

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS

JULIUS JOSÉ TEIXEIRA JOHANN PAUL

ESTRATÉGIAS MULTIDISCIPLINARES PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-

19

CAMPINAS

2022

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRITO SENSU* MESTRADO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE
JULIUS JOSÉ TEIXEIRA JOHANN PAUL

ESTRATÉGIAS MULTIDISCIPLINARES PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-

19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Doutor Augusto Etchegaray Júnior

CAMPINAS

2022

PESQUISADORES E INSTITUIÇÃO PARCEIRA

JULIUS JOSÉ TEIXEIRA JOHANN PAUL – Cirurgião-Dentista, aluno de pós-graduação do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Pesquisador principal responsável pelo desenho do estudo.

AUGUSTO ETCHEGARAY JÚNIOR – Químico, Professor Doutor permanente do Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas e Professor Doutor Docente de Cursos de Graduação da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Orientador do pesquisador principal.

HOSPITAL DA PUC-CAMPINAS – Instituição de realização da pesquisa.

Patrocinador – não se aplica.

Ficha catalográfica elaborada por Vanessa da Silveira CRB 8/8423
Sistema de Bibliotecas e Informação - SBI - PUC-Campinas

573.239
P324e

Paul, Julius Jose Teixeira Johann

Estratégias multidisciplinares para o enfrentamento da COVID-19 / Julius Jose Teixeira Johann Paul. - Campinas: PUC-Campinas, 2022.

65 f.: il.

Orientador: Augusto Etchegaray Júnior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Humanas e Sociais Aplicadas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Infecções respiratórias. 2. COVID-19 (doença). 3. Antissépticos bucais. I. Etchegaray Júnior, Augusto. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências Humanas e Sociais Aplicadas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD - 23. ed. 573.239

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIUS JOSÉ TEIXEIRA JOHANN PAUL

**ESTRATÉGIAS MULTIDISCIPLINARES PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-
19**

Dissertação defendida e aprovada em 24 de junho de
2022 pela Comissão Examinadora.



Augusto Etchegaray Júnior - Orientador da
Dissertação e Presidente da Comissão Examinadora
Pontifícia Universidade Católica de Campinas



Luís Antônio Peroni

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
(CNPEM)
Laboratório Nacional de Biociências, Campinas



Renata Kelly Mendes Valente

Pontifícia Universidade Católica de Campinas

RESUMO

Diante do impacto da COVID-19, este trabalho apresenta duas diferentes estratégias de enfrentamento à pandemia. A primeira, um ensaio clínico randomizado de grupos paralelos, com o objetivo de avaliar o efeito de um protocolo com enxaguante oral contendo óleos essenciais (LISTERINE®) frente a um grupo placebo, no tratamento auxiliar de pacientes hospitalizados pela COVID-19. Os desfechos analisados foram saturação de O₂, temperatura, frequência cardíaca e pressão arterial (sistólica e diastólica). Os resultados parciais, obtidos após análise dos dados de 12 pacientes, sugerem que 62 pacientes seriam necessários para encontrar diferenças estatisticamente significativas com relação à saturação de O₂, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica. A segunda estratégia foi baseada no estudo para auxiliar no monitoramento de pacientes infectados, utilizando um dispositivo analítico. Foram utilizados anticorpos monoclonais contra o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 e uma amostra do antígeno em ensaios eletroquímicos. Foram estudadas estratégias de imobilização dos anticorpos em nanopartículas magnéticas de ferro (@Fe₃O₄), as quais são de baixo custo. A metodologia de análise envolveu espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (ECV) recoberto com as nanopartículas funcionalizadas. Três estratégias foram utilizadas para fixação de anticorpos: a fixação sobre o compósito de nanopartículas e quitosana, a fixação sobre o compósito @Fe₃O₄ e albumina de soro bovino (BSA), na presença de glutaraldeído, e a adsorção direta sobre @Fe₃O₄. Nesta última estratégia observou-se uma diminuição da resistência, diretamente proporcional à concentração do antígeno, sugerindo que a queda da resistência de transferência de carga possa ser devido a um rearranjo molecular a partir da interação anticorpo/antígeno, ou devido a um processo de dessorção do anticorpo das nanopartículas devido a esta interação. Este resultado sugere que este método poderia ser utilizado para a confecção de um biossensor.

Palavras-chave: COVID-19, Enxaguante, Óleos essenciais, Espectroscopia de impedância eletroquímica.

ABSTRACT

Considering the impact of COVID-19, this work was based on two different alternatives to fight the pandemic. The first was a randomized clinical assay with two parallel groups. The aim was to evaluate the effectiveness of a protocol using mouthwash containing essential oils (LISTERINE®) in comparison to a placebo, to contribute to the management of patients at hospital due to COVID-19. The outcome was based on O₂ saturation, body temperature, cardiac frequency, and arterial pressure (systolic and diastolic). The partial results obtained after the analysis of data collected from 12 patients suggest that 62 patients would be needed to obtain statistically significant differences in connection with O₂ saturation, cardiac frequency, and systolic arterial pressure. The second strategy was a study to help monitoring infected patients using an analytical device. A monoclonal antibody against the RBD of the S protein of SARS-CoV-2, and a sample of the antigen, were used in electrochemical analysis. Strategies were evaluated for the immobilization of antibodies on magnetic iron nanoparticles (@Fe₃O₄), which are low-cost. The method was based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS), using vitreous carbon working electrodes, containing a layer of functionalized nanoparticles. Three strategies were used for the fixation of antibodies: the adsorption onto the composite of @Fe₃O₄ and chitosan, the covalent binding on bovine serum albumin (BSA) @Fe₃O₄ by reaction with glutaraldehyde, and the direct adsorption @Fe₃O₄. The last method presented a decrease in resistance, which is directly proportional to antigen concentration, suggesting that the decay of charge transference resistance is either due to molecular rearrangement that occurs because of the antibody/antigen interaction, or results from antibody desorption from nanoparticles due to the same interaction. These results suggest that this method could be used to produce a biosensor.

Keywords: COVID-19, Mouthwash, Essential oils, Impedance spectroscopy electrochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. CAVIDADE ORAL E SALIVA	12
1.2. ENXAGUANTES ORAIS.....	15
1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	15
1.4. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	17
2. JUSTIFICATIVA GERAL	19
CAPÍTULO 1 - ENSAIO CLÍNICO: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DE UM ENXAGUANTE BUCAL CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS (LISTERINE®) COMO AGENTE AUXILIAR NO TRATAMENTO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS POR COVID-19	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL:	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	20
3. HIPÓTESE NULA	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1. DESENHO DO ESTUDO	21
4.2. LOCAL DO ESTUDO	21
4.3. AMOSTRA.....	21
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
4.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	21
5. PROCEDIMENTOS.....	22
5.1. FOLLOW-UP.....	23
6. ALOCAÇÃO DA INTERVENÇÃO.....	23
6.1. CEGAMENTO.....	23
6.2. RANDOMIZAÇÃO.....	23
7. DESFECHOS	24
8. RESULTADOS PARCIAIS	24
8.1. MÉTODOS.....	24
8.2. RESULTADOS ENCONTRADOS.....	25
8.3. PROGRAMA COMPUTACIONAL UTILIZADO	25
9. DISCUSSÃO	25
10. CONCLUSÃO	26
CAPÍTULO 2 – BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO	28
1. INTRODUÇÃO.....	28

2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL:	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
3. METODOLOGIA	29
3.1. MATERIAL UTILIZADO	29
3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	29
3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO	31
3.3.1. FIXAÇÃO SOBRE NANOCOMPÓSITO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE FERRO	31
3.3.2. FIXAÇÃO DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM BSA	33
3.3.3. FIXAÇÃO DIRETA DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO	33
4. RESULTADOS	35
4.1. RESPOSTA DA INTERAÇÃO ANTICORPO/ANTÍGENO NO BIOSSENSOR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FIXADOS SOBRE O COMPÓSITO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE FERRO	35
4.2. RESPOSTA DA INTERAÇÃO ANTICORPO/ANTÍGENO NO BIOSSENSOR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FIXADOS SOBRE BSA ADSORVIDO A NANOPARTÍCULAS DE FERRO.	36
4.3. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S COM OS ANTICORPOS FIXADOS ÀS NANOPARTÍCULAS PELA LIGAÇÃO COVALENTE À BSA UTILIZANDO MICROBALANÇA DE QUARTZO	37
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES E ANEXOS	49
ANEXO 1: FOTOS ENXAGUANTES E PLACEBOS	49
ANEXO 2: QUESTIONÁRIO	50
ANEXO 3: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	51
ANEXO 4: TCLE	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

No final de 2019, foram relatados vários casos de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. Posteriormente, em janeiro de 2020, foi confirmado que essas pneumonias eram causadas por um beta coronavírus zoonótico similar aos vírus causadores de SARS e MERS, denominado SARS-CoV-2.

Apesar das tentativas de manter a doença em território chinês, devido à alta transmissibilidade, globalização e letalidade, o vírus se espalhou mundialmente, ocasionando um cenário de pandemia a partir do dia 11 de março de 2020, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (LUDWIG; ZARBOCK, 2020). Desde então, enormes desafios têm se apresentado às autoridades mundiais, gerando um contexto de desastre econômico, social e de saúde sem precedentes (MEYERS et al., 2020).

As manifestações de COVID-19 incluem desde portadores assintomáticos à doença fulminante, caracterizada, sobretudo, por sepse e insuficiência respiratória aguda. Este quadro clínico promovido pela doença pode ser explicado pelo fato do SARS-CoV-2 infectar e replicar de forma eficiente as células pulmonares (pneumócitos 1 e 2) (CHU et al., 2020), o que pode justificar porque mais de 75% dos pacientes hospitalizados requerem oxigênio suplementar (WIERSINGA et al., 2020). Além disso, na época, cerca de 5% a 20% dos indivíduos hospitalizados pela doença apresentaram sintomas graves e necessitaram de cuidados intensivos (WIERSINGA et al., 2020), sobrecarregando e desestabilizando os sistemas de saúde.

Mesmo países mais desenvolvidos como os Estados Unidos e o Reino Unido sofreram com a falta de infraestrutura para o suporte de pacientes com acometimento grave pela doença, especialmente antes das vacinas. A Itália, por exemplo, de acordo com o Istituto Superiore di Sanità da Itália, em novembro de 2020, viveu um quadro crítico no que diz respeito à relação entre o número de leitos disponíveis e o número de pacientes infectados pelo coronavírus, implicando em carência de recursos hospitalares disponíveis para pacientes com outras patologias. Além disso, a incidência de novos diagnósticos atingiu níveis muito generalizados em todo o país (MINISTERO DELLA SALUTE, 2020).

Atualmente, no mundo, em 3 de abril de 2022, foram registrados mais de 489 milhões de casos e mais de 6 milhões de mortes (OMS, 2022). Sendo que no Brasil, confirmam-se mais de 29 milhões de casos e o número de mortos se aproxima da casa dos 700 mil (Ministério da Saúde, 2022).

Em uma conjuntura global, contribuíram para este cenário caótico a alta transmissibilidade e letalidade do vírus, o tempo e o processo para o desenvolvimento e entrega de vacinas, além da ausência de tratamentos específicos para a doença, o que tornou necessária e emergencial a busca incessante por múltiplas alternativas estruturais, profiláticas e terapêuticas que minimizassem os efeitos negativos da COVID-19 no mundo. Diante desse paradigma, dentre outros setores da sociedade, assumiram papel primordial nesse contexto as instituições de ensino e pesquisa.

A Pontifícia Universidade Católica de Campinas, instituição que completou em 2021 80 anos de existência, é reconhecida por sua longa e exitosa trajetória nos campos de ensino e pesquisa. Sendo assim, por meio de seus diversos programas, possibilita condições ou subsídios suficientes ao corpo acadêmico para que participe ativamente das discussões e da produção de conhecimento e tecnologia nas mais variadas áreas do saber, inclusive, referente à COVID-19.

Por sua vez, o Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado em Ciências da Saúde oferecido pela PUC-Campinas, ao qual se insere o autor deste trabalho, tem objetivos que corroboram com esta afirmação, como por exemplo: capacitar docentes e pesquisadores com visão ampla, reflexiva e crítica, numa perspectiva interdisciplinar, biopsicossocial e humanista do processo saúde-doença. Além de serem capazes de atuar na intersecção de várias áreas do conhecimento do ensino superior, e ainda, possibilitar a formação de um mestre com integração de conhecimento e experiências interdisciplinares que superem as perspectivas das áreas particulares dos docentes do programa.

Também contribuem para esse processo multidisciplinar a formação anterior deste pesquisador, graduado em Odontologia com especialização na área de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial, além da formação e área de atuação de seu orientador, graduado em Química, Doutor em Bioquímica e que realiza pesquisas na interface entre Química, Bioquímica e Biotecnologia. Logo, a presente dissertação refletirá todo este contexto ao discutir o tema COVID-19 sob diferentes perspectivas

e abordagens, no que tange às áreas da Saúde e da Bioquímica, indo ao encontro da complexidade e dinâmica demandadas pela doença, uma vez que têm exigido uma multiplicidade de intervenções.

A partir da complexidade já descrita, discorreremos, nesta dissertação, inicialmente, sobre a aplicação de um ensaio clínico randomizado que versa sobre o uso de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE®) em pacientes hospitalizados pela COVID-19, e seus resultados parciais, seguindo com a elaboração de um biossensor eletroquímico para a detecção de SARS-CoV-2. Para tanto, fundamentamos, de forma didática, nos tópicos a seguir, os princípios que embasam tais iniciativas.

1.1. CAVIDADE ORAL E SALIVA

A cavidade oral abriga por volta de 700 espécies de microrganismos, principalmente bactérias, fungos e vírus, sendo que metade deles pode ser encontrada no periodonto e os demais em outros sítios, como mucosa, língua e superfície dental (PASTER et al., 2006). Dessa maneira, mantida a condição de equilíbrio dessa microbiota, evitam-se processos patológicos tanto locais, quanto sistêmicos. O inverso também é verdadeiro. Um estudo realizado por Foschi et al. (2006) promoveu a infecção de camundongos com *Treponema denticola*, que é um patógeno relacionado a alterações endodônticas. Após essa inoculação, além de perda óssea local e abscesso oral, foram observadas nos animais perda de peso e presença da bactéria no baço, coração e cérebro. Uma revisão sistemática publicada em 2021, elenca outras consequências sistêmicas provenientes de alterações do trato oral, como, por exemplo, abscesso cerebral, obstrução das vias aéreas, infecção carotídea, sinusite, septicemia, meningite, trombose do seio cavernoso, abscesso orbitário e perda de visão (AHMADI et al., 2021).

