

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS
DA SAÚDE.

ANA CAROLINA COSTA DA MOTA CIARCIA

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA HALITOSE
EM ADOLESCENTES – ENSAIO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO.

São Paulo – SP
2015

ANA CAROLINA COSTA DA MOTA CIARCIA

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA HALITOSE
EM ADOLESCENTES – ENSAIO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO.**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre em Biofotônica Aplicada às
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Kalil
Bussadori.

São Paulo – SP

2015

Ciarcia, Ana Carolina Costa da Mota.

Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da halitose em adolescentes – ensaio clínico e microbiológico. / Ana Carolina Costa da Mota Ciarcia. 2015.

155 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori.

1. Halitose. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Adolescentes. 4. Laser. 5. Língua.

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

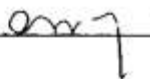
Aluno (a): ANA CAROLINA COSTA DA MOTA CIARCIA

Título da Dissertação: "Efeito da terapia fotodinâmica no tratamento da helitose em adolescentes – Ensaio Clínico e microbiológico".

Presidente: PROFª. DRª. SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROFª. DRª. CRISTIANE MIRANDA FRANÇA



Membro: PROFª. DRª. Mª APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido **Eric Ciarcia** que sempre me apoiou e me deu o suporte necessário para mais esta conquista, aos meus pais **Carmen e Carlos Mota** que sempre acreditaram e me proporcionaram a educação que tenho hoje para conseguir chegar até aqui, e nunca pouparam esforços para que isso fosse possível, e aos meus irmãos **Carlos Eduardo e Felipe, família Ciarcia e família Patz** pela alegria e apoio nessa fase.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter conseguido ter chegado até aqui.

A minha querida orientadora **Sandra Kalil Bussadori** por ter acreditado em mim, pelos conhecimentos recebidos, pela paciência e pelo carinho. Te admiro muito, meu muito obrigada!

A minha querida colega de mestrado **Rúbia Garcia Lopes**, de quem surgiu a ideia do trabalho e onde tudo iniciou, obrigada!!!

Ao querido **Prof. Dr. Renato Prates** pelos ensinamentos, e por toda a parte de microbiologia que sem você não teria sido possível. Agradeço também a **Prof. Dra. Telma Beldran** pelas orientações com a microbiologia.

A querida **Prof. Dr. Cristiane Miranda França**, por todas as sugestões e ideias para evolução dessa dissertação.

Ao **Prof. Dr. Alessandro Melo Deana** pelos conhecimentos de física do laser e pela ajuda com toda a análise estatística do trabalho.

Aos meus queridos companheiros de mestrados pelos momentos compartilhados, pelas risadas e por deixar esse período mais leve, em especial a **Marcela Gonçalves, Luciana e Mônica Salgueiro** que fizeram com que o módulo internacional fosse inesquecível.

Aos queridos professores da odontopediatria, **Carol Guedes, Lara, Camila, Carol Bortoletto, Marcelo, Silvia, Olga** pelo carinho e aprendizado!!! Amo cada vez mais a odontopediatria por causa de vocês. Um obrigada especial para **Camila** que me guiou no mestrado e pela ajuda com o início dos trabalhos na graduação.

A todos os professores do programa de mestrado em Biofotônica, em especial **Profs., Kristianne Porta dos Santos Fernandes, Anna Carolina Horliana** pelos ensinamentos,

sugestões e apoio. E a todos os outros que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A minha querida aluna de iniciação científica **Larissa Costa** que me ajudou muito em todas as etapas para conclusão desse trabalho, meu muito obrigada!

Ao **Instituto menino de Jesus São Judas Tadeu** por ter me deixado realizar a pesquisa com os alunos e pelo apoio nesse trabalho.

A minha querida amiga **Dâmaris** pela força e a disponibilidade de estar sempre disposta em ajudar. Muito obrigada

A minha querida amiga **Andressa** por ter sido minha dupla querida desde o primeiro dia de faculdade e que me fez iniciar nesse mundo da pesquisa com as Iniciações Científicas que fizemos juntas. Obrigada!

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por concederem o auxílio de pesquisa processo nº 2013/13032-8.

