuvant gargling and rinsing therapy for the prevention and treatment of patients with SARS-CoV-2 infection.<sup>(11-13)</sup> This study aimed to evaluate the reduction in the VL

and infectivity induced by nasal and oral rinsing with phthalocyanine in patients with COVID-19.

## **Patients and Methods**

### *Study design*

Patients were recruited from the COVID-19 outpatient clinic of the University Hospital of Londrina-Paraná, Brazil, from November 1, 2020 to February 1, 2021. All participants provided written informed consent. The study protocol was approved by the Research Ethics Committees of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE 37277420.0.0000.5231), and the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

The study was a prospective randomized triple-blinded randomized controlled trial. The study was registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC) (RBR-8tygcz7) and complied with the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010 checklist. Participants were instructed to use nasal and oral rinsing protocols according to the following groups: Group 1, nonactive mouthwash and saline nasal spray (SNS); Group 2, phthalocyanine mouthwash and SNS; and Group 3, phthalocyanine mouthwash and phthalocyanine nasal spray. They were instructed to gargle for 30 s and rinse for 30 s with 5 mL of the mouthwash solution and to spray two pumps of the nasal spray into each nostril five times a day for three consecutive days. Participants' VLs were assessed using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-

PCR) on the first and third days of using the mouthwash and nasal spray. Each participant's adherence to the rinsing protocols was recorded.

The inclusion criteria were patients aged 18 to 80 years who tested positive for SARS-CoV-2, and were diagnosed within 7 days of symptom onset. The exclusion criteria included patients with Ct values greater than 31; and patients who had contraindications to using mouthwash or nasal spray for medical reasons or because of an inability to gargle and spit. All participants received standard care (antibiotics, corticosteroids, and anticoagulants) according to the World Health Organization standard treatment guidelines,<sup>(14)</sup> plus one of the three mouthwash and nasal spray interventions. The phthalocyanine mouthwash had the same formula (color, flavor, and other ingredients) as a nonactive mouthwash, except for the presence or absence of the active ingredient, and both were produced by Rabbit Corp, Brazil. A private dispensing pharmacy in Brazil produced the phthalocyanine nasal solution. Both solutions (phthalocyanine and SNS) were bottled in exactly the same type of container with a pump valve.

#### *Randomization and masking*

Sample randomization was performed as follows: The mouthwash bottles and nasal sprays were placed in consecutively numbered closed packages. An Excel (Microsoft, Redmond, WA, US) database was created from these numbered packages and used for randomization. After randomization, packages with mouthwash bottles, oral care kits (dental floss, toothbrush, and fluoride

toothpaste, Rabbit Corp, Brazil), and nasal sprays were delivered to the participants.

#### *RNA extraction and quantitative PCR for SARS-CoV-2*

Viral RNA was extracted from 100  $\mu$ L of nasopharyngeal or oropharyngeal swab, using the automated extractor, EXTRACTA 32 (Loccus, Cotia, Brazil), and magnetic bead extraction kits (MVXA-P016 FAST), following the manufacturer's instructions (Loccus, Cotia, Brazil). A negative extraction control (UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to each extraction run.

The diagnosis of SARS-CoV-2 infection and monitoring of VL were performed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using fluorescent probes (Taqman).<sup>(15)</sup> Nucleic acids were extracted from 120  $\mu$ L of nasopharyngeal or oropharyngeal swab collected by an experienced nurse using the EXTRACTA Kit FAST-DNA and viral RNA, following the manufacturer's instructions (Loccus, São Paulo, Brazil). The purified nucleic acid was reverse-transcribed into cDNA and amplified using the TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Applied Biosystems) and the QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, according to the manufacturer's instructions. The RT-PCR result was considered positive when two or more genes of SARS-CoV-2 (ORF1ab, N, and S) were present with cycle threshold (Ct) values less than 37. The mean Ct values of the three genes were used for the statistical analysis. Real-time RT-PCR Ct is a semiquantitative method of estimating the VL. The Ct value

represents the number of cycles required to identify the target gene<sup>(16)</sup> and is inversely related to the VL. The VL was classified as high, intermediate, or low, according to whether the Ct value was <25, 25–30, or >30, respectively.<sup>(5)</sup> According to Jaafar *et al.*<sup>(7)</sup>, infectivity, as defined by growth in cell culture, can be considered high when the RT-PCR Ct value is less than 25. In addition, approximately 85% of cultures have been shown to be negative if the Ct value is greater than 33. Thus, we considered samples with Ct values greater than 33 to have low infectivity.