Sobre a relação específica entre o trato oral e a COVID-19, sabe-se que é uma doença causada por um vírus respiratório, transmitido sobretudo por meio de gotículas e aerossóis de rápida transmissão (emitidos ao falar, tossir ou espirrar) (MOOSAVI; AMINISHAKIB & ANSARI, 2020). Sendo assim, é notório que o trato oral consiste na principal fonte emissora de gotículas contaminantes e também na maior área

receptora de vírus do ambiente, além de reservatório crítico para SARS-CoV-2, sobretudo com relação às glândulas salivares, que apresentam significativa expressão de enzimas conversoras de angiotensina 2 (AC2+) (LIU et al., 2011), principal alvo do vírus no organismo humano (XIANTIAN et al., 2020). Liu et al. (2011), relataram, ainda, que a concentração de AC2+ era por volta de 1/5 maior na cavidade oral do que nos pulmões (LIU et al., 2011). Além disso, os mesmos autores ao estudarem em macacos rhesus a fisiopatologia de um pseudovírus similar ao SARS-CoV, evidenciaram que as células epiteliais dos ductos das glândulas salivares no trato respiratório alto são alvos precoces da infecção (LIU et al., 2011).

A saliva, produzida nas glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e menores, consiste em um fluido de composição complexa, de componentes orgânicos e inorgânicos, que desempenha funções fundamentais para o organismo como um todo. Pode ser dividida em duas porções: saliva ductal e saliva total. A primeira refere-se ao fluido estéril, presente no interior das glândulas salivares maiores e menores. Já a saliva total, além de englobar a saliva ductal, compreende também o fluido crevicular, as células descamadas da mucosa, as bactérias, outros microrganismos e seus metabólitos. Água e íons representam a composição inorgânica da saliva, enquanto a porção orgânica pode ser representada por enzimas, aminoácidos, imunoglobulinas, hormônios ou outros peptídeos (CHAGAS, 2019).

Ainda sobre os fatores detectáveis na saliva, sabe-se que esta representa, em termos percentuais, até 27% da composição do plasma, devido à grande vascularização das glândulas salivares. Podem ser detectados, segundo Ruhl, amilases, proteínas ricas em prolina, cistatinas, mucina 5B, IgA secretória, mucina 7, estaterinas, anidrase carbônica VI, histatinas, lisozimas, albumina sérica, componente secretor livre, IgG e IgM (RUHL, 2012). Entretanto, o perfil proteômico da saliva total e glandular em indivíduos saudáveis mostrou-se variável a depender do método de coleta utilizado (JASIM et al., 2016).

O próprio microrganismo e seu material genético também podem ser encontrados em amostras salivares. Inclusive, o diagnóstico de muitas doenças, como a COVID-19, por exemplo, tem sido feito a partir de amostras de saliva, isso porque torna-se um método menos invasivo e de aplicação mais simplificada. Ainda em

relação à COVID-19, esse tipo de teste permite a autoaplicação e o isolamento precoce do indivíduo acometido pela doença. Um artigo de revisão do ano de 2021, avaliou diferentes estudos com o objetivo de comparar o método padrão-ouro de detecção de SARS-CoV-2, ou seja, o *swab* nasofaríngeo (RT-PCR) com testes salivares de mesma finalidade e concluíram que os testes envolvendo saliva apresentaram grande semelhança com o teste padrão e, surpreendentemente, na maioria dos casos, os primeiros demonstraram maior sensibilidade para a detecção do vírus (CAIXETA et al., 2021).

Contudo, apesar do evidente papel crítico desempenhado pelo trato oral na transmissão, instalação e continuidade da doença, além da promissora e notória capacidade diagnóstica da saliva na detecção do vírus da COVID-19, ainda são insuficientes os estudos sobre combate, prevenção e detecção do coronavírus tendo como base essas temáticas.

Numa breve pesquisa realizada em 21 de abril de 2022, foi possível constatar essa realidade, uma vez que ao lançarmos, inicialmente, apenas o descritor “COVID-19” nas bases de dados Pubmed, Capes, Scielo e Lilacs, constatamos, respectivamente, a seguinte quantidade de estudos: 4.918, 403.232, 3.289 e 9.444. Por outro lado, ao associarmos os descritores “COVID-19 and oral cavity”, encontramos, respectivamente, um número bem menos expressivo: 33, 2.978, 5 e 25. Inclusive, ainda hoje, o site da Organização Mundial da Saúde reflete esse paradigma ao não fazer qualquer menção ou alusão à importância da saúde bucal no contexto de prevenção contra a COVID-19, mesmo que esteja subentendido em muitas das medidas preventivas preconizadas pela instituição, o papel preponderante da cavidade oral na transmissão da doença. Sabe-se, atualmente, que em comparação com as medidas de 2020 referidas pelo site, como a higienização de superfícies, objetos, ambientes (WHO, 2020a) e das mãos (HEALTH et al., 2020), assim como o distanciamento social e o uso de máscaras (WHO, 2020b), somente foi adicionada a vacinação como nova forma de prevenção. Nesse sentido, parece-nos notória e de extrema necessidade a busca por mais estudos que versem sobre esse assunto.

1.2. ENXAGUANTES ORAIS

Há tempos é conhecida a eficácia de produtos de higiene oral na redução de microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos e vírus. Sabe-se, por exemplo, que reagentes específicos presentes em enxaguantes bucais demonstraram comprovada ação antiviral imediata (CARROUEL et al., 2020), além de apresentarem substantividade (efeito residual). Meiller et al. (2005), ao submeterem 40 pacientes do grupo teste ao enxágue com um produto contendo óleos essenciais, por 30 segundos, observaram redução da carga viral de Herpes tipos 1 e 2 nos fluidos orais por pelo menos 30 minutos após o enxágue.

Além disso, tendo como base a ação antiviral e a substantividade de enxaguantes, protocolos de biossegurança para o atendimento em consultórios odontológicos vêm sendo estabelecidos para a proteção do cirurgião dentista, da sua equipe e dos seus pacientes (MENG; HUA; BIAN, 2020). Inclusive, em 2021, houve recomendação da American Dental Association (ADA) para o uso de bochechos pré-procedimento com iodopovidona (PVP-I; 0,2%) antes de qualquer procedimento oral, fortalecendo a segurança contra a COVID-19 (GANDHI et al., 2022).

Ademais, outros estudos também demonstraram o impacto positivo da higiene oral com enxaguantes na redução da pneumonia nosocomial em pacientes hospitalizados. Uma revisão sistemática da literatura com metanálise, encontrou resultados significativos que corroboram com esses achados e os autores concluíram que a higiene oral é importante para a redução de casos de pneumonia associada à ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (UTIs) (HUA et al., 2016).

1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, presentes em alguns enxaguantes orais, são misturas complexas de baixo peso molecular, extraídas de plantas com diversas propriedades terapêuticas, dentre elas, antibacterianas, antimutagênicas, antiinflamatórias, antifúngicas e antivirais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). São utilizados há séculos pelos seres humanos (WILKIN et al., 2020). O mentol, por exemplo, tem sido utilizado na medicina tradicional asiática para o tratamento de doenças respiratórias (ASIF et al., 2020).

Diversos óleos e seus derivados, inclusive, têm demonstrado ação eficaz na inativação do vírus SARS-CoV-2 *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*. Um estudo *in silico* que avaliou vários óleos essenciais, dentre eles o timol, mostrou potencial para inibir a subunidade S1 da proteína S (spike) do SARS-CoV-2, responsável por interagir com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (KULKARNI; KUMAR; RAMESH, 2020). Além disso, outros estudos *in vitro* e *ex vivo* demonstraram propriedades imunomodulatórias do eucaliptol (outro óleo essencial) capazes de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias de monócitos e macrófagos (SADLON; LAMSON, 2010) (JUERGENS; WORTH; JUERGENS, 2020) atenuando, assim, o estado hiperinflamatório (cascata de citocinas) relatado por Merad et al. (2020) em pacientes graves acometidos pela COVID-19. Outros autores observaram ainda que os enxaguantes bucais com óleos essenciais agem antes da adsorção do vírus nas células, por meio da capacidade dos óleos essenciais de interferir na bicamada fosfolipídica dos coronavírus, o que provoca o deslocamento do envelope viral (WIŃSKA et al., 2019). XU et al. (2020), por sua vez, relataram bloqueio completo da infectividade viral de um pseudovírus de SARS-CoV-2 através da administração de uma diluição de 50% (V/V) de enxaguante contendo óleos essenciais *in vitro* (XU et al., 2020). Ademais, também são relatadas em outros estudos as propriedades odoríferas (capacidade de agir à distância) desses óleos, seu potencial de otimizar outros agentes antivirais e fornecer alívio de alguns sintomas dessa doença (DA SILVA et al., 2020), além de sua propriedade miorrelaxante (SOARES et al., 2005) (BASTOS et al., 2011).

Outros argumentos relevantes que pesam a favor de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE®) no cuidado de pacientes com comprometimento pulmonar, baseiam-se nas propriedades desses óleos como a capacidade mucolítica e broncodilatadora (JUERGENS; WORTH; JUERGENS, 2020). Outrossim, a volatilidade, característica desses óleos, a qual proporciona sua capacidade odorífera (BAKKALI et al., 2008) pode ser de fundamental importância na descontaminação das cavidades anatômicas infectadas.

Tendo em vista o exposto, apesar da ação antimicrobiana de produtos orais e óleos essenciais já estarem consolidadas na literatura, isoladamente, poucos estudos têm buscado validar a higiene oral a partir de enxaguantes bucais contendo esses

óleos como alternativa profilática e/ou terapêutica para o combate à COVID-19. Uma recente revisão da literatura, baseada nas recomendações da American Dental Association (ADA) e do Center for Disease Control and Prevention (CDC), corrobora com essa afirmação, uma vez que os estudos incluídos ao final dessa revisão apenas sugeriram, para a proteção em consultório odontológico durante procedimentos pré-operatórios, o uso de enxaguatórios bucais antimicrobianos contendo gluconato de clorexidina (CHX), cloreto de cetilpiridínio (CPC), iodopovidona (PVP-I) ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (VERGARA-BUENAVENTURA A.; CASTRO-RUIZ, 2020).

1.4. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Com o intuito de fornecer novos subsídios aos métodos tradicionais para o diagnóstico de patógenos, como PCR e ELISA, a pesquisa de biossensores vem há tempos ganhando força no universo acadêmico. Compete a um biossensor o fornecimento de informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas, bem como medições que prescindem de etapas de processamento ou o uso de reagentes adicionais, o que faz deste método, em comparação aos primeiros, ser de menor custo, rápida execução e apresentar maior praticidade (CESEWSKI; JOHNSON, 2020).

Ainda sobre o mecanismo de funcionamento dos biossensores, sabe-se que consistem em dispositivos analíticos capazes de detectar reações biológicas a partir da mensuração de um sinal de saída equivalente à quantidade do substrato analisado. Em um biossensor eletroquímico, três elementos são fundamentais: um elemento de reconhecimento de natureza biológica, um sistema de transdução e um dispositivo de leitura. Na presença de uma amostra biológica detectável, com uma extrema afinidade química ao elemento de reconhecimento funcionalizado, dá-se a ligação de interesse. Em muitos exemplos, estuda-se a formação de um complexo imune, com consequente emissão de um sinal (IMRAN; AHMADI; KERMAN, 2021).

No diagnóstico do HIV, por exemplo, os biossensores surgiram como estratégia adicional para identificar o vírus a partir de proteínas ou do genoma específico do HIV, abrindo novas perspectivas para o monitoramento. No geral, para detecção dessa enfermidade, era utilizada a técnica ELISA, entretanto, esse método depende de

infraestrutura complexa, de qualificação técnica específica e da formação de anticorpos para análise, o que só acontece após algumas semanas de infecção. Além disso, os biossensores eletroquímicos também são úteis e populares no diagnóstico do Zika-vírus, uma vez que a técnica envolvendo o genoma desse vírus é muito sensível em diferenciá-lo dos vírus da dengue e de outros vírus parecidos, o que permite o diagnóstico em estágios precoces (IMRAN; AHMADI; KERMAN, 2021).

Já no âmbito da pandemia da COVID-19, os biossensores eletroquímicos podem assumir um papel de grande relevância, isto porque a testagem ampla da população tem sido, desde o início, uma das principais estratégias para o controle do vírus, inclusive, países que apostaram na estratégia de testagem em massa dos seus habitantes, tal como a Alemanha e a Coreia do Sul, são exemplos no controle da doença (IMRAN; AHMADI; KERMAN, 2021). Ocorre, no entanto, que nos períodos iniciais da pandemia e mesmo hoje, não há disponibilidade de testes para grande parte da população mundial. Ainda, a maioria dos testes disponíveis exigem certa complexidade, sobretudo o padrão-ouro de testagem (RT-PCR). A implementação de um teste para COVID-19 baseado em um biossensor eletroquímico pode amenizar esse contexto, promovendo testes de menor custo, autoaplicáveis e passíveis de atingir populações de maior vulnerabilidade.

Dentro dos biossensores eletroquímicos, as técnicas de voltametria e espectroscopia de impedância têm sido utilizadas com sucesso no desenvolvimento de imunossensores, sensores que utilizam anticorpos como elemento de reconhecimento biológico. A detecção por técnicas eletroquímicas possui alta sensibilidade (KUDR et al., 2021).

Na voltametria, monitora-se o fluxo de elétrons através do eletrodo, sendo que no meio reacional é colocado um sistema redox como o ferricianeto de potássio (HIRBODVASH, 2021). Na determinação de impedância, os dispositivos são desenhados de forma a conter uma camada com a molécula de reconhecimento sobre a superfície do eletrodo. A partir da aplicação de voltagem ou corrente no sistema, verificam-se as mudanças de impedância que ocorrem quando o analito se liga ao sistema receptor (RADHAKRISHNAN et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA GERAL

A pandemia ocasionada pelo surgimento do vírus SARS-CoV-2 promoveu e ainda promove desafios de alta complexidade nos mais variados setores da sociedade. O papel das instituições de ensino superior, assim como de seu corpo docente, é participar ativamente das discussões e produção de conhecimento científico no que diz respeito ao enfrentamento da COVID-19.

Com relação às diferentes estratégias abordadas neste trabalho, salienta-se que refletem o caráter multidisciplinar característico do Mestrado em Ciências da Saúde, o perfil dinâmico próprio da doença, além do universo plural no que tange à formação dos pesquisadores envolvidos.

CAPÍTULO 1 - ENSAIO CLÍNICO: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DE UM ENXAGUANTE BUCAL CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS (LISTERINE®) COMO AGENTE AUXILIAR NO TRATAMENTO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS POR COVID-19

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista o que já foi apresentado, o presente estudo partiu para a sua primeira linha de intervenção, que consistia na aplicação de um protocolo com um enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE®), associado à terapêutica convencional, nos pacientes hospitalizados por COVID-19 no Hospital da PUC-Campinas. Esta intervenção tem possível potencial benéfico, uma vez que o uso de enxaguantes bucais pode fornecer um nível adicional de proteção aos pacientes hospitalizados por atuarem diretamente em um dos principais locais de recepção e transmissão de coronavírus - o trato oral - e minimizar, assim, os impactos severos da COVID-19 no indivíduo acometido. Conseqüentemente, os impactos negativos também na sociedade.