A **Uninove e a Capes** pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

RESUMO

Halitose é o termo utilizado para designar um odor desagradável que emana da cavidade oral ou respiração. Sua origem principal é intraoral, sendo 51% dos casos relacionados a presença da saburra lingual, resultado da degradação de substratos orgânicos por bactérias anaeróbicas e pela produção de compostos sulfurosos voláteis (CVS). Acredita-se que a fonte primária de exalação destes compostos seja na parte posterior da língua. O tratamento convencional da halitose consiste na remoção química e mecânica dos microorganismos com enxaguatórios e raspadores, porém existe muita divergência nos estudos sobre a efetividade desses métodos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) envolve a utilização de um corante e uma fonte de luz num comprimento de onda específico que apresenta uma ação antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito clínico e microbiológico da terapia fotodinâmica para o tratamento da halitose em adolescentes. 46 adolescentes de 12 a 19 anos foram divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo 1 tratamento com terapia fotodinâmica, grupo 2 com raspador lingual e grupo 3 associações dos tratamentos. A avaliação clínica da halitose foi feita por meio de cromatografia gasosa e a análise microbiológica por contagem de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). Foram empregados os testes Kruskal-Wallis para comparação seguido do teste Student-Newman-Keuls. Para a verificação das unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) após o tratamento foi utilizado o teste ANOVA. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de $\alpha=0,05$. Após o tratamento houve redução estatisticamente significativa para todos os grupos ($p < 0,001$), contudo a associação da terapia fotodinâmica ao raspador lingual mostrou ser mais eficiente na redução total de sulfidretos (mediana=0). Microbiologicamente foi possível observar diferença estatisticamente significativa após o tratamento entre o grupo PDT e o grupo raspador ($p < 0,001$). Esse estudo traz uma nova opção de tratamento para halitose em adolescentes com efeito imediato sem agressão mecânica as papilas linguais comuns ao tratamento convencional.

Projeto FAPESP: n° 2013/13032-8

Clinical Trials: NCT02007993.

PALAVRAS CHAVE: Halitose, Terapia fotodinâmica, Adolescentes, laser, língua.

ABSTRACT

Halitosis is the term used to describe an unpleasant odor that emanates from the oral cavity or breath. Its main cause is in the oral cavity, being 51% of cases related to the presence of tongue coating, resulting from the degradation of organic substrates for anaerobic bacteria and the production of volatile sulfur compounds (VSC). It is believed that the primary source of exhalation of these compounds is in the back of the tongue. The conventional treatment of halitosis is the chemical and mechanical removal of microorganisms with rinses and scrapers, but there is much disagreement in studies on the effectiveness of these methods. Photodynamic therapy involves the use of a dye and a light source of a specific wavelength which has an antimicrobial action. The objective of this study was to evaluate the clinical and microbiological effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents between 12 and 19 years. 46 adolescents were randomly divided into three groups: Group 1 treatment with photodynamic therapy, group 2 with tongue scraper and group 3 associations of treatments. Clinical evaluation of halitosis were made by means of gas chromatography and microbiological testing by counting colony forming units per ml (CFU / ml). It was used the Kruskal-Wallis tests for comparison followed by the Student-Newman-Keuls test. To check colony forming units per ml (CFU / ml) before and after treatment the ANOVA test were used. For all analyzes were considered a level significance of $\alpha = 0.05$. After treatment there was a statistically significant decrease in all groups ($p < 0.001$), but the combination of photodynamic therapy to the tongue scraper proved more effective at all hydrates of sulfur reduction (median = 0). Microbiologically it was observed a statistically significant difference before the treatment for the groups 1 and 2 ($p < 0,001$). This study provides a new treatment option for halitosis in adolescents with immediate effect without mechanical aggression common in lingual papillae when the conventional treatment is used.

Projeto FAPESP: n° 2013/13032-8

Clinical Trials: NCT02007993.

KEY WORDS: Halitosis, Photodynamic Therapy, Adolescents, Tongue, laser.