### *Statistical analysis*

Initially, descriptive and exploratory analyses of all data were performed. Data were summarized as frequencies and percentages for categorical variables and as means and standard deviations or medians and interquartile ranges for continuous variables. Then, the three groups were compared using Fisher's exact test for categorical variables and generalized linear models for continuous variables (age and onset of symptoms). The Ct values met the assumptions for parametric analysis and were analyzed using generalized linear models for repeated measures. They were also analyzed for variations in the Ct value in relation to the baseline by one-way analysis of variance and Tukey's test. Finally, associations between groups and a classification of infectivity (high, intermediate, and low) were analyzed based on Ct values using Fisher's exact test. All analyses were performed using the R Core Team program (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), with a significance level of 5%. All tests were based

on the null hypothesis of the three interventions having an equivalent effect on the Ct value.

## Results

A total of 75 patients with mild COVID-19 were recruited for the study (Figure 1). Twenty-five patients were assigned to each group. After removing seven patients who did not satisfy the inclusion criteria, there were 22, 23, and 23 patients in Groups 1, 2, and 3, respectively (N = 68). After excluding patients who declined to participate or who discontinued the intervention, there were 15, 16, and 15 participants in Groups 1, 2, and 3, respectively, (N = 46) who completed the intervention and were included in the analysis.

As shown in Table I, there was no significant difference between the groups in terms of age and time since symptom onset. The patients' ages ranged from 20 to 66 years, with means of 33.9, 36.6 and 41.3 years in Group 1 (use of mouthwash containing placebo and SNS), Group 2 (use of mouthwash containing phthalocyanine and SNS), and Group 3 (use of phthalocyanine mouthwash and phthalocyanine nasal spray). There was also no difference between the groups in terms of sex distribution, presence of obesity, hypertension, diabetes, or other comorbidities.

The Ct values decreased significantly in all three groups (Table II). After 72 hours, the decrease in the Ct was greatest in Group 3 (11.21) and least in Group 1 (5.53).

Figure 2 shows the mean Ct values of the three groups over time, according to the degree of infectivity and the VL. All three groups had a high VL at baseline. Seventy-two hours after starting the rinsing protocols, Group 1 had an intermediate VL, and Groups 2 and 3 had a low VL. Only Group 3 had a mean Ct value showing reduced infectivity on day 3.

## Discussion

In the present study, all three groups experienced a decrease in Ct values over time, indicating a reduction in the VL. These results are in accordance with previous reports that gargling and rinsing with mouthwash, and rinsing the nasal cavity, are associated with a reduction in the SARS-CoV-2 VL<sup>(9,17)</sup>.

Considering that the highest VL can be found in the first week after symptom onset<sup>(18)</sup> a rapid reduction in the VL as soon as the patient is diagnosed with COVID-19 is important. SARS-CoV-2 VL is associated with markers of inflammation and disease severity.<sup>(19)</sup> In the presence of inflammation and severe disease, the WHO COVID-19 drug protocol recommends the use of additional therapies to reduce the VL, and a reduction in the VL can contribute to a better clinical outcome.<sup>(13)</sup> In this study, there was a threefold greater reduction in the VL in the first 24 hours and a greater than 1.5-fold greater reduction after 72 hours in the groups that used the phthalocyanine mouthwash (Groups 2 and 3) compared to the group that used nonactive mouthwash (Group 1). In addition, only in the groups that used the phthalocyanine mouthwash (Groups 2 and 3) had low VLs (Ct >30) 72 hours after starting the rinsing protocols. The use of

phthalocyanine solutions was shown to have a clinically important effect. Previous laboratory studies have shown greater than 90% reduction in the SARS-CoV-2 VL when samples were exposed to phthalocyanine.<sup>(13,20)</sup> In addition, clinical improvement using the adjuvant phthalocyanine gargling and rinsing mouthwash protocol was achieved, leading to a favorable asymptomatic outcome after a few days of use for both hospitalized and non-hospitalized COVID-19 patients.<sup>(11-13)</sup>

This study has some limitations. The sample size was limited. Furthermore, Ct values are semiquantitative and the RT-PCR evaluation only indicates the presence or absence of virus fragments. More precise results could be obtained if the evaluation measured the infective capacity of viable viruses after using the rinsing protocols.