Vale salientar que a opção destes pesquisadores pela formulação não alcoólica do enxaguante LISTERINE® no decorrer deste estudo (ainda que o álcool sabidamente seja um componente eficaz contra o vírus SARS-CoV-2) deve-se ao fato de que as reações adversas provenientes do uso de enxaguantes bucais que contêm

óleos essenciais, relatadas pela literatura, são atribuídas a este elemento (álcool) (HIKIBA et al., 2005) (ZAMORA-PEREZ et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o impacto da aplicação de um protocolo com um enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE®) como agente auxiliar no tratamento dos pacientes diagnosticados com COVID-19 em internação hospitalar na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Acompanhamento dos sinais vitais (saturação de O₂, temperatura, pressão arterial (sistólica e diastólica) e frequência cardíaca) dos pacientes hospitalizados durante a internação em enfermaria enquanto houver uso de enxaguante oral;
- Instituição de tal terapêutica no cuidado de pacientes hospitalizados pela doença em caso de resultados favoráveis;
- Subsidiar novas pesquisas que versem sobre a temática;
- Inevitavelmente, resultados estatísticos significativos também resultarão em benefícios socioeconômicos, como redução de custos hospitalares e maximização do retorno laboral para o indivíduo acometido.

3. HIPÓTESE NULA

A hipótese nula deste trabalho consiste na não efetividade do protocolo com enxaguante contendo óleos essenciais (LISTERINE®) como agente auxiliar no tratamento de pacientes hospitalizados pela COVID-19.

4. METODOLOGIA

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Ensaio clínico randomizado.

4.2. LOCAL DO ESTUDO

Enfermaria (Bloco 3 - Setor COVID Convênios/Particulares) do Hospital PUC-Campinas.

4.3. AMOSTRA

Foram incluídos no estudo pacientes que por meio de testes específicos positivaram para COVID-19 e foram hospitalizados na enfermaria do bloco 3 do Hospital da PUC-Campinas, com idade igual ou superior a 18 anos, divididos a partir da randomização dos frascos (placebo e enxaguante). Todos os pacientes ou devidos responsáveis desta pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme modelo em anexo.

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes que por meio de testes específicos foram confirmados para COVID-19 e hospitalizados na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas, com idade igual ou superior a 18 anos. Ademais, os pacientes deveriam estar orientados e serem capazes de bochechar a solução. Tais participantes são de ambos os sexos, com ou sem comorbidades associadas.

4.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Como critérios de exclusão, tem-se o uso de ventilação mecânica, história prévia de reação alérgica a quaisquer substâncias testadas, reações adversas aos produtos durante o estudo, gestantes, além de participantes que desistiram da pesquisa.

4.6. COLETA DE DADOS

A coleta de dados se iniciou a partir da anuência do paciente por meio do TCLE. A partir disso, houve o preenchimento de um questionário de anamnese e o

acompanhamento de parâmetros clínicos dos pacientes diariamente, conforme protocolo padrão da enfermagem local e enquanto houvesse internação (modelo em anexo). Esses dados foram organizados para análise estatística, a fim de caracterizar e comparar a evolução de parâmetros clínicos.

5. PROCEDIMENTOS

Diante da aprovação prévia pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), deu-se prosseguimento ao estudo da seguinte maneira:

Após serem encaminhados para internação hospitalar, os pacientes diagnosticados com COVID-19 por meio de testes específicos foram convidados a participar da pesquisa pelo pesquisador responsável e, diante, do aceite e assinatura do TCLE, em um primeiro momento, receberam os frascos randomizados e guardados em envelope pardo por meio de sorteio. Tais pacientes também receberam instruções verbais e escritas para a terapêutica adicional com enxaguante.

No Grupo Controle, os pacientes receberam 10 ml de solução placebo, sem o princípio ativo, para enxague oral por 30 segundos em copo descartável; no Grupo Teste, os pacientes receberam 10 ml do enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE® zero álcool) para enxague oral por 30 segundos. Esse protocolo foi aplicado 4 vezes ao dia, de 6 em 6 horas, durante os dias de internação hospitalar em enfermaria sem intubação. O estudo caracterizou-se por ser um ensaio clínico paralelo, pois comparou, simultaneamente, dois grupos de indivíduos, um dos quais recebeu a intervenção de interesse (enxaguante bucal contendo óleos essenciais (LISTERINE®)) e o outro foi um grupo controle negativo (placebo). O enxágue foi feito pelo próprio paciente após instruções disponibilizadas previamente, sendo, inclusive, destacada a necessidade de descartar os produtos após o uso para que não houvesse ingestão dos mesmos. Tais produtos foram dispensados pelos profissionais assistentes (equipe de enfermagem).

A efetividade do protocolo foi avaliada com base nos parâmetros clínicos já descritos.

Os autores foram responsáveis pela concepção do ensaio, por compilar os dados e garantir o envio ao estatístico.

5.1. FOLLOW-UP

O presente estudo acompanhou 12 pacientes internados na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas, com diagnóstico positivo para COVID-19 durante todo o período de internação em que não houve intubação e/ou UTI. Devido ao fato da amostragem ser obtida por demanda, o “N” da pesquisa foi construído gradativamente.

6. ALOCAÇÃO DA INTERVENÇÃO

6.1. CEGAMENTO

Para este estudo, os pacientes, médicos, técnicos de enfermagem e enfermeiros (aplicadores), além da equipe de análise estatística foram cegados para soluções e grupos (característica triplo-cego). Para tanto, a solução do controle negativo (placebo) foi composta por Nipagim (0,1%), mentol (0,04%), cloreto de sódio (0,078%) e água deionizada qsp (100%), de maneira a aumentar ao máximo as semelhanças organolépticas entre as soluções. Além disso, ambas as soluções foram armazenadas em recipientes idênticos, rotulados com código numérico e embaladas em envelope pardo.

6.2. RANDOMIZAÇÃO

Os enxaguantes comerciais (LISTERINE®) foram entregues na Farmácia da PUC-Campinas para a profissional responsável, juntamente com a formulação do placebo que fora elaborada pela professora Gisele do curso de Farmácia da PUC-Campinas. A partir dessa formulação, seguiram-se uma série de testes buscando aproximar o produto placebo o máximo possível das características organolépticas do enxaguante de referência (LISTERINE®). Daí, seguiu-se o envase dos frascos transparentes, sendo que de maneira aleatória foram numerados de 1 a 80, sendo

que ao final, havia 40 frascos de placebo e 40 frascos de enxaguante contendo óleos essenciais. Posteriormente, cada frasco foi inserido em envelope pardo para maximizar o cegamento dos envolvidos.

A partir do aceite em participar da pesquisa, um dos envelopes, de maneira aleatória, era entregue ao paciente, sendo que cabia a este informar ao pesquisador o número contido no frasco recebido.

7. DESFECHOS

Foram analisados os seguintes parâmetros clínicos dos pacientes da pesquisa: saturação de O₂, temperatura, pressão arterial (sistólica e diastólica) e frequência cardíaca.

8. RESULTADOS PARCIAIS

8.1. MÉTODOS

Cada desfecho (saturação de O₂, Temperatura, Frequência Cardíaca e Pressão Arterial (sistólica e diastólica)) foi medido 4 vezes durante 5 dias, totalizando 20 medições. Como alguns pacientes receberam alta no 4^o ou 5^o dia, foram considerados apenas os 3 primeiros dias de todos os pacientes, a fim de manter o mesmo número de medições entre eles, portanto foram usadas 12 medições. Para cada desfecho e paciente foi construída uma curva com as 12 medições e então calculada a área sob essa curva, utilizando a aproximação pela regra dos trapézios. Quanto maior a área total, maiores foram as medidas daquela variável ao longo do tempo, portanto, quanto maior o valor da área de O₂, melhor o resultado desse desfecho, quanto maior o valor da área da Temperatura, pior o resultado desse desfecho, por exemplo.

O nível de significância e poder da amostra considerado no cálculo amostral foi de 5% e 80%, respectivamente.

8.2. RESULTADOS ENCONTRADOS

Um total de 12 pacientes compõem a amostra piloto. A Tabela 1 apresenta a média (desvio padrão) da área sob a curva para cada desfecho e grupo, além do p-valor da comparação entre os grupos e número mínimo de pacientes necessário em cada grupo para encontrar diferença significativa entre os grupos, sob a hipótese de que, ao completar a amostra, a variação continuará semelhante.

Para cada desfecho há um número mínimo de pacientes, pois cada desfecho tem sua própria variação. Avaliando a tabela 1 nota-se que 62 pacientes em cada grupo é um número razoável para detectar diferenças para **O₂**, **FC** e **PAS**. Assim, exemplificando a Tabela 1, observa-se que 37 pacientes no Grupo Teste e no Grupo Controle seriam necessários para serem encontradas diferenças significativas com relação à saturação de oxigênio. Por outro lado, 459 pacientes em cada grupo seriam necessários para se observar diferenças com relação ao parâmetro temperatura.

Tabela 1 – Cálculo amostral para comparação entre os dois grupos

Variável	Grupo A	Grupo B	p-valor	N em cada grupo
AC_O2	1048 (9.57)	1040 (14.1)	0.373	37
AC_T	402 (4.13)	403 (6.42)	0.861	459
AC_FC	875 (140)	819 (67.8)	0.377	62
AC_PAS	1309 (80.8)	1260 (94.6)	0.410	52
AC_PAD	802 (52.4)	782 (63.3)	0.619	134

8.3. PROGRAMA COMPUTACIONAL UTILIZADO

R versão 4.1.0. Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing.

9. DISCUSSÃO

A doença do coronavírus vem promovendo desafios constantes à comunidade científica, sendo que os ensaios clínicos randomizados que abordam a temática ainda são escassos. Uma pesquisa no Pubmed na data de 22 de maio de 2022, correlacionando os descritores “COVID-19 and mouthwashes” e sob o filtro “ensaios clínicos nos últimos 5 anos”, retornou apenas 15 artigos. O uso de um enxaguante bucal como agente auxiliar no tratamento de pacientes hospitalizados pela COVID-19 pode apresentar contribuições significativas no contexto da doença.

As tendências demonstradas pelos resultados parciais neste trabalho podem ser consequência das afirmações de JUERGENS; WORTH; JUERGENS (2020), no que diz respeito à capacidade mucolítica e broncodilatadora dos óleos essenciais e ainda, de sua propriedade odorífera (volatilidade), afirmada por BAKKALI et al. (2008). Segundo afirmam os primeiros autores, inclusive, o eucaliptol pode ser um grande adjuvante no tratamento da asma e da DPOC, sendo estas, doenças inflamatórias crônicas.

Já SOARES et al. (2005) e BASTOS et al. (2011) se aprofundaram nessa questão ao discutirem sobre a participação do eucaliptol no tratamento da DPOC, frisando inclusive o papel miorreaxante deste óleo essencial. SOARES et al. (2005) observaram que este óleo poderia induzir um efeito inotrópico negativo em tecidos cardíacos, da traqueia e dos brônquios de roedores, ao bloquear o influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCCs).

Ao realizar um ensaio clínico semelhante, SANTOS et al. (2021) reforçam a importância da terapêutica auxiliar com enxaguantes orais no tratamento de pacientes hospitalizados pelo coronavírus. Os pesquisadores aplicaram um protocolo com enxaguante a base de ftalocianinas cinco vezes ao dia e observaram resultados expressivos entre os grupos teste e controle, havendo, inclusive, maior necessidade de UTI e mortalidade no último. Entretanto, diferentemente desses autores, DI DOMÊNICO et al. (2021) realizaram um ensaio clínico em pacientes hospitalizados adicionando um enxaguante a base de peróxido de hidrogênio à terapêutica convencional e não encontraram resultados estatisticamente satisfatórios para os seus desfechos.

O fato é que os estudos que versam sobre essa temática ainda após dois anos de pandemia são insuficientes e necessitam de aprofundamento diante das poucas e ainda desconexas evidências sobre o uso de enxaguantes orais a base de óleos essenciais para a prevenção e tratamento de pacientes acometidos pela COVID-19.

10. CONCLUSÃO

Diante do evidente papel crítico do trato oral e da saliva no contexto da transmissão e agravamento da COVID-19 e ainda, das evidências científicas em favor dos enxaguantes orais e óleos essenciais, esperamos que o aprofundamento de estudos que utilizem esses princípios possam subsidiar as autoridades e a comunidade médico-odontológica além da científica, no manejo do coronavírus sob uma perspectiva de prevenção mas também como agente auxiliar no tratamento considerando que a terapêutica com enxaguante não consta em nenhuma estratégia proposta pelos órgãos de interesse.

Com relação especificamente a esse trabalho, concluímos que as mudanças próprias do contexto pandêmico, como o advento da vacinação da população, por exemplo, dificuldades na logística entre a instituição de ensino e o hospital, além de certa inexperiência por parte deste pesquisador, impactaram na descontinuidade da pesquisa. A promoção de melhores condições num contexto futuro pode subsidiar pesquisas desta natureza de maior qualidade.

CAPÍTULO 2 – BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO

1. INTRODUÇÃO

Considerando a pandemia da COVID-19, diversas estratégias de enfrentamento têm sido utilizadas no Brasil, entre elas a extensão da cobertura vacinal, com a aplicação de pelo menos 3 doses na grande maioria da população. Adicionalmente, vários grupos de pesquisa têm avaliado a criação de métodos analíticos de baixo custo, entre eles, o desenvolvimento de biossensores. Esta proposta tem o objetivo de contribuir neste sentido, visando determinar a aplicação de anticorpos de baixo custo, disponíveis comercialmente para construção de um dispositivo simples baseado na técnica de impedância eletroquímica. Desta forma, este capítulo descreve a identificação da melhor estratégia identificada em nossas condições de laboratório.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral deste estudo foi determinar, entre três estratégias de funcionalização, qual seria a mais apropriada para se utilizar anticorpos monoclonais produzidos comercialmente no Brasil, para a detecção do domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Determinar a melhor configuração para o dispositivo, avaliando uma estratégia simples e barata para imobilizar o anticorpo anti-proteína S.
- Testar a imobilização sobre o compósito de nanopartículas funcionalizadas com quitosana.
- Testar a imobilização sobre albumina de soro bovino, utilizando glutaraldeído.
- Testar a imobilização por adsorção direta de anticorpos sobre nanopartículas magnéticas de ferro (@Fe₃O₄).

3. METODOLOGIA

3.1. MATERIAL UTILIZADO

Kit de imunodeteção de proteína C reativa (PCR) adquirido da Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil. Anticorpos monoclonais produzidos em camundongo contra o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 foram adquiridos da Rheabiotech, Campinas, SP na concentração de 1 mg/mL, conteúdo total de 250 microgramas. Da mesma forma, anticorpos policlonais foram produzidos em coelhos contra o mesmo domínio RBD proteína S de SARS-CoV-2 foram adquiridos da Rheabiotech na concentração de 1 mg/mL, conteúdo total de 250 microgramas. O domínio RBD da proteína S, obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, foi gentilmente doado pela Rheabiotech, Campinas, SP. Nanopartículas magnéticas de ferro (@Fe₂O₃) em suspensão aquosa foram gentilmente cedidas pela profa. Dra. Renata Kelly Mendes Valente, da Faculdade de Química, PUC-Campinas. Albumina de soro bovino (BSA), quitosana e glutaraldeído foram adquiridos da Sigma Aldrich. O tampão de lavagem (*wash-buffer*) utilizado em alguns experimentos foi adquirido junto com o Kit de imunodeteção de Proteína C Reativa (PCR), adquirido da Sigma Aldrich. Este tampão corresponde ao tampão fosfato de sódio, normalmente utilizado nos ensaios de ELISA, o qual é preparado na concentração 50 mmol/L, pH 7.4 e contém Tween 20 (0.5%). Outro tampão utilizado corresponde ao sistema tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7,0. Demais reagentes utilizados eram de grau analítico e foram adquiridos da Sigma Aldrich, Quimis ou Reagen, Brasil.