SUMÁRIO

1. Contextualização	15
1.1. Tratamento	17
1.2. Terapia Fotodinâmica	19
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
4. Material e Métodos	22
4.1. Delineamento	22
4.1.1. Hipótese	22
4.2. Sujeitos da pesquisa	22
4.2.1. Critérios de Inclusão	22
4.2.2. Critérios de Exclusão	23
4.3. Procedimentos	23
4.3.1. Fluxograma	23
4.3.2. Avaliação do nível de halitose	25
4.3.3. Aplicação da Terapia fotodinâmica	27
4.3.4. Análise Microbiológica	29
4.4. Cálculo da amostra	31
4.5. Organização e tratamento estatístico dos dados	31
5. Resultados.....	32
5.1. Artigo publicado	32
5.2. Avaliação clínica	32
5.3. Avaliação microbiológica.....	34
6. Discussão	36
7. Considerações Finais	40
8. Referências.....	41
9. Anexos.....	47
9.1. Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética.....	47
9.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	48
9.3. Anexo 3 - Artigo publicado na Lasers in Medical Science.....	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Resumo da condição experimental	24
Quadro 2 – Parâmetros do laser	28
Tabela 1 – Mediana de valores obtidos de SH2 na halimetria inicial	32
Tabela 2 – Mediana de valores obtidos de SH2 na halimetria final.....	33
Tabela 3- Mediana dos valores obtidos de SH2 na halimetria após 7 dias.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma	23
Figura2 – Oralchroma™	25
Figura 3 – Processo de realização da halimetria	25
Figura 4 - Aparelho Therapy XT-EC - DMC ®	27
Figura 5 – Pontos de aplicação da Terapia Fotodinâmica	27
Figura 6 – Swab em meio de transporte reduzido	29
Figura 7 – Coleta do dorso de língua com swab	29
Figura 8 - Homegeinização da amostra	29
Figura 9 – Placas de poços para diluição	29
Figura 10 – Estrias após incubação por 72horas para contagem de UFC/ml	29
Figura 11 - Poder do teste em função do tamanho amostral	30
Figura 12 - Gráfico comparativo entre grupos e intergrupos	33
Figura 13 – Gráfico da diferença após o tratamento (log10 UFC/ml)	34
Figura 14 – Gráfico da diferença antes e após o tratamento (log10 UFC/ml)	34

LISTA DE ABREVIações

aPDT – Terapia Fotodinâmica antimicrobiana - do inglês “Antimicrobial Photodynamic Therapy”

CSV - Compostos sulfurosos voláteis

FS – Fotossensibilizador

Ppb – Partes por bilhão

RS – Revisão Sistemática

SH₂ – Sulfeto de Hidrogênio

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

UFC/ml – Unidades formadoras de colônia por ml

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Do ponto de vista etimológico, a palavra halitose tem origem no latim halitus, que significa "ar expirado", e no grego osis, que significa "doença ou condição anormal". Portanto podemos considerar que a halitose ou mau hálito é a exalação de um odor desagradável da cavidade oral e respiração (SEEMANN *et al.*, 2014). Acredita-se, que no mundo aproximadamente 25% da população é afetada por esse problema, porém existe uma dificuldade em definir esses dados devido à falta de padronização dos métodos de diagnóstico e condução dos estudos em diferentes países (BOLLEN; BEIKLER, 2012).

Na maioria dos casos (80-90%) tem uma origem intraoral, resultado da degradação de substratos orgânicos por bactérias anaeróbicas e pela produção de compostos sulfurosos voláteis (CVS) (TONZETICH *et al.*, 1977; DELANGHE *et al.*, 1997). Pode também ter origem extraoral como problemas otorrinolaringológicos, gastrointestinais, doenças sistêmicas, desordens metabólicas e carcinomas (DELANGHE *et al.*, 1997; QUIRYNEN *et al.*, 2009).

Dentro dos casos relacionados a cavidade oral podemos citar os de origem da saburra lingual (51%), periodontal (13%), ou combinação de ambos (22%), e o restante a pobre higiene oral, alterações salivares (mudança do pH e hipossaliva), entre outras causas (estomatite, neoplasia intraoral, necrose pulpar, pós extração) (AMIR; SHIMONOV; ROSENBERG, 1999; BOLLEN; BEIKLER, 2012; DAL RIO *et al.*, 2006; MAROCCHIO; CONCEIÇÃO; TÁRZIA, 2009; QUIRYNEN, 2009).