In the present study, we adopted the measure of infectivity as previously described by Jaafar *et al.*,<sup>(7)</sup> based on a study in which more than 3700 samples were assessed for viral viability. The study results showed that samples with Ct values lower than 25 had high infectivity and samples with Ct values of 33 or more had reduced infectivity. Lowering infectivity reduces both the individual risk clinical worsening, and the risk of SARS-CoV-2 transmission other individuals. In our study, only the group that used both phthalocyanine mouthwash and phthalocyanine nasal spray (Group 3) showed reduced infectivity 72 hours after beginning the protocol.

## **Conclusion**

Nasal and oral rinsing with phthalocyanine antiseptic solutions can reduce the SARS-CoV-2 VL and reduce infectivity to low or non-contagious levels after 3 days of use. Further studies with larger sample sizes are required to confirm these results.

**Acknowledgements:** We thank Dr. Lucas Marques da Costa Alves, for his support in Infectious Diseases.

**Authors' Contributions:**

- Study design, article writing, data analysis, and final review – ANCS, FVV, BFO, PSSS.
- Study design – AASGL, ZNT.
- Data Collection – LMV, NPS, GLT, PLCSC, MFOHR, TMSS, MFOHR
- Data Analysis - MABL

**References**

1. Herrera D, Serrano J, Roldán S, Sanz M. Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? Clin Oral Investig. 2020;24(8):2925-2930. doi:10.1007/s00784-020-03413-2
2. Huang N, Pérez P, Kato T, Mikami Y, Okuda K, Gilmore RC, *et al.* SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. Nat Med. 2021;27(5):892-903. doi: 10.1038/s41591-021-01296-8.

3. Baghizadeh FM. Oral saliva and COVID-19. *Oral Oncol.* 2020;108:104821. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104821
4. Matson MJ, Yinda CK, Seifert SN, Bushmaker T, Fischer RJ, van Doremalen N, *et al.* Effect of Environmental Conditions on SARS-CoV-2 Stability in Human Nasal Mucus and Sputum. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(9):2276-2278. doi:10.3201/eid2609.202267.
5. 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.* 2021 Dec 6;73(11):e4197-e4205. doi: 10.1093/cid/ciaa851.
6. Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral cultures for COVID-19 infectious potential assessment - a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2020 Dec 3:ciaa1764. doi: 10.1093/cid/ciaa1764.
7. Jaafar R, Aherfi S, Wurtz N, Grimaldier C, Hoang TV, Colson P, *et al.* Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates *Clin Infect Dis.* 2021;72(11):e921. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>
8. Davidson BL, Tapson VF, Irwin RS, French CL, Elliott CG, Levi M. Pharyngeal Antisepsis to Reduce COVID-19 Pneumonia. *Am J Med.* 2021;134(3):297-298. doi:10.1016/j.amjmed.2020.12.001

9. Stathis C, Victoria N, Loomis K, Nguyen SA, Eggers M, Septimus E, *et al.*. Review of the use of nasal and oral antiseptics during a global pandemic. *Future Microbiol.* 2021 Jan;16(2):119-130. doi: 10.2217/fmb-2020-0286.
10. da Silva Santos PS, da Fonseca Orcina B, da Costa Alves LM, Cardoso de Oliveira R, Zangrando MR, Vilhena FV. A Recommendation of PHTALOX® Mouthwash for Preventing Infection and Progression of COVID-19. *Acta Scient Dent Sci.* 2020;4(12):111–112. doi: 10.31080/ASDS.2020.04.0991.
11. da Fonseca Orcina B, Vilhena FV, Cardoso de Oliveira R, da Costa Alves LM, Araki K, Toma SH, *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.
12. Orcina BF, Santos PSS. Oral Manifestation COVID-19 and the Rapid Resolution of Symptoms Post-Phtalox Treatment: a Case Series. *Int J. Odontostomat.* 15 (1), 67–70 (2021).
13. da Silva Santos PS, da Fonseca Orcina B, Machado RRG, Vilhena FV, da Costa Alves LM, Zangrando MSR, *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;11(1):19937. doi: 10.1038/s41598-021-99013-5.
14. World Health Organization. Clinical Management of COVID-19 – WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>. Accessed: 18 Jun 2021.

15. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, *et al.* detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PcR. *Euro Surveill* 2020;25(3):2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
16. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* 2020 Sep;9(3):573-586. doi: 10.1007/s40121-020-00324-3.
17. Burton MJ, Clarkson JE, Goulao B, Glennly A-M, McBain AJ, Schilder AGM, *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 of Systematic Reviews* 2020, Issue 9. Art. No.: CD013626. DOI: 10.1002/14651858.CD013626.pub2.
18. Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR: a guide for health protection teams. PHE publications gateway number: GW-1651PDF, 806KB, 12 pages. Accessed 21 June 2021. [\\_](#)
19. Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, Corry H, Wong C, Rosenthal A, *et al.*, Massachusetts Consortium for Pathogen Readiness. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun.* 2020;11(1):5493. doi: 10.1038/s41467-020-19057-5.
20. Santos C, da Fonseca Orcina B, Brito Reia VC, Ribeiro LG, Grotto RMT, Prudenciatti A, *et al.*. Virucidal Activity of the Antiseptic Mouthwash and Dental Gel Containing Anionic Phthalocyanine Derivative: In vitro Study.

Clin Cosmet Investig Dent. 2021 Jun 28;13:269-274. doi:  
10.2147/CCIDE.S315419.

## Tables and figures

Table I. Comparisons between groups regarding patient characteristics.

Variable	Group		
	G1 (n=15)	G2 (n=16)	G3 (n=15)
Age (years): Mean (standard deviation); Median (interquartile range); (minimum and maximum)	33.9 (13.7); 28.0 (24.0-47.0); (20.0-66.0)	36.6 (12.1); 31.0 (26.0-47.5); (23.0-56.0)	41.3 (11.8); 42.0 (31.0-51.0); (21.0-62.0)
p-value	0.2444		
Sex – Frequency (1%)			
Female	9 (60.0%)	12 (75.0%)	10 (66.7%)
Male	6 (40.0%)	4 (25.0%)	5 (33.3%)
p-value	0.6781		
Symptom onset (days): Mean (standard deviation); Median (interquartile range); (minimum and maximum)	5.3 (1.4); 6.0 (5.0-6.0); (1.0-7.0)	5.4 (1.2); 6.0 (4.5-6.0); (3.0-7.0)	5.6 (0.8); 6.0 (5.0-6.0); (4.0-7.0)
p-value	0.8124		
Obesity – Frequency (1%)			
Yes	2 (13.3%)	3 (18.8%)	7 (46.7%)
No	13 (86.7%)	13 (81.2%)	8 (53.3%)
p-value	0.1425		
Arterial hypertension – Frequency (1%)			
Yes	1 (6.7%)	2 (12.5%)	1 (6.7%)
No	14 (93.3%)	14 (87.5%)	14 (93.3%)

p-value	1.0000		
Diabetes			
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (6.7%)
No	15 (100.0%)	16 (100.0%)	14 (93.3%)
p-value	0.6522		
Other comorbidities –			
Frequency (1%)			
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (6.7%)
No	15 (100.0%)	16 (100.0%)	14 (93.3%)
p-value	0.6522		

. <sup>1</sup>Percentages in columns within each group; <sup>2</sup>For patients who were hospitalized. G1: use of mouthwash containing placebo + placebo nasal spray; G2: use of mouthwash containing PHTALOX® + placebo nasal spray; G3: use of mouthwash containing PHTALOX® + nasal spray containing PHTALOX®.

Table II. Mean (standard deviation); of the viral load estimated by the CT value (cycle threshold values) obtained in the PCR reaction as a function of the group and time.

Time	Group		
	G1 (n=15)	G2 (n=16)	G3 (n=15)
	Mean		
	Mean (standard deviation)	(standard deviation)	Mean (standard deviation)
<b>Time</b>			
Baseline (D0)	24.19 (6.13) Ac	21.51 (4.39) Ac	22.35 (4.28) Ac
After 24 hours (D1)	25.74 (4.29) Ab	26.42 (6.58) Ab	27.83 (6.15) Ab
After 72 hours (D3)	29.72 (5.53) Aa	30.46 (5.53) Aa	33.55 (5.15) Aa
p-value*	p(group)=0.6412; p(interaction)=0.2899		p(time)<0.0001;
<b>Variation in time</b>			
After 24 hours (D1) - (D0)	1.55 (5.54) A	4.91 (4.89) A	5.48 (5.33) A
p-value	p=0.0959		
After 72 hours(D3) - (D0)	5.53 (6.28) B	8.96 (4.01) AB	11.21 (4.35) A
p-value**	p=0.0113		

\*One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

\*\*Fisher's exact test

Different letters (upper case comparing horizontally between groups and lowercase comparing vertically between times) indicate statistically significant differences. G1: use of mouthwash containing placebo +