3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Foram utilizados equipamentos comuns disponíveis no laboratório para o preparo de soluções como balanças analíticas e pHmetro. Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizados com o equipamento Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 204 da AUTOLAB, utilizando-se o modo de impedância FRA32M. Foi utilizado um eletrodo de trabalho que consiste em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) recoberto com nanopartículas magnéticas de ferro funcionalizadas. Este eletrodo foi adaptado a uma célula eletroquímica de 3 mL, junto a um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata em KCl 3 mol/L e um

eletrodo auxiliar consistindo em um fio de platina. O sistema de trabalho pode ser visualizado na Figura 1. As condições de trabalho envolveram um sinal aplicado com uma onda senoidal de amplitude de 10 mV e frequência variando entre 0.1 Hz a 1 MHz. Para análise dos dados o equipamento utiliza um computador com software Nova 2.1.4. Para avaliar a interação anticorpo imobilizado e antígeno em solução também foi utilizada uma microbalança de quartzo (QCM), QCM 200 Stanford Research Systems, com cristal de quartzo de 5 MHz, recoberto com eletrodo de ouro. As medidas foram realizadas em célula de fluxo com o auxílio de uma bomba de infusão (Samtronic) trabalhando em um fluxo de 0,4 mL por minuto. O Eletrodo da microbalança e a bomba de infusão utilizados podem ser visualizados na Figura 2. O equipamento foi utilizado em parceria com o Dr. Wyllerson Evaristo Gomes, pós-doutorando do CEATEC, PUC-Campinas e o experimento foi realizado no Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), laboratório de física de interfaces, coordenado pelo Prof. David Mendes Soares.

Figura 1. Sistema de trabalho para determinação de espectroscopia de impedância. A esquerda (A), a minicélula adaptada sobre um frasco de vidro, contendo os eletrodos conectados ao potenciostato (PGSTAT 204 da AUTOLAB). A direita (B), outra visão do potenciostato e o sistema de controle, um computador equipado com o software Nova 2.1.4.

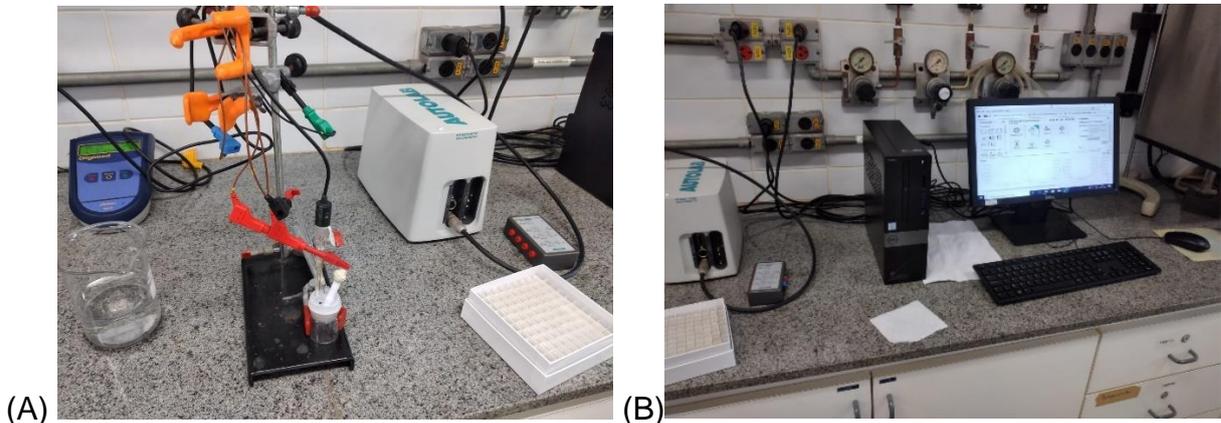
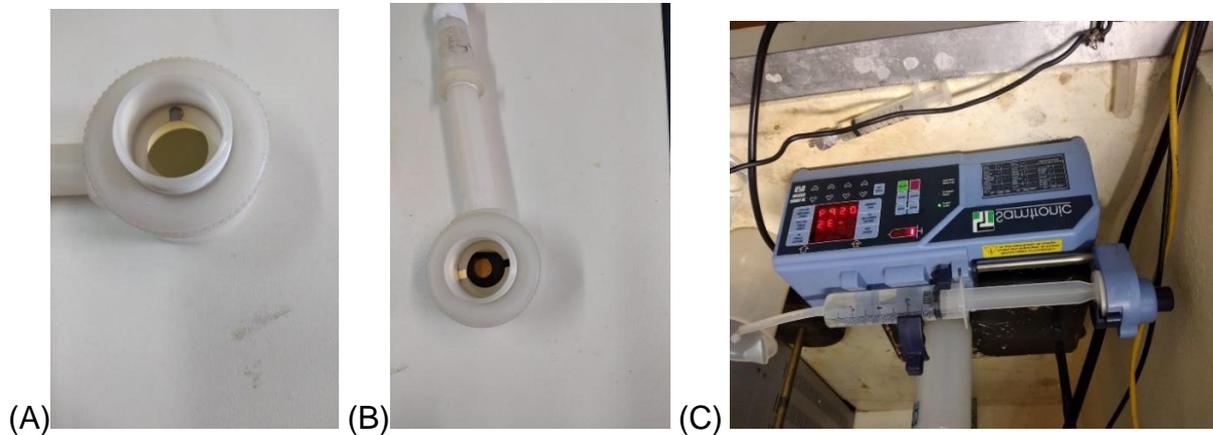


Figura 2. Equipamento utilizado na avaliação da interação do anticorpo com antígeno utilizando a técnica de microbalança de quartzo. O eletrodo da microbalança de quartzo é composto por um cristal de quartzo recoberto com ouro. À esquerda, eletrodo com superfície livre (A) e à direita, eletrodo recoberto com nanopartículas magnéticas de ferro funcionalizadas com anticorpo contra a proteína S (B). Em (C), a bomba de infusão utilizada no experimento.



3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO

Três estratégias para fixação de anticorpos foram avaliadas: a fixação sobre o composto de nanopartículas e quitosana, a fixação sobre albumina de soro bovino (BSA) na presença de glutaraldeído e a adição direta. Os métodos específicos serão descritos a seguir.

3.3.1. FIXAÇÃO SOBRE NANOCOMPÓSITO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE FERRO

Inicialmente as nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) foram coletadas após agitação do frasco formando suspensão. Neste processo foram recolhidos 100 μL da suspensão, os quais foram lavados 3 vezes com tampão wash buffer, utilizando-se um ímã para coletar o precipitado de nanopartículas em cada etapa de lavagem. Paralelamente foi preparada uma solução de quitosana em ácido acético conforme descrito a seguir. Em um tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 9,0 mg de quitosana, 200 microlitros de ácido acético glacial e 1,8 mL de tampão fosfato (*wash buffer*). Nestas condições foi necessário aquecer a mistura a 60°C e agitar em um vórtex até se obter uma solução. A mistura obtida apresentou alta viscosidade. Então a suspensão de nanopartículas equilibrada em tampão fosfato e a solução de quitosana foram misturadas na proporção de 100 microlitros de nanopartículas e 90

microlitros de solução de quitosana 4,5 mg/mL. Após incubar a temperatura ambiente durante 50 min com agitação manual a cada 5 min, a suspensão foi precipitada na presença de um ímã e as nanopartículas foram lavadas com wash buffer e ressuspensas no mesmo tampão. O produto desta reação corresponde a um nanocompósito de nanopartículas e quitosana. A uma suspensão de 100 microlitros deste nanocompósito foram adicionados anticorpos monoclonais contra proteína S na concentração de 10 µg/mL, de acordo com o trabalho de (GANGANBOINA; DOONG, 2019). Os anticorpos foram adquiridos na concentração de 1 mg/mL e então diluídos em tampão *wash buffer*, descrito acima. Os anticorpos foram adicionados diretamente sobre as nanopartículas visando avaliar o resultado da sua interação com a proteína S, a partir da construção de um biossensor sobre um eletrodo de carbono vítreo. O eletrodo foi preparado a partir do tratamento da superfície por polimento conforme descrito a seguir. Inicialmente o eletrodo foi lavado com água deionizada e polido em uma flanela contendo uma suspensão de alumina de 0,3 micrômetros (0,3 µm), durante 2 min. Posteriormente o eletrodo foi lavado novamente com água deionizada e levado a um banho de ultrassom na frequência de 40Hz e potência de 60 W, em água deionizada, por 5 min. Após foi lavado mais uma vez com água destilada e etanol e seco ao ar, metodologia adaptada de (GANGANBOINA; DOONG, 2019). Após o polimento e lavagem, a superfície do eletrodo foi tratada com uma suspensão de nanopartículas funcionalizadas com quitosana e anticorpos contra a proteína S. Para tanto, foram adicionados 20 microlitros da suspensão de nanopartículas sobre a superfície do eletrodo e o material foi deixado em uma capela por 30 a 50 min até secar completamente, formando uma camada sobre o eletrodo de carbono vítreo (Figura 3).

Figura 3. Fotografia do eletrodo de carbono vítreo após modificação da superfície pela adição de nanopartículas funcionalizadas com quitosana e anticorpos.



3.3.2. FIXAÇÃO DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM BSA

Partindo-se de 100 microlitros de suspensão de nanopartículas, a superfície foi preparada para adição de BSA e glutaraldeído em pH alcalino. Após 3 lavagens com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, as nanopartículas foram ressuspensas no mesmo tampão (100 microlitros) e a esta suspensão foi adicionada uma solução de BSA 1%. A mistura foi incubada na temperatura ambiente por 1 hora. Sequencialmente, foram feitas 3 lavagens com 500 microlitros de tampão fosfato pH 8,0 e então adicionada uma mistura de anticorpos monoclonais contra proteína S e glutaraldeído 1% em tampão fosfato, pH 8,0. Essa mistura foi incubada na temperatura ambiente por 30 min e durante 13 h a 4°C. Após a incubação, as nanopartículas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de tampão fosfato, pH 7,0 e utilizadas na construção do biossensor, utilizando-se 20 microlitros da suspensão, adicionada diretamente sobre o eletrodo. Após secagem, na temperatura ambiente e na capela, o dispositivo foi utilizado como biossensor. As determinações foram feitas a partir da adição do antígeno (proteína S), diretamente sobre o biossensor, seguida de evaporação e introdução do eletrodo na célula eletroquímica de 3 mL. Esta preparação também foi utilizada para caracterização do sistema anticorpo antígeno por microbalança de quartzo.

3.3.3. FIXAÇÃO DIRETA DE ANTICORPOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO

Partindo-se de uma suspensão de nanopartículas (100 microlitros), foram realizadas 3 lavagens com tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 e a suspensão foi ressuspensa no mesmo tampão. Na sequência, foram adicionados 300 microlitros da solução de anticorpos monoclonais contra proteína S na concentração 10 microgramas/mL. A mistura foi incubada durante 30 minutos na temperatura ambiente, seguida de 13 h a 4°C. Após a incubação, a suspensão foi lavada 5 vezes com 1 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. Foram utilizados 20 microlitros da suspensão para a produção do biossensor, os quais foram adicionados à superfície do eletrodo. O

eletrodo foi seco com o auxílio de um fluxo de ar comprimido controlado para evitar a perda do material. Após completa secagem, o biossensor foi utilizado para as determinações de espectroscopia de impedância. Da mesma forma, foi preparado um biossensor com proteína C reativa, para avaliar comparativamente o padrão de resposta de um biossensor com anticorpos interagindo com um antígeno proteico.

O sistema de ensaio empregado pode ser visualizado na Figura 1. Foi utilizada uma célula eletrolítica com capacidade de até 5 mL. Neste caso, utilizamos um volume reduzido, de 3 mL do mesmo tampão. As curvas analíticas foram preparadas com proteína S diluída a partir da solução estoque fornecida pela Rheabiotech, na concentração inicial de 0,25 mg/mL. Novas soluções estoque foram preparadas a partir da diluição respectivamente de 1 μ L, 5 μ L e 10 μ L em um volume final de 1 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. As diluições foram denominadas de S₁ (1 μ L em 999 μ L de tampão); S₅ (5 μ L em 995 μ L) e S₁₀ (10 μ L em 990 μ L). Considerando-se a concentração inicial de proteína S 0,25 mg/mL, a diluição S₁ corresponde a 250 ng/mL, a diluição S₅ (1250 ng/mL) e a diluição S₁₀ (2500 ng/mL).

Nos experimentos envolvendo adição do antígeno diretamente sobre a superfície do eletrodo contendo anticorpos, especificamente para o biossensor de anticorpos fixados sobre BSA com glutaraldeído, foi utilizada a diluição S₁, a qual foi diluída 3.000 vezes, para uma concentração final de 0,083 ng/mL.

Na análise por microbalança de quartzo, as condições de análise ocorreram conforme descrito a seguir. Uma alíquota de 20 microlitros da suspensão de nanopartículas contendo anticorpo monoclonal fixado sobre BSA na presença de glutaraldeído foi depositada sobre o eletrodo de ouro. O sistema utilizou uma célula de fluxo dado por uma bomba de infusão com fluxo de 0,4 mL/min. Após estabilização do sistema foram feitas 5 aplicações de 10 microlitros da diluição S₁ de proteína S, seguida de 3 aplicações da diluição S₅. O intervalo entre as adições da diluição S₁ foi de 500 segundos. Na utilização da diluição S₅ foi utilizado um intervalo de 1000 segundos.

4. RESULTADOS

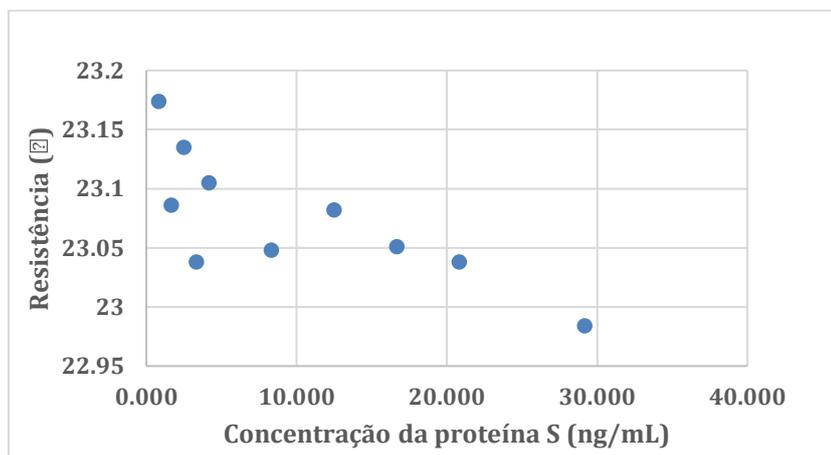
4.1. RESPOSTA DA INTERAÇÃO ANTICORPO/ANTÍGENO NO BIOSSENSOR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FIXADOS SOBRE O COMPÓSITO DE QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE FERRO.