Acredita-se que a fonte primária de exalação dos CSV esteja na parte posterior de língua e que estes gases são emitidos principalmente por bactérias anaeróbicas gram-negativas (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacterioides loescheii*, *Enterobacteriaceae*, *Tannerella forsythensis*, *Centipeda periodontii*, *Eikenella coorodens*) (LIU; ZHU; HUANG, 2009; SALAKO; PHILIP, 2011).

Os CSV produzidos pelo metabolismo dessas bactérias são: sulfeto de hidrogênio (SH_2) – encontrados em dorso de língua, metilmercaptanas (CH_3SH) – presentes na doença periodontal e o dimetilsulfeto (CH_3SCH_3) de origem extraoral, e a concentração dos mesmos pode ser utilizada como um indicador de halitose (CALIL; MARCONDES, 2006; SPRINGFIELD *et al.*, 2001; TANGERMAN; WINKEL, 2008; TOLENTINO; CHINELLATO; TARZIA, 2011).

O diagnóstico de halitose pode ser realizado de duas maneiras: de uma forma subjetiva conhecida como método organoléptico e objetivamente através de monitores de sulfeto ou por cromatografia gasosa (KARA; TEZEL; ORBAK, 2006; KARA *et al.*, 2008).

No método organoléptico um avaliador treinado e calibrado é posicionado a uma distância de 10cm do avaliado que deve nesse momento respirar normalmente e contar até 10. O resultado dessa avaliação é determinado por uma escala denominada Escala de Rosenberg quantificada de acordo com o ar expirado pelo olfato do julgador. Onde 0 representa ausência de odor, 1 odor dificilmente detectado, 2 odor leve, 3 odor moderado, 4 odor forte, 5 odor extremamente forte. (BOLLEN; BEIKLER, 2012; ROSENBERG; MCCULLOCH, 1992). É um método de fácil execução e que não requer aparatos externos, porém depende muito da calibração do avaliador (VANDERCKHOVE *et al.*, 2009).

Os métodos objetivos mais utilizados são: os monitores de sulfeto, como o Halimeter (Interscan Corporation, Chatsworth, CA, USA) (DONALDSON *et al.*, 2007; ROSENBERG; MCCULLOCH, 1992; ROSENBERG, 1990) que determina a quantidade total de CSV, e que um valor acima de 80 ppb (partes por bilhão) determina presença de halitose. Porém esse equipamento não é sensível ao dimetilsulfeto e não diferencia a origem ou tipo de CSV. E a cromatografia gasosa, como o OralChroma™ (Abilit Corporation, Miyamae-KU Kawasaki-shi, Kanagawa, Japan), em que é possível a mensuração individual dos três tipos de CSV, permitindo avaliar a intensidade e origem (BOLLEN; BEIKLER, 2012; SALAKO; PHILIP, 2011; TANGERMAN; WINKEL, 2008).

Na literatura, foi encontrado somente um estudo de prevalência de halitose em

adolescentes coreanos, onde foram avaliados 359.263 participantes e destes 23,6% apresentavam halitose (KIM *et al.*, 2015). Semelhante com a prevalência em pacientes adultos.

A halitose em adolescentes tem algumas características distintas quando comparada com adultos, por exemplo, algumas doenças comuns em adultos que podem causar halitose como diabetes, doença renal e hepática, são mais difíceis de encontrar em adolescentes quando comparadas as suas prevalências de acordo com a faixa etária. Também podemos relacionar ao diferente estilo de vida e circunstâncias do meio ambiente que pode afetar o hálito como por exemplo, a quantidade de ingestão de “junk food”, e a pouca preocupação com os hábitos de higiene oral. (KIM *et al.*, 2015; PADILHA, 2006)

A halitose pode modificar o convívio social dos adolescentes prejudicando sua autoimagem. O adolescente tem a necessidade de ser aceito pelo grupo e em círculos de amizade. A aceitação social está relacionada a aparência, a habilidade de falar claramente e a ausência de halitose. Adolescentes que sofrem de halitose acabam criando uma barreira para a socialização (PADILHA, 2006).