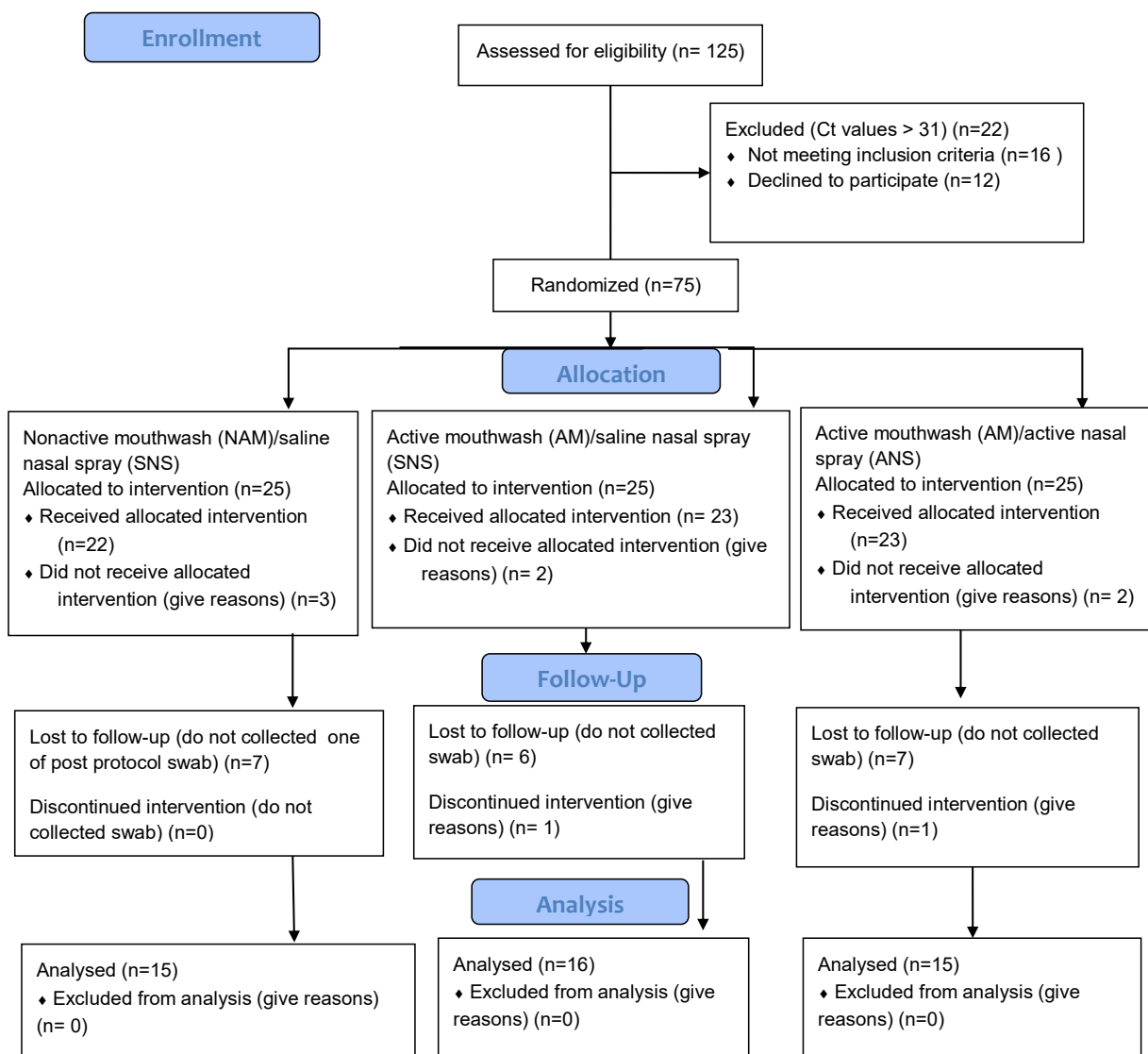
placebo nasal spray; G2: use of mouthwash containing phthalocyanine+ placebo nasal spray; G3: use of mouthwash containing phthalocyanine + nasal spray containing phthalocyanine.

## Figures

**Figure 1.** CONSORT flow diagram



### CONSORT 2010 Flow Diagram



**Figure 2.** Mean viral load, estimated by the CT value (cycle threshold values) obtained in the PCR reaction, as a function of group and time. G1: use of mouthwash containing placebo + placebo nasal spray; G2: use of mouthwash containing phthalocyanine+ placebo nasal spray; G3: use of mouthwash containing phthalocyanine + nasal spray containing phthalocyanine.