Os dados da Tabela 1 e curva da Figura 4 demonstram o comportamento da interação anticorpo antígeno para este sistema. As diluições S₁, S₅ e S₁₀ foram utilizadas. Verifica-se que os pontos iniciais não apresentam uma resposta linear. Adicionalmente, verifica-se no gráfico uma tendência a diminuição da resistência a medida em que o antígeno interage com o anticorpo ligado à superfície.

Tabela 1. Determinação da resistência na superfície do eletrodo pelo método da impedância eletroquímica.

Adição	Proteína S (massa total (ng))	Concentração final da proteína S (ng/mL)	Resistência (W) (t=0)
10 uL de S1	2.5	0.833	23.174
10 uL de S1	5	1.667	23.086
10 uL de S1	7.5	2.500	23.135
10 uL de S1	10	3.333	23.038
10 uL de S1	12.5	4.167	23.105
10 uL de S5	25	8.333	23.048
10 uL de S5	37.5	12.500	23.082
10 uL de S5	50	16.667	23.051
10 uL de S5	62.5	20.833	23.038
10 uL de S10	87.5	29.167	22.984

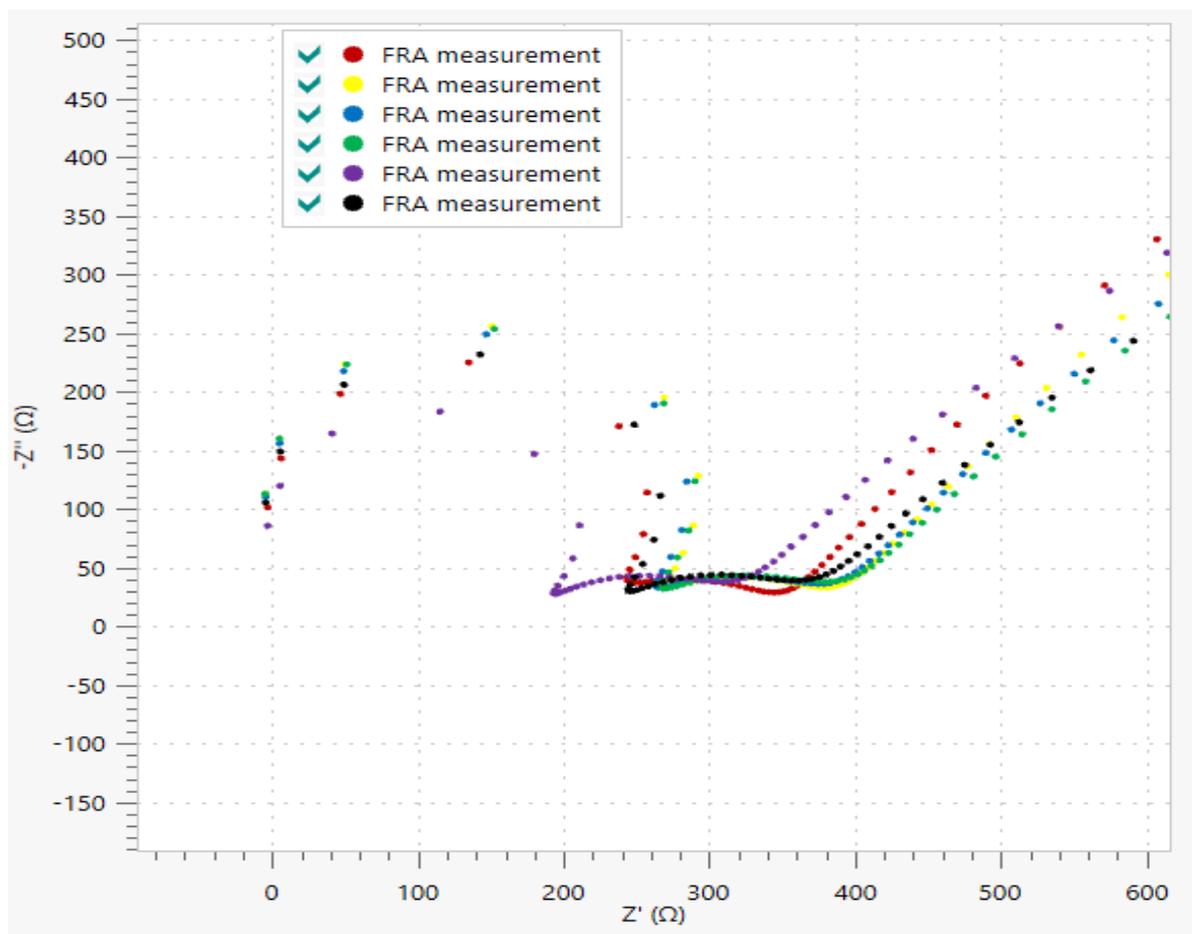
Figura 4. Gráfico da resistência em função da concentração da proteína S.



4.2. RESPOSTA DA INTERAÇÃO ANTICORPO/ANTÍGENO NO BIOSSENSOR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FIXADOS SOBRE BSA ADSORVIDO A NANOPARTÍCULAS DE FERRO.

Os resultados podem ser visualizados na Figura 5, que mostra as curvas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) demonstrando que não há linearidade em função da adição de antígeno. As curvas correspondem ao biossensor sem adição de antígeno (vermelho) e adição sequencial de 5 microlitros de antígeno na concentração de 0,083 ng/mL. Foram realizadas 5 adições de antígeno, somando-se um total de 25 microlitros. Portanto, a curva amarela, corresponde a 5 microlitros; a curva azul, corresponde a 10 microlitros; a curva verde (15 microlitros); curva roxa (20 microlitros) e curva preta (25 microlitros). Na região da dupla camada (semicírculo) verifica-se inicialmente um aumento da impedância, seguido de queda linear, sugerindo rearranjos moleculares ou lixiviação dos anticorpos.

Figura 5: Curvas de EIE relativas à adição de antígeno diretamente na superfície do biossensor.

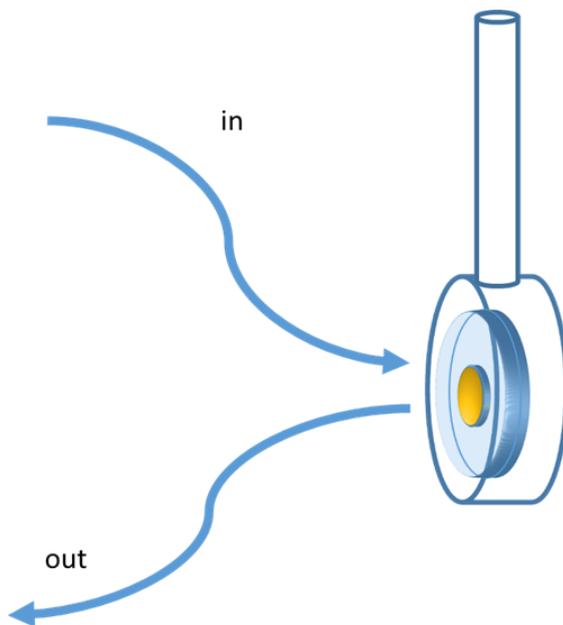


Na região da dupla camada (semi-círculo) verifica-se inicialmente um aumento da impedância, seguido de queda linear, sugerindo lixiviação dos anticorpos. Após a retirada do eletrodo verificou-se a queda parcial de nanopartículas, realmente demonstrando que ocorreu lixiviação.

4.3. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S COM OS ANTICORPOS FIXADOS ÀS NANOPARTÍCULAS PELA LIGAÇÃO COVALENTE À BSA UTILIZANDO MICROBALANÇA DE QUARTZO.

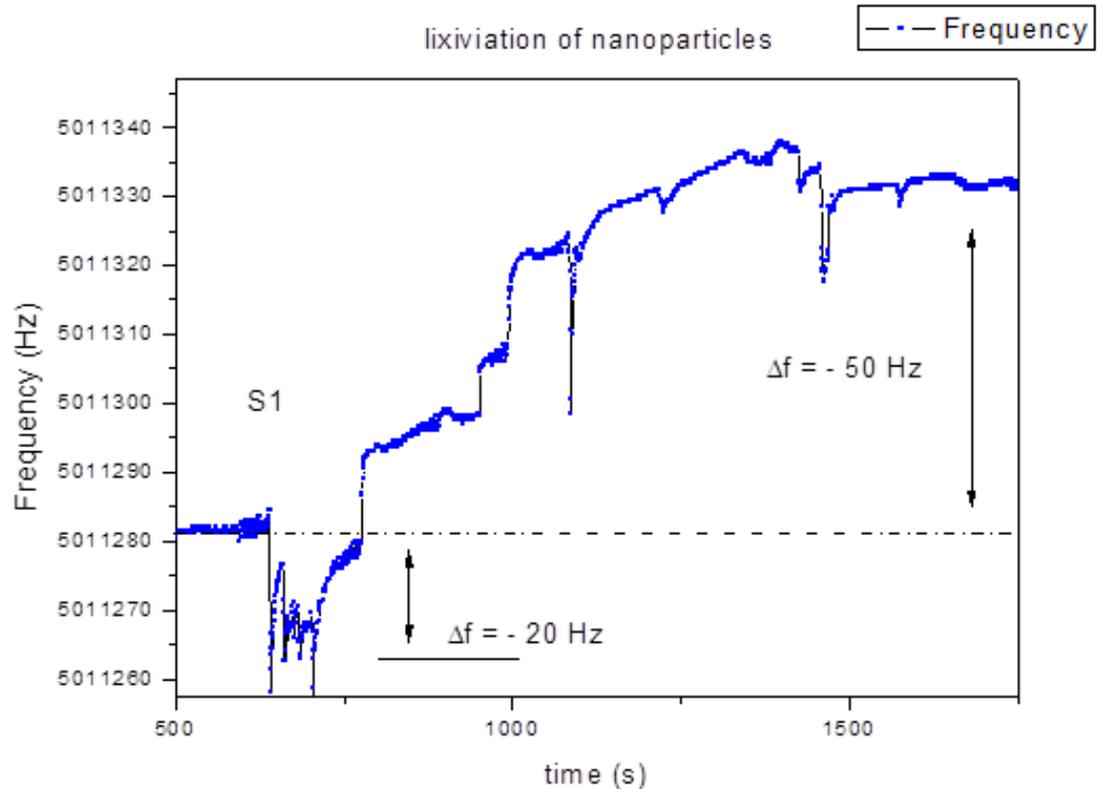
Os experimentos foram realizados em sistema de fluxo, utilizando um eletrodo de ouro, onde foram adicionadas as nanopartículas funcionalizadas com BSA e glutaraldeído, ligando os anticorpos covalentemente à BSA. Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL/min. O volume total de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 utilizado foi de 50 mL. A Figura 6 apresenta um esquema da microbalança de quartzo indicando-se a direção do fluxo de tampão, que carrega o antígeno no momento de aplicação. O antígeno foi injetado no sistema com o auxílio de uma seringa Hamilton de 50 microlitros.

Figura 6: Curvas de EIE relativas à adição de antígeno diretamente na superfície do biossensor.



A Figura 7 apresenta os resultados da adição de antígeno na concentração de 250 ng/mL. Na microbalança os resultados apresentam modificações na frequência de ressonância como resultado de um ganho ou perda de massa.

Figura 7: Curvas de frequência de vibração apresentando os resultados da adição do antígeno (domínio RBD) da proteína S de SARS-CoV-2. As adições foram de 10 microlitos e aqui são apresentadas as primeiras 3 adições, com intervalos de 500 segundos.

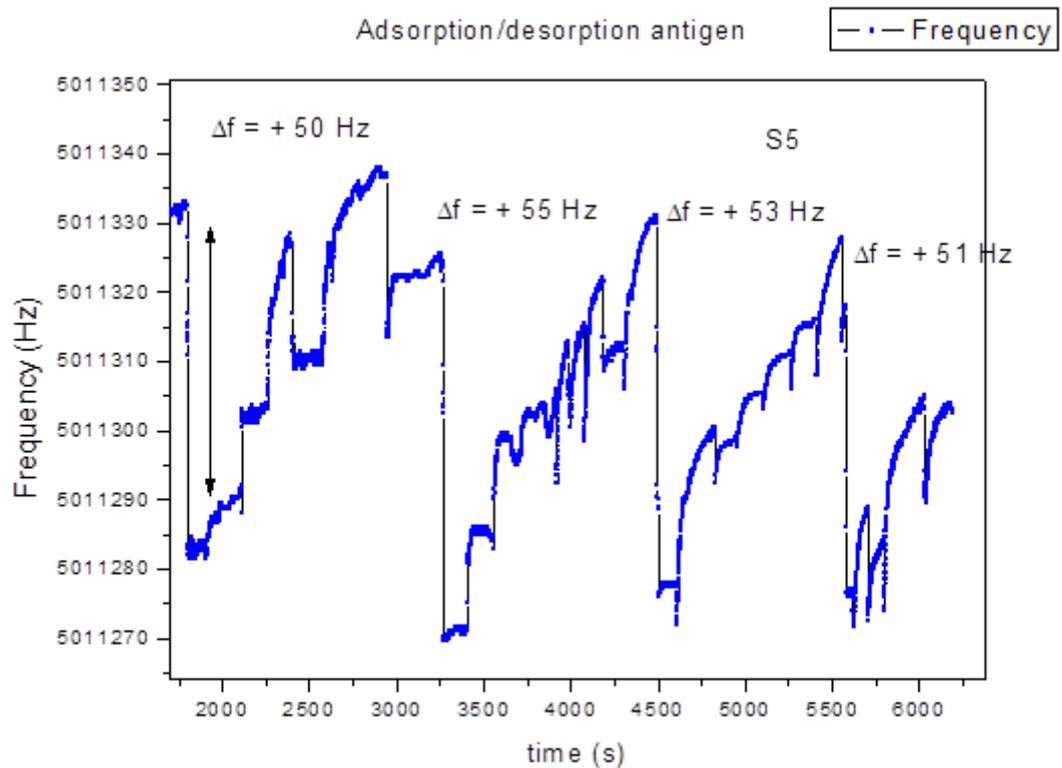


Verifica-se inicialmente uma queda da frequência (-20Hz), indicando ganho de massa, devido à interação anticorpo antígeno. As adições subsequentes demonstram o início de um processo de lixiviação do material funcionado, seja de anticorpo ou de nanopartícula. Este processo continuou até atingir um patamar de -50Hz, em relação à frequência inicial.