Considerando os fatos acima citados e os poucos estudos de halitose com adolescentes, foi definido que os adolescentes seriam o público ideal para fazer parte deste estudo, baseado no fato de que é uma época em que ocorrem várias transformações e descobertas.

1.1 Tratamento

Atualmente o tratamento convencional da halitose quando relacionado a alterações orais consiste na redução química dos microrganismos com enxaguatórios (clorexidina 0,2%, óleos essenciais, triclosan e água oxigenada), redução mecânica dos nutrientes intraorais com raspador ou escova lingual, mascaramento do odor (gomas de mascar, tabletes de menta e spray) e transformação do CSV (Zinco associado a clorexidina) (BOLLEN; BEIKLER,

2012; QUIRYNEN; MONGARDINI; VAN STEENBERGHE, 1998; QUIRYNEN *et al.*, 2004; RAANGS; WINKEL; VAN WINKELHOFF, 2013; SAAD; GREENMAN; SHAW, 2011; SAAD; HEWETT; GREENMAN, 2012; TOLENTINO; CHINELLATO; TARZIA, 2011). Por outro lado a redução da carga bacteriana é dificultada devido as características irregulares da superfície do dorso lingual, revestido por numerosas papilas (COLLINS L; DAWES, 1987; QUIRYNEN; MONGARDINI; VAN STEENBERGHE, 1998; QUIRYNEN *et al.*, 2004).

De dez anos para hoje foram encontradas na literatura 5 revisões sistemáticas (RS) (consideradas o mais alto nível de evidência científica) sobre o tratamento da halitose.

Em 2006, Outhouse *et al.*, buscaram estudos que comparassem o raspador lingual e a limpeza da língua com outros métodos para o controle da halitose, encontraram somente 2 ensaios clínicos elegíveis e os resultados indicaram uma pequena, mas estatisticamente significativa diferença na redução dos níveis de CSV, quando raspadores e outros produtos de limpeza de língua eram utilizados quando comparados a escovação sozinha.

Em 2010, Van *et al.*, realizaram uma RS com o objetivo de comparar a limpeza mecânica com a não mecânica de língua, foram encontradas 5 publicações elegíveis e concluíram que a limpeza mecânica da língua seja com o raspador ou com a escova promoveu uma diminuição do mal odor e saburra lingual. Porém, esses dados foram insuficientes quando para o tratamento do mal odor crônico (halitose).

Em 2012, Blom *et al.*, buscaram em sua revisão os efeitos dos enxaguatórios no tratamento da halitose, obtiveram 12 estudos elegíveis e as evidências mais convincentes foram as que utilizaram enxaguatórios contendo clorexidina e cloreto de cetilperidíneo, porém, nenhum estudo mostrou um efeito benéfico para a saburra lingual.

Em 2013, Kuo *et al.*, realizaram uma RS com metanálise para comparar dois tipos de higiene oral, com ou sem limpeza da língua, foram encontrados 5 ensaios clínicos randomizados elegíveis e concluíram que a escovação com a limpeza da língua reduziu o nível da halitose comparada com a escovação

sozinha, mas sem evidências suficientes quanto à frequência, duração e métodos de limpeza da língua.

A última encontrada e mais recente foi em 2015, Slot *et al.*, realizaram uma RS com o objetivo de avaliar o efeito do dentífrício, enxaguatórios, limpeza de língua ou qualquer combinação destes para o tratamento da halitose, encontraram 12 ensaios clínicos elegíveis e concluíram que a evidencia é limitada e o efeito potencial das formulações ainda não está claro. Porém existe mais evidências para enxaguatórios que contém ingredientes ativos, mas que a força para recomendação destes produtos ainda é fraca.

1.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês aPDT) também conhecida como aPDT envolve a utilização de um fotossensibilizador que é ativado pela luz de um específico comprimento de onda na presença de oxigênio, e a transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, conhecida como oxigênio singleto e radicais livres. Estes são espécimes químicos altamente reativos, que danificam proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares microbianos (PINHEIRO *et al.*, 2014, HOPE; WILSON, 2006; WILSON, 2004).

Foi estabelecido que o fotossensibilizador possui uma carga catiônica pronunciada, e pode se ligar rapidamente as células bacterianas e assim o fotossensibilizador tem um elevado grau de seletividade para matar microrganismos em comparação com as células hospedeiras (WAINWRIGHT, 1998).

É uma técnica de fácil aplicação e que não promove resistência microbiana e não causa efeitos sistêmicos (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Diante do exposto e da dificuldade em se definir um tratamento preciso para halitose e a falta de estudos conduzidos com a utilização da terapia fotodinâmica na saburra lingual, o objetivo deste estudo foi realizar um ensaio clínico e microbiológico para avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica para

o tratamento da halitose em adolescentes.

2. JUSTIFICATIVA

A halitose é um problema que afeta uma grande parte da população mundial e a sua presença está diretamente relacionada a uma dificuldade no convívio social. Sua principal causa é a eliminação de CSV produzidos por bactérias anaeróbicas.

Como já foi apresentado na literatura, a aPDT é bastante utilizada como uma terapia antimicrobiana e é uma possível alternativa conservadora para o tratamento da halitose, além de ter um baixo custo, fácil execução e ser um procedimento rápido. Como ainda existe muito questionamento referente a diagnóstico e tratamento preciso, bem como a escassez de estudos relacionados diretamente ao efeito da aPDT na halitose, este estudo se propôs a avaliar a efetividade da aplicação da aPDT no biofilme lingual de adolescentes com halitose.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ou não a remoção mecânica da saburra lingual de adolescentes com halitose, por uma avaliação do nível CSV por cromatografia gasosa e análise microbiológica por UFC/ml.

4.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo seguiu as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos com parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho número 313.779/2013 (Anexo 1), e os responsáveis pelos participantes assinaram o termo de consentimento livre após esclarecimentos para autorização da participação na pesquisa (Anexo 2), de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional Saúde. Este estudo recebeu auxílio FAPESP nº2013/13032-8. E registro de Clinical Trials NCT02007993.

4.1. Delineamento

Tipo de Estudo: Estudo clínico, microbiológico e randomizado.

4.1.1. Hipótese

Hipótese nula: Não há alteração da halitose clínica e microbiológica após o uso da terapia fotodinâmica associada ou não ao raspador de língua.

Hipótese experimental: Há diminuição da halitose clínica e microbiológica após o uso da terapia fotodinâmica associada ou não ao raspador de língua.

4.2. Sujeitos da Pesquisa

Para este estudo foram avaliados adolescentes de ambos os sexos, matriculados regularmente no Instituto Meninos de São Judas Tadeu – São Paulo e estudantes da Universidade Nove de Julho.

4.2.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos nesta pesquisa: adolescentes na faixa etária de 12 a 19 anos, com termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) e adolescentes com diagnóstico de halitose apresentando resultados Oralchroma™ com desafio da cisteína SH₂ ≥ 112 ppb (AIZAWA *et al.*, 2005; PHAM *et al.*, 2011; SALAKO; PHILIP, 2011; TANGERMAN; WINKEL, 2008).

4.2.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos: em tratamento ortodôntico e/ou ortopédico, com dispositivo removível, implante e/ou prótese, com doença periodontal, com dentes cariados, em tratamento oncológico, com diabetes mellitus, alterações sistêmicas (gastrointestinais, renais, hepáticas), otorrinolaringológicos e respiratórios, em tratamento com antibiótico até 1 mês antes da pesquisa, grávidas e com hipersensibilidade ao fotossensibilizador.

4.3.Procedimentos

Por se tratar de um estudo clínico randomizado e buscando uma maior transparência e qualidade dessa pesquisa, utilizamos as recomendações CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) (figura 1).