A Figura 8 apresenta as adições subsequentes de antígeno na concentração de 1250 ng/mL. Observa-se que o comportamento a uma concentração mais alta é diferente. Cada adição foi seguida de uma diminuição na frequência de ressonância da QCM da ordem de 50 Hz, indicando deposição de antígeno sobre o sistema. Os resultados sugerem que o fluxo contínuo promove a interação do antígeno com o anticorpo, mas logo em seguida temos uma perda de massa. Ou seja, constantemente

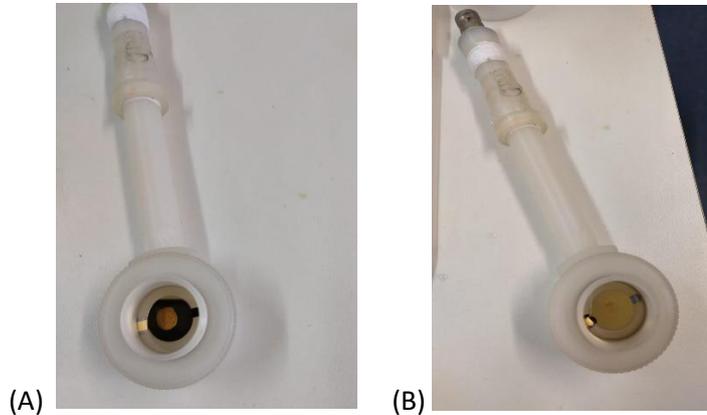
há um ganho seguido de perda de massa. A Figura 9 mostra a fotografia do eletrodo antes e depois do experimento evidenciando a perda da camada de nanopartículas, o que pode ter ocorrido devido ao fluxo e à interação com o antígeno.

Figura 8: Curvas de frequência de vibração apresentando os resultados da adição do antígeno (domínio RBD) da proteína S de SARS-CoV-2 na concentração de 1250 ng/mL. As adições foram de 10 microlitos e aqui são apresentadas 3 adições, com intervalos de 1000 segundos.



Uma explicação para o padrão de ganho e perda de massa pode ser evidenciada pelas fotografias da Figura 9, que apresenta o eletrodo antes e após as determinações da interação anticorpo-antígeno. No experimento, inicialmente, observamos um ganho de massa, pelo aumento da frequência de vibração. Este aumento foi então seguido de uma queda, possivelmente devido à perda das nanopartículas funcionalizadas com anticorpo, logo após interação com o antígeno. A ligação anticorpo antígeno ocorreu antes das nanopartículas serem removidas pelo fluxo de tampão lavando a superfície. O interessante é que antes da adição do solvente também havia fluxo de tampão e a linha de base permaneceu estável, como demonstrado no canto esquerdo da Figura 7.

Figura 9. Fotografias do eletrodo de ouro utilizado nos experimentos com micro balança de quartzo. Em (A) temos o eletrodo seco após a deposição das nanopartículas funcionalizadas; em (B) o mesmo eletrodo ao final dos experimentos.

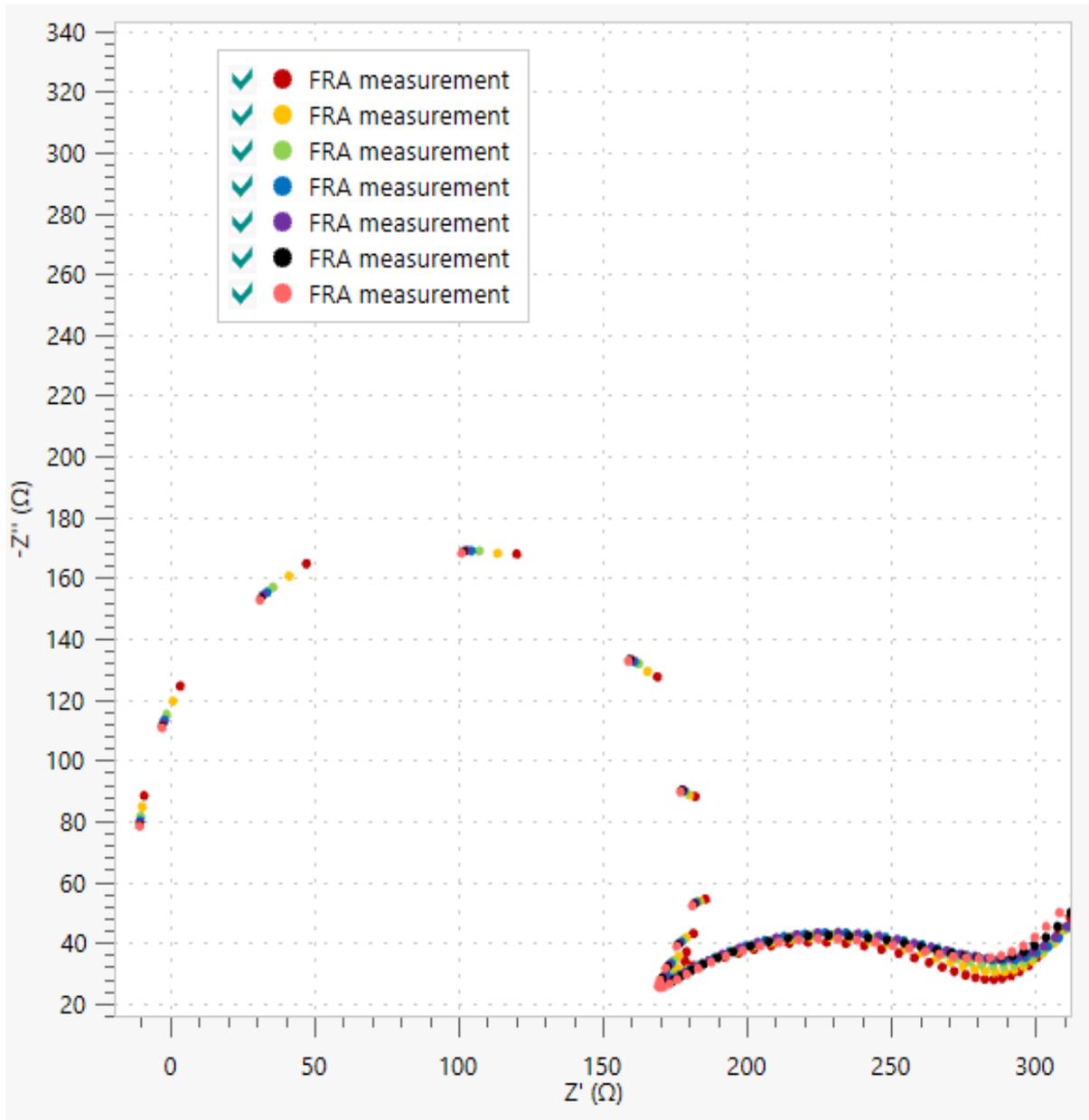


4.4. RESPOSTA DA INTERAÇÃO ANTICORPO/ANTÍGENO NO BIOSENSOR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ADSORVIDOS DIRETAMENTE À SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO.

A Figura 10 apresenta os resultados de uma determinação de curvas de espectroscopia de impedância demonstrando linearidade nas várias adições de antígeno.

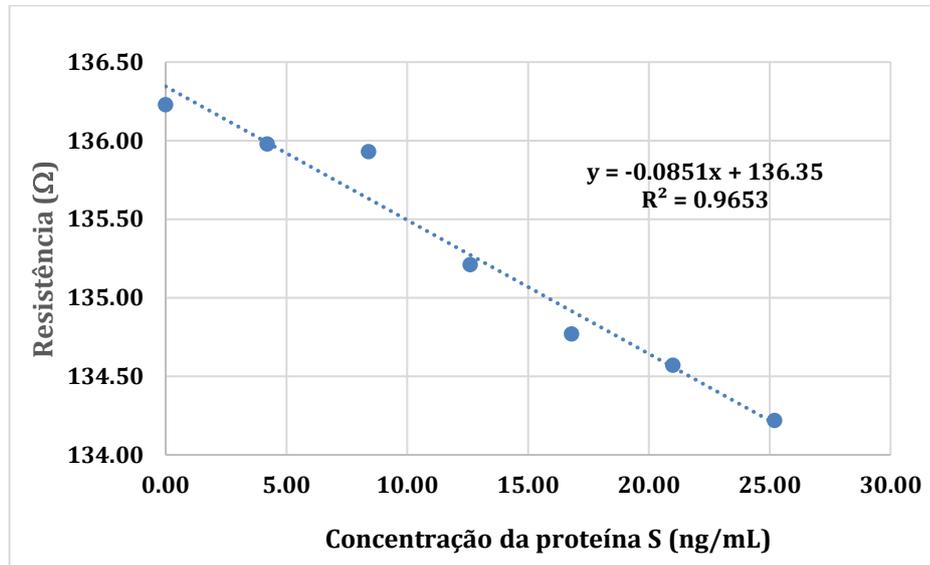
Foram realizadas 6 adições de antígeno, somando-se um total de 60 microlitros. O biossensor foi fixado na célula eletrolítica e as adições foram feitas diretamente no tampão em um volume de 3 mL de tampão fosfato. Para promover a difusão do antígeno foram feitas duas coletas de dados, a primeira imediatamente após adição do antígeno e a segunda 5 minutos após. Cada medida é realizada em um intervalo de aproximadamente 5 min. As curvas correspondem ao biossensor sem adição de antígeno (vermelho) e adição sequencial de 10 microlitros de antígeno na concentração de 1250 ng/mL. Portanto, a curva laranja, corresponde a 10 microlitros; a curva verde, corresponde a 20 microlitros; a curva azul (30 microlitros); curva roxa (40 microlitros), curva preta (50 microlitros) e a curva rosa 60 microlitros. Na região da dupla camada (semi-círculo) verifica-se uma diminuição da impedância, de forma linear, sugerindo dessorção dos anticorpos.

Figura 10: Curvas de EIE relativas à adição de antígeno diretamente na superfície do biossensor, apresentando em detalhe a região da dupla camada elétrica com resposta linear em função da concentração de antígeno adicionada e seu efeito na transferência de carga.



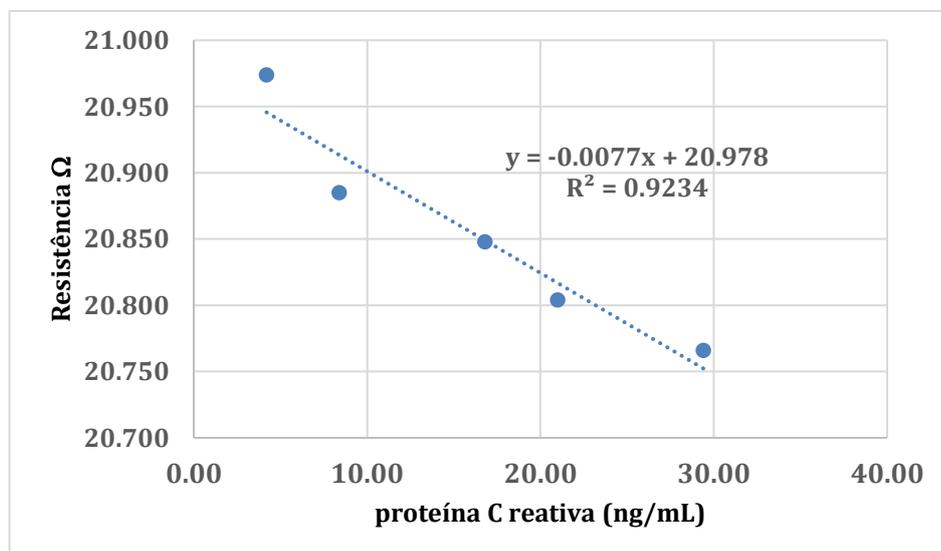
A Figura 11 apresenta um gráfico construído a partir de uma repetição do experimento anterior demonstrando a possibilidade de se construir uma curva analítica a partir do efeito da adição de antígeno sobre a resistência de transferência de carga, que pode indicar um rearranjo estrutural ou dessorção de anticorpos conjugados ao antígeno.

Figura 11: Gráfico demonstrando uma relação linear entre a concentração de antígeno e o seu efeito sobre a resistência de transferência de carga na superfície do eletrodo.



De forma similar, quando anticorpos contra proteína C reativa foram imobilizados em nanopartículas magnéticas de ferro uma queda linear da resistência de transferência de carga também foi observada, como demonstrado no gráfico da Figura 12.

Figura 12: Gráfico demonstrando uma relação linear entre a concentração de antígeno e o seu efeito sobre a resistência de transferência de carga na superfície do eletrodo.



5. DISCUSSÃO

Biossensores são dispositivos analíticos que encontram variadas aplicações na área médica e ambiental (GAVRILAŞ et al., 2022; MEHROTRA, 2016). Em especial, na detecção de SARS-CoV-2 encontram-se descritos na literatura centenas de artigos, entre estes várias revisões. O trabalho de Campos-Ferreira et al. (2021) colaboradores destaca os benefícios do uso de sensores miniaturizados e descartáveis que permitem a sua utilização a beira do leito, facilitando e agilizando a análise (CAMPOS-FERREIRA et al., 2021). Uma busca recente à base de dados Embase (<https://www.embase.com/search/quick>) utilizando os termos “*Coronavirus disease 2019* e “*biosensor*” retornou 220 artigos. Adicionando-se o termo “*impedance spectroscopy*” o número reduziu para 8 artigos. Um artigo é de interesse particular pois envolveu a utilização de espectroscopia de impedância e interação com proteína S do SARS-CoV-2 (SOTO; OROZCO, 2022). Ao contrário do nosso trabalho, os autores utilizaram a interação de fragmentos peptídicos que possuem afinidade por um segmento específico da proteína S, enquanto no presente trabalho foram utilizados anticorpos monoclonais. Adicionalmente, Soto e Orozco (2022) fixaram o elemento de reconhecimento em eletrodos de ouro por ligação covalente à superfície, através de grupamentos tiol presentes na estrutura do peptídeo sintético. Ao eletrodo modificado desta forma foi adicionado mercapto-hexanol para bloquear os sítios remanescentes e evitar a interação inespecífica da superfície com a proteína S. O reconhecimento entre a proteína S e o peptídeo sobre o eletrodo foi promovido por incubação de 15 min e as medidas de impedância foram realizadas na presença de solução de ferricianeto (SOTO; OROZCO, 2022). Os autores reportaram um limite de detecção para este sistema de 18.2 ng/mL. Neste trabalho, obtivemos uma curva linear na faixa de 5 a 25 ng/mL. Da mesma forma que em nosso trabalho a resposta do sinal eletroquímico indica uma queda da resistência de transferência de carga. Soto e Orozco demonstraram este fenômeno acontecendo no dispositivo baseado na interação entre um peptídeo fixado no eletrodo, o qual reconhece a proteína S. Segundo os autores esta diminuição da resistência pode representar um rearranjo da superfície a partir da interação com o elemento de reconhecimento (peptídeo) e a molécula alvo (proteína S). Este rearranjo, ao contrário do esperado quando do aumento de ligantes sobre a superfície do eletrodo, faz com que a resistência de transferência de carga diminua. No presente trabalho verificamos este perfil de queda

da resistência de carga na maioria dos experimentos, na interação do antígeno com o biossensor formado por nanopartículas-BSA-glutaraldeído-anticorpo, onde verificamos inicialmente um aumento da resistência de transferência de carga, que foi seguido por uma queda no valor da resistência (curva rocha) da Figura 5. Entretanto, ao final do experimento, verificamos que esta queda na resistência foi o resultado da queda de parte das nanopartículas funcionalizadas no eletrodo. Ao se retirar o eletrodo verificou-se um resíduo de nanopartículas no fundo da célula eletroquímica. A dessorção de nanopartículas do eletrodo foi evidenciada também no experimento com micro balança de quartzo. Como pode ser visto na Figura 9.

6. CONCLUSÃO

Um dispositivo analítico do tipo biossensor eletroquímico pode ser desenhado baseado nos resultados aqui obtidos. O eletrodo de carbono vítreo pode ser modificado pela adição de nanopartículas magnéticas de ferro contendo anticorpos diretamente adsorvidos, considerando-se que a interação com o antígeno apresenta um efeito diretamente proporcional a sua concentração. Considerando-se o sistema utilizado, que envolveu a fixação de anticorpos monoclonais contra o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2, o protocolo de construção e utilização do biossensor poderia ter uma aplicação direta na detecção do coronavírus em amostras de pacientes infectados, desde que demonstrada sua efetividade na quantificação de amostras reais. Considerando-se que o antígeno utilizado foi obtido por expressão heteróloga de uma das primeiras variantes do SARS-CoV-2, este dispositivo deveria ser avaliado quanto a sua capacidade para interagir com mutantes estruturais da proteína S, bem como com a proteína e o próprio vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(OMS), W. H. O. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. p. 1;4, 2020.

(OMS), W. H. O. COVID-19 Weekly Epidemiological Update, 2022.

AHMADI, Hanie et al. Antibiotic Therapy in Dentistry. **International journal of dentistry**, 2021.

ASIF, M. et al. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 1153–1161, 2020.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BASTOS, V. P. et al. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of Ovalbumin-challenged Guinea Pigs. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, n. 1, p. 34-39, 2011.

CAIXETA, D.C. et al. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. **Front Public Health**, v. 9, 2021.

CARROUEL, F. et al. Antiviral Activity of Reagents in Mouth Rinses against SARS-CoV-2. **Journal of Dental Research**, 2020.

CESEWSKI, Ellen; JOHNSON, Blake N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors & bioelectronics**, v. 159, 2020.

CHAGAS, Laís Garreto Alves de Almeida. Análise da expressão diferencial de proteases salivares em pacientes com Síndrome de Sjögren. 2019. xix, 113 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

CHU, H. et al. Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 6, p. 1400–1409, 12 set. 2020.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils as antiviral agents. Potential of essential oils to treat sars-cov-2 infection: An in-silico investigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020.

DI DOMÊNICO, Marielle Bazzo et al. Effectiveness of hydrogen peroxide as auxiliary treatment for hospitalized COVID-19 patients in Brazil: preliminary results of a randomized double-blind clinical trial. **Epidemiology and health**, v. 43, 2021.

FOSCHI, F. et al. Treponema denticola in disseminating endodontic infections. **Journal of dental research**, v. 85, n. 8, p. 761-765, 2006.

GANDHI, Gargi et al. Could mouth rinses be an adjuvant in the treatment of SARS-CoV-2 patients? An appraisal with a systematic review. **International journal of dental hygiene**, v. 20, n.1, p. 136-144, 2022.

GANGANBOINA, A. B.; DOONG, R. A. Graphene Quantum Dots Decorated Gold-Polyaniline Nanowire for Impedimetric Detection of Carcinoembryonic Antigen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, artigo 7214, 1 dez. 2019.

GAVRILAŞ, S. et al. Recent Trends in Biosensors for Environmental Quality Monitoring. **Sensors 2022, Vol. 22, Page 1513**, v. 22, n. 4, p. 1513, 15 fev. 2022.

HEALTH, W. H. O. et al. Transmission of SARS-CoV-2 : implications for infection prevention precautions. n. July, p. 1–10, 2020.

HIKIBA, H. et al. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 146–152, 2005.

HIRBODVASH, Z. et al. Electrochemical Performance of Lithographically-Defined Micro-Electrodes for Integration and Device Applications. **Chemosensors 2021, Vol. 9, Page 277**, v. 9, n. 10, p. 277, 28 set. 2021.

HIRBODVASH, Z. et al. Electrochemical Performance of Lithographically-Defined Micro-Electrodes for Integration and Device Applications. **Chemosensors**, v. 9, n. 10, p. 277, set. 2021.

HUA, F. et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 10, 2016.

IMRAN, S.; AHMADI, S.; KERMAN, K. Biossensores eletroquímicos para a detecção de SARS-CoV-2 e outros vírus. **Micromachines**, v. 12, n. 2, 2021.

JASIM, H. et al. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy painfree subjects. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

JUERGENS, L. J.; WORTH, H.; JUERGENS, U. R. New Perspectives for Mucolytic, Anti-inflammatory and Adjunctive Therapy with 1,8-Cineole in COPD and Asthma: Review on the New Therapeutic Approach. **Advances in Therapy**, v. 37, n. 5, p. 1737–1753, 2020.

KUDR, J. et al. COVID-19: A challenge for electrochemical biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 136, 1 mar. 2021.

KULKARNI, S. A.; KUMAR, S.; RAMESH, V. Computacional evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of Molecular Structure**, v. 1221, 2020.

LIU, L. et al. Epithelial Cells Lining Salivary Gland Ducts Are Early Target Cells of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the Upper Respiratory Tracts of Rhesus Macaques. **Journal of Virology**, v. 85, n. 8, p. 4025–4030, 2011.

- LIU, X. et al. COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination. **Theranostics**, v. 10, n. 17, p. 7821–7835, 2020.
- LUDWIG, S.; ZARBOCK, A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. **Anesthesia and Analgesia**, v. 131, n. 1, p. 93-96, 2020.
- MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153, 1 maio 2016.
- MEILLER, T. F. et al. Efficacy of Listerine® Antiseptic in reducing viral contamination of saliva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 4, p. 341–346, 2005.
- MENG, L.; HUA, F.; BIAN, Z. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Emerging and Future Challenges for Dental and Oral Medicine. **Journal of Dental Research**, v. 99, n. 5, p. 481–487, 2020.
- MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 355–362, 2020.
- MEYERS, C. et al. Lowering the transmission and spread of human coronavirus. **Journal of Medical Virology**, 2020.
- MINISTERO DELLA SALUTE, I. S. DI S. Monitoraggio Fase 2 Report settimanale: Lazio. v. 2, p. 1–17, 2020.
- MOOSAVI, M. S.; AMINISHAKIB, P.; ANSARI, M. Antiviral mouthwashes: possible benefit for COVID-19 with evidence-based approach. **Journal of Oral Microbiology**, v. 12, n. 1, 2020.
- PASTER, Bruce J. et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology 2000**, vol. 42, p. 80-87, 2006.
- RADHAKRISHNAN, R. et al. Impedance Biosensors: Applications to Sustainability and Remaining Technical Challenges. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 7, p. 1649, 7 jul. 2014.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- RUHL, S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 85–96, 2012.
- SADLON, A. E.; LAMSON, D. W. Immune-modifying and antimicrobial effects of eucalyptus oil and simple inhalation devices. **Alternative Medicine Review**, v. 15, n. 1, p. 33–47, 2010.
- SANTOS, Paulo Sérgio da Silva et al. Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: randomized trial. **Scientific reports**, v. 11, n.1, 2021.

SOARES, M. C. et al. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 3, p.453-461, 2005.

SOTO, D.; OROZCO, J. Peptide-based simple detection of SARS-CoV-2 with electrochemical readout. **Analytica Chimica Acta**, v. 1205, p. 339739, maio 2022.

VERGARA-BUENAVENTURA A., CASTRO-RUIZ C. Use of mouthwashes against COVID-19 in dentistry. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 58, n. 8, p. 924-927, 2020.

WHO. Cleaning and Disinfection of Environmental Surfaces in the context of COVID-19. **World Health Organisation**, n. May, p. 7, 2020a.

WHO. Mask use in the context of COVID-19. **Who**, n. June, p. 1–10, 2020b.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 2020.

WILKIN, P. J. et al. The Undiscovered Potential of Essential Oils for Treating SARS-CoV-2 (COVID-19). **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 41, p. 5261-5277, 2020.

WIŃSKA, K. et al. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–21, 2019.

WOLFF, D. et al. Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. **Infection**, n. 0123456789, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Considerations for quarantine of contacts of COVID-19 cases. **World Health Organisation**, n. August, p. 19082020, 2020.

XIANTIAN, X. et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. **SCIENCE CHINA Life Sciences**, v. 63, n. 3, p. 457–460, 2020.

XU, C. et al. Differential effects of antiseptic mouth rinses on SARS-CoV-2 infectivity in vitro. **bioRxiv**, p. 2020.12.01.405662, 2020.

ZAMORA-PEREZ, A. L. et al. Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 255–260, 2013.

APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO 1: FOTOS ENXAGUANTES E PLACEBOS



ANEXO 2: QUESTIONÁRIO

Questionário

1. Data de início do enxágue: _____
2. Data da internação: _____
3. **Número do frasco:** _____
4. Nome: _____
5. Sexo: _____
6. Idade: _____ anos
7. Telefone/WhatsApp: () _____
8. Peso: _____ kg
9. Altura: _____ m
10. Gravidez: ()sim () não
11. Vacina COVID: ()sim; _____ () não
12. Comorbidades:
 () hipertensão () diabetes mellitus () imunossupressão
 () asma/bronquite () distúrbios de coagulação () doença renal
 () outra(s) _____
13. Uso de oxigênio suplementar: ()sim () não
14. Dia(s) de uso de oxigênio: _____
15. Data da alta hospitalar: _____
16. Data de intubação: _____
17. Data do óbito: _____

OBS: o enxague (10 ml = 1 tampinha) deve ser feito por 30 segundos, 4 vezes ao dia ou de 6 em 6 horas. Em caso de esquecimento, realizar prontamente o enxágue.

18. TABELA - Saturação (O₂), temperatura, pressão arterial e frequência cardíaca:

1º dia de enxague					2º dia de enxague				
	O ₂	T	PA	FC		O ₂	T	PA	FC
1ª af.					1ª af.				
2ª af.					2ª af.				
3ª af.					3ª af.				
4ª af.					4ª af.				

3º dia de enxague					4º dia de enxague					5º dia de enxague				
	O ₂	T	PA	FC		O ₂	T	PA	FC		O ₂	T	PA	FC
1ª af.					1ª af.					1ª af.				
2ª af.					2ª af.					2ª af.				
3ª af.					3ª af.					3ª af.				
4ª af.					4ª af.					4ª af.				

ANEXO 3: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DE UM ENXAGUANTE BUCAL CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTE AUXILIAR NO TRATAMENTO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS POR COVID-19

Pesquisador: JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45634921.9.0000.5481

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC/ CAMPINAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.776.835

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO:

A preocupação mundial com relação à pandemia ocasionada pelo coronavírus (SARS-CoV-2) continua crescente e legítima em todos os sistemas de saúde dos países (MOOSAVI; AMINISHAKIB; ANSARI, 2020). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de casos diagnosticados da doença chega a 83 milhões, sendo mais de 1.800.000 o número de mortes confirmadas até o presente momento ((OMS), 2020). Após um ano do surgimento da COVID-19, o que tem colocado em risco a saúde global e a economia, o desenvolvimento de estratégias para conter a disseminação da doença se faz necessário. Nesse cenário, diversas vacinas começaram a ser produzidas e disponibilizadas, entretanto, nenhum tratamento específico para a doença foi ainda instituído. Logo, assumem vital importância tanto medidas gerais de prevenção, como o uso de medicamentos que possam limitar a progressão da doença na sociedade, assim como seu agravamento no indivíduo acometido pelo vírus (LIU et al., 2020). Por ser uma doença causada por um vírus respiratório, transmitido sobretudo por meio de gotículas e aerossóis de rápida transmissão (emitidos ao falar, tossir ou espirrar) (MOOSAVI; AMINISHAKIB & ANSARI, 2020) e pelo contato (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), destacam-se como estratégias de prevenção, principalmente, a higienização de superfícies, objetos, ambientes (WHO, 2020a) e das mãos (HEALTH et al., 2020), assim como o distanciamento social (WORLD HEALTH ORGANIZATION,

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

2020) e o uso de máscaras (WHO, 2020b). É notório que o trato oral é a principal fonte emissora de gotículas contaminantes, maior área receptora de vírus do ambiente e reservatório crítico para SARS-CoV-2, sobretudo com relação às glândulas salivares, que apresentam significativa expressão de enzimas conversoras de angiotensina 2 (AC2+) (LIU et al., 2011), principal alvo do vírus no organismo (XIANTIAN et al., 2020). Liu et al., 2011, relataram, ainda, que a concentração de AC2+ era por volta de 1/5 maior na cavidade oral do que nos pulmões (LIU et al., 2011). Além disso, os mesmos autores ao estudarem em macacos rhesus a fisiopatologia de um pseudovírus similar ao SARS-CoV, evidenciaram que as células epiteliais dos ductos das glândulas salivares no trato respiratório alto são alvos precoces para infecção (LIU et al., 2011). Contudo, apesar do papel crítico desempenhado pela cavidade oral na transmissão, instalação e continuidade da doença, poucos estudos têm validado a higiene oral como alternativa profilática e/ou terapêutica para a COVID-19, sobretudo, em relação à publicação de ensaios clínicos sobre a temática (CARROUEL et al., 2020) Sabe-se, por exemplo, que reagentes específicos presentes em enxaguantes bucais têm demonstrado comprovada ação antiviral imediata, como os óleos essenciais, (CARROUEL et al., 2020), além de apresentar substantividade (efeito residual). Meiller, et al, 2005, ao submeter 40 pacientes do grupo teste ao enxague com um produto contendo óleos essenciais, por 30 segundos, observaram redução da carga viral de Herpes tipos 1 e 2 nos fluidos orais por pelo menos 30 minutos após o enxágue (MEILLER et al., 2005). Com base na ação antiviral e substantividade de enxaguantes, inclusive, protocolos de biossegurança para o atendimento em consultórios odontológicos vêm sendo estabelecidos para a proteção do cirurgião dentista, sua equipe e pacientes (MENG; HUA; BIAN, 2020). Ademais, outros estudos também demonstraram o impacto positivo da higiene oral com enxaguantes na redução da pneumonia nosocomial em pacientes hospitalizados. Uma revisão sistemática da literatura com metanálise, encontrou resultados significativos que corroboram com esses achados e os autores concluíram que a higiene oral é importante para a redução de casos de pneumonia associada à ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (UTIs) (HUA et al., 2016). Os óleos essenciais são misturas complexas de baixo peso molecular, extraídas de plantas com diversas propriedades terapêuticas, dentre elas, antibacterianas, antimutagênicas, antiinflamatórias, antifúngicas e antivirais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). São utilizados há séculos pelos seres humanos (WILKIN et al., 2020). O mentol, por exemplo, tem sido utilizado na medicina tradicional asiática para o tratamento de doenças respiratórias (ASIF et al., 2020). Diversos óleos e seus derivados, inclusive, têm demonstrado ação eficaz na inativação do vírus SARS-CoV-2 in vitro, ex vivo e in sílico. Um estudo in sílico que

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 º Bloco A02 º Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

avaliou vários óleos essenciais, dentre eles o timol, mostrou potencial para inibir a subunidade S1 da proteína S (spike) do SARS-CoV 2, responsável por interagir com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (KULKARNI; KUMAR; RAMESH, 2020). Além disso, outros estudos in vitro e ex vivo demonstraram propriedades imunomodulatórias do eucaliptol (outro óleo essencial) capazes de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias de monócitos e macrófagos (SADLON; LAMSON, 2010) (JUERGENS; WORTH; JUERGENS, 2020) atenuando, assim, o estado hiper inflamatório (cascata de citocinas) relatado por Merad et al, 2020, em pacientes graves acometidos pela COVID-19 (MERAD; MARTIN, 2020). Outros autores observaram que os enxaguantes bucais com óleos essenciais agem antes da adsorção do vírus nas células por meio da capacidade dos óleos essenciais de interferir na bicamada fosfolipídica dos coronavírus, o que provoca o deslocamento do envelope viral (WISKA et al., 2019). Ademais, também são observadas as propriedades odoríferas (capacidade de agir à distância) desses óleos, seu potencial de otimizar outros agentes antivirais e fornecer alívio de alguns sintomas dessa doença (DA SILVA et al., 2020). Outros argumentos relevantes que pesam em favor de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais no cuidado de pacientes com comprometimento pulmonar, baseiam-se em propriedades dos óleos como a capacidade mucolítica e broncodilatadora (JUERGENS; WORTH; JUERGENS, 2020). Outrossim, a volatilidade característica desses óleos a qual proporciona sua capacidade odorífera (BAKKALI et al., 2008) pode ser de fundamental importância na descontaminação das cavidades anatômicas infectadas. Tendo em vista o exposto, o presente estudo visa propor uma complementação ao tratamento convencional dos pacientes hospitalizados por COVID-19 no Hospital da PUC-Campinas. Essa alternativa consiste na aplicação de um protocolo de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais associado à terapêutica medicamentosa vigente, com o objetivo de otimizar o tratamento desses pacientes por meio da redução de níveis de proteína C reativa (CRP), dias de internação, índices de intubação e morte.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Serão incluídos no estudo pacientes que por meio do teste RT-PCR foram confirmados para COVID-19 e hospitalizados na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas, com idade igual ou superior a 18 anos. Ademais, os pacientes precisam ser não edêntulos e devem possuir a capacidade de bochechar a solução. Tais participantes serão de ambos os sexos, com ou sem

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 º Bloco A02 º Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

comorbidades associadas.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Como critérios de exclusão, tem-se o uso de ventilação mecânica, história prévia de reação alérgica a quaisquer substâncias testadas, reações adversas aos produtos durante o estudo, pacientes vacinados para a doença, gestantes, além de participantes que desistirem da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

O objetivo primário deste estudo é reduzir os seguintes indicadores após a aplicação do protocolo de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais nos pacientes com COVID-19 em internação hospitalar na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas: níveis de proteína C reativa, dias de internação, incidência de intubação orotraqueal e necessidade de UTI, assim como níveis de mortalidade.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

Os objetivos secundários deste estudo serão instituir tal terapêutica no cuidado de pacientes hospitalizados pela doença, além de subsidiar novas pesquisas que versem sobre a temática. Inevitavelmente, resultados estatísticos significativos também resultarão em benefícios socioeconômicos, como redução de custos hospitalares e maximização do retorno laboral para o indivíduo acometido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

No presente estudo, o produto utilizado para o grupo teste, um enxaguante bucal contendo óleos essenciais, tem seu uso validado há mais de 100 anos no mercado internacional e no Brasil, desde a década de 80. Embora o protocolo sugerido nessa pesquisa difira do protocolo convencional no que diz respeito à posologia, a quantidade máxima de produto sugerida pelo fabricante em 24 horas será respeitada, ou seja, 40 ml/dia. Outros cuidados como anamnese visando buscar um histórico de reações prévias ao produto serão tomados, além de instruções prévias fornecidas aos pacientes do estudo. Vale ressaltar ainda que a substância placebo tem por objetivo ser inócua, ou seja, não deverá produzir reações ao indivíduo. Contudo, em caso de efeitos indesejáveis apresentados pelos participantes da pesquisa, este grupo se compromete a prestar o suporte necessário junto ao Hospital da PUC-Campinas, a partir de anuência prévia do CEP. Por outro lado,

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

os benefícios esperados (elencados no item a seguir), são de tal relevância a ponto de justificar esses possíveis riscos.

BENEFÍCIOS:

Os pacientes acometidos pela COVID-19 submetidos a internação hospitalar apresentam, segundo a literatura, risco elevado de agravamento, intubação e morte. O período de internação por si só já causa consequências ao indivíduo em sua esfera biopsicossocial. O tratamento com enxaguante bucal contendo óleos essenciais, associado à terapêutica convencional, visa minimizar os impactos negativos da doença sobre o paciente acometido, assim, promovendo os seguintes benefícios: 1.Redução dos sintomas; 2.Diminuição dos níveis inflamatórios (CRP); 3.Redução da carga viral; 4.Menos dias de internação; 5.Diminuição das sequelas físicas; 6.Atenuação dos desgastes emocionais; 7.Aumento da capacidade laboral; 8.Diminuição do uso de ventilação mecânica; 9.Desnecessidade de UTI; 10.Redução da morbimortalidade causada pela doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- A Pesquisa tem pertinência e valor científico;
- Há adequação da metodologia aos objetivos perseguidos;
- Há grau de vulnerabilidade dos sujeitos e medidas protetoras propostas;
- Há identificação dos responsáveis pelo atendimento, acompanhamento e recebimento dos sujeitos encaminhados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Segue abaixo a resposta de pendência do Parecer Consubstanciado do CEP nº 4.726.868, datado de 21/05/2021, como segue:

Pendência 1:

Com objetivo de não caracterizar um conflito de interesse seria importante trocar o nome comercial "Listerine" pelo princípio ativo do enxaguatório bucal. Dessa maneira inclusive o título do projeto deve ser regularizado e, por essa razão, uma nova folha de rosto deve ser providenciada e assinada pela PROPESQ.

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

Pendência 2:

Seria importante esclarecer no projeto, como também no TCLE, quando será realizada a segunda coleta de exame de proteína C Reativa.

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

NOVA PENDENCIA GERADA PELO CEP - 1: Adicionar ao texto do TCLE: benefícios previstos; potenciais riscos ou incômodos que possa causar aos sujeitos durante a coleta de sangue periférico e coleta de ; informação de que a participação é voluntária, podendo haver recusa na participação ou mesmo a retirada do consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo para o sujeito; garantia de esclarecimentos pelo pesquisador, antes e durante o desenvolvimento da pesquisa; garantia de sigilo e privacidade, Informar que as amostras iniciais e finais de saliva ficarão armazenadas para serem analisadas em outro estudo ainda a ser desenvolvido. Deve constar o telefone de contato do pesquisador e numeração de página com espaço no "rodapé" para data e visto do pesquisador e participante.

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

NOVA PENDENCIA GERADA PELO CEP - 2: Retirar o termo "Assinatura do Paciente" e substituir pelo termo: "Assinatura do participante".

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

Pendência 3:

Adequar a coleta de dados nas informações básicas do projeto, como consta no cronograma em anexo e no próprio projeto.

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

Pendência 4:

Rever item assinalado na plataforma onde consta como "sim" a opção de: "haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?" Confirmar esse dado, talvez tenha sido demarcado de forma equivocada. Importante mencionar que não foi identificada a Declaração de que o material biológico coletado

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

será usado exclusivamente para os fins previstos no protocolo.

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 4.1- PROJETO-PROCEDIMENTOS

Parágrafo 4 Lê-se: “Adicionalmente, serão coletadas amostras de saliva para validação de um biossensor de testes para CRP (Proteína C Reativa), tecnologia em estudo pela PUC-Campinas e que fará parte de um projeto subsequente. Ao final da internação e antes da alta hospitalar, novas amostras de sangue e saliva também serão coletadas. As amostras iniciais e finais de sangue serão encaminhadas para análise laboratorial, enquanto as amostras iniciais e finais de saliva ficarão armazenadas para serem analisadas no referido projeto subsequente”.

NOVA PENDENCIA GERADA PELO CEP: As amostras de salivas serão armazenadas em um biobanco, porém, não conta descrito em Projeto e em PB o local de armazenamento, bem como, não consta anexada e postada em Plataforma Brasil a carta de ciência de biobanco assinada pelo responsável técnico deste local.

PARECER DO CEP: O PROJETO FOI MODIFICADO INDICANDO QUE NÃO HAVERÁ MAIS ARMAZENAMENTO EM BIOBANCO. PORTANTO PENDENCIA ATENDIDA

Pendência 5:

O contato mencionado no TCLE referente ao comitê de ética está desatualizado quanto ao prédio e sala, favor adequar: “Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade da PUC-Campinas, telefone de contato (19) 3343-6777, e-mail: comitedeetica@puc-campinas.edu.br, endereço Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - prédio A02 - térreo – Parque Rural Fazenda Santa Cândida – CEP 13087-571 - Campinas – SP, horário de funcionamento de segunda a sexta-feira das 08h00 às 17h00”

PARECER DO CEP: PENDENCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Dessa forma, e considerando a Resolução CNS nº. 466/12, Resolução CNS nº 510/16, Norma Operacional 001/13 e outras Resoluções vigentes, e, ainda que a documentação apresentada atende ao solicitado, emitiu-se o parecer para o presente projeto: Aprovado. Conforme a Resolução CNS nº. 466/12, Resolução CNS nº 510/16, Norma Operacional 001/13 e outras Resoluções vigentes, é atribuição do CEP “acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 ç Bloco A02 ç Térreo		
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida	CEP: 13.087-571	
UF: SP	Município: CAMPINAS	
Telefone: (19)3343-6777	Fax: (19)3343-6777	E-mail: comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

com o risco inerente à pesquisa". Por isso o/a pesquisador/a responsável deverá encaminhar para o CEP PUC-Campinas os Relatórios Parciais a cada seis meses e o Relatório Final de seu projeto, até 30 dias após o seu término.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1699768.pdf	08/06/2021 22:47:24		Aceito
Outros	AlteracoesCEP.jpg	08/06/2021 22:47:06	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Cronograma	Cronograma.jpg	08/06/2021 22:46:36	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOdoMESTRADO.docx	08/06/2021 22:46:25	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/06/2021 22:46:13	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Outros	DECLARACAOdeMATERIALBIOLOGICO.pdf	17/05/2021 19:22:49	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Folha de Rosto	NOVAFOLHADEROSTO.pdf	16/05/2021 21:05:58	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Outros	TermoDeCompromissoParaUtilizacaoDeDados.pdf	14/04/2021 21:33:00	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Outros	DeclaracaoDeCienciaEAutorizacaoDaInstituicaoCoparticipante.pdf	14/04/2021 21:32:34	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Outros	CartaCEP.pdf	14/04/2021 21:30:44	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAOdeINFRAESTRUTURA.pdf	13/04/2021 21:08:21	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Outros	declaracaoinfecto.pdf	13/04/2021 20:52:05	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br



Continuação do Parecer: 4.776.835

Outros	cartasuperintendencia.pdf	13/04/2021 20:38:59	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Orçamento	DECLARACAODECUSTOSECURSO S.pdf	13/04/2021 00:08:30	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAODaSUPERINTENDENCI A.pdf	12/04/2021 23:53:52	JULIUS JOSE TEIXEIRA JOHANN PAUL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 14 de Junho de 2021

Assinado por:
Mário Edvin GreTERS
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - Bloco A02 - Térreo
Bairro: Parque Rural Fazenda Santa Cândida **CEP:** 13.087-571
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3343-6777 **Fax:** (19)3343-6777 **E-mail:** comitedeetica@puc-campinas.edu.br

ANEXO 4: TCLE

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a), o senhor(a) está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **“AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DE UM ENXAGUANTE BUCAL CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTE AUXILIAR NO TRATAMENTO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS POR COVID-19”**. O enxaguante bucal em questão pode ajudar na melhora dos sintomas da doença COVID-19, quando usado juntamente com a medicação durante a internação.

Esta pesquisa está sendo desenvolvida sob a responsabilidade do pesquisador Julius José Teixeira Johann Paul, do Mestrado em Ciências da Saúde na PUC-Campinas. O objetivo dessa pesquisa é verificar o quanto o uso de um enxaguante bucal contendo óleos essenciais pode ajudar, durante o período de internação, para a doença não se agravar. Desse modo, esperamos que fazendo uso do enxaguante, o(a) senhor(a) tenha como benefícios: diminuição dos sintomas, dos riscos de agravamento e dos dias de internação.

Todas as informações sobre o seu tratamento somente serão usadas com sua autorização. Durante toda a sua participação nessa pesquisa o(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários, com garantia de sigilo e privacidade. Além disso, o(a) senhor(a) estará ajudando o pesquisador a ter uma melhor compreensão sobre o tratamento da COVID-19.

Como todo produto ou medicamento, raramente pode acontecer uma reação alérgica e caso isso aconteça, o uso do enxaguante bucal contendo óleos essenciais será suspenso e o senhor (a) receberá o suporte necessário do pesquisador e do hospital.

Os seus dados pessoais serão mantidos em segredo e os resultados obtidos na pesquisa serão utilizados apenas para alcançar o objetivo do trabalho, incluindo sua publicação em revistas científicas.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária, ou seja, não obrigatória. Além disso, não haverá remuneração e a pesquisa também não lhe trará qualquer prejuízo financeiro ou profissional. Lembrando que, mesmo assinando esse termo, o senhor (a) tem direito de desistir da pesquisa a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo;

O(a) senhor(a) deve estar ciente de que deverá fazer o **USO DE UM ENXAGUANTE BUCAL**, de 6 em 6 horas (4 vezes ao dia) durante os dias em que permanecer internado (a) na enfermaria do Hospital da PUC-Campinas (**NÃO DEVE ENGOLIR O PRODUTO**);

O produto utilizado pode ser um **ENXAGUANTE BUCAL CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS - SEM ÁLCOOL** ou **OUTRO ENXAGUANTE SEM QUALQUER EFEITO**, mas o senhor (a) **NÃO SABERÁ QUAL DELES FARÁ USO**;

Data

Visto do pesquisador

Visto do participante

O projeto em questão foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade, que poderá ser procurado para quaisquer esclarecimentos em relação às questões éticas (contato: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade da PUC-Campinas é Rua Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini, 1516 - prédio A02 - térreo – Parque Rural Fazenda Santa Cândida – CEP 13087-571 - Campinas – SP, telefone (19) 3343-6777, email: comitedeetica@puc-campinas.edu.br, horário de funcionamento de segunda a sexta-feira das 08h00 às 17h00). Também, em caso de outras dúvidas, o senhor (a) poderá entrar em contato com o pesquisador pelo número (11) 940379938.

Caso concorde em dar o seu consentimento livre e esclarecido para participar do projeto de pesquisa, assine o seu nome abaixo. O termo será redigido em 2 (duas) vias idênticas, sendo uma via para o participante e outra para o pesquisador devidamente assinadas.

Assinatura do Participante. Estou esclarecido(a) e dou consentimento para que as informações por mim prestadas sejam usadas nesta pesquisa. Também, estou ciente de que receberei uma cópia integral deste Termo.

Assinatura do Pesquisador

_____ de _____ de _____.