4.3.1. FLUXOGRAMA

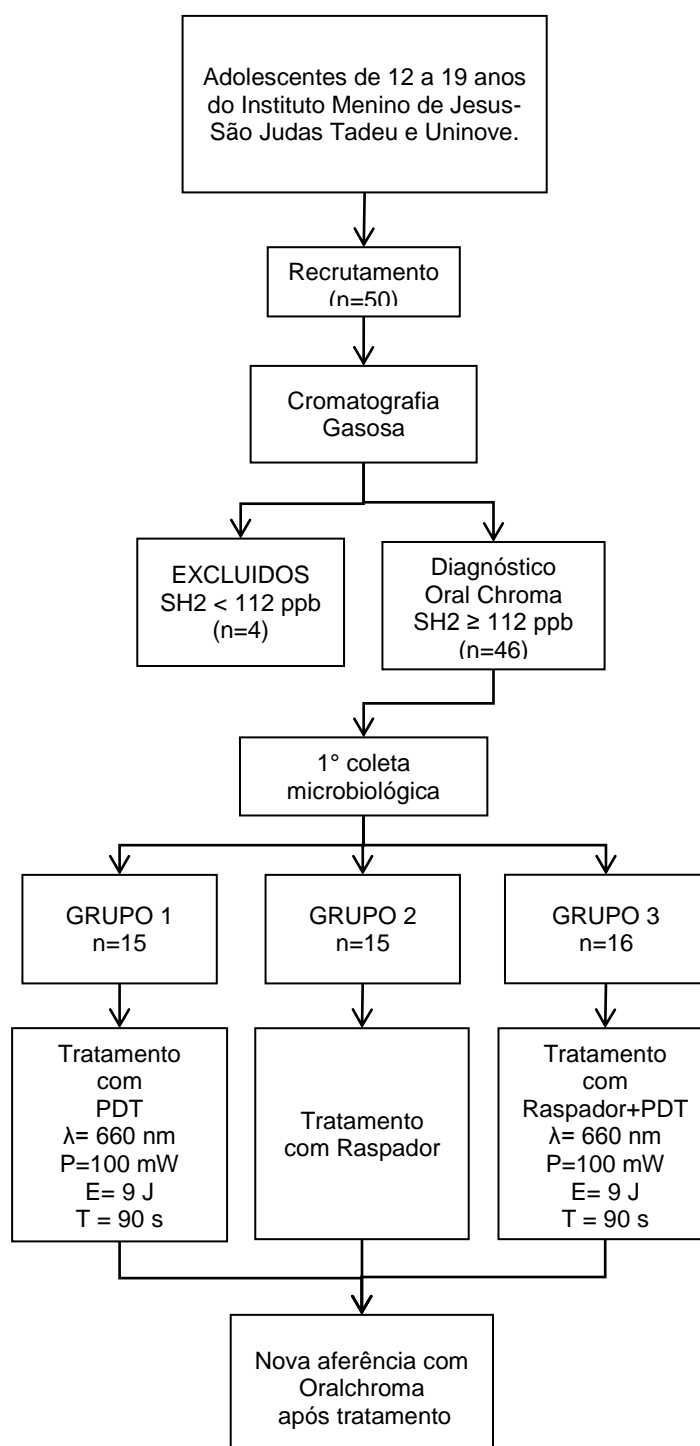


Figura 1 – Fluxograma

Os sujeitos selecionados foram aleatoriamente divididos em 3 grupos em blocos de acordo com a ordem de chegada, o primeiro para o grupo 1, o segundo para o grupo 2 e o terceiro para o grupo 3 e assim sucessivamente, e conforme descrito no quadro 1 todos foram submetidos à avaliação com Oralchroma™ antes e depois de cada tratamento proposto.

Quadro 1: Resumo da condição experimental.

Grupo	N	Halimetria	Tratamento
1	15	SH ₂ ≥ 112 ppb	PDT (6 pontos, E = 9J, T= 90s)
2	15	SH ₂ ≥ 112 ppb	Raspador Lingual
3	16	SH ₂ ≥ 112 ppb	Raspador lingual + PDT (6 pontos E = 9J, T= 90s).

4.3.2. Avaliação do nível de halitose

A literatura descreve alguns métodos de mensuração de halitose, como a avaliação organoléptica do ar emanado da cavidade oral (ROSENBERG, 1990; ROSENBERG *et al.*, 1991), por monitor de sulfeto (KARA *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2011; ROSENBERG *et al.*, 1991) e por cromatografia gasosa (MOTTA *et al.*, 2011; SALAKO; PHILIP, 2011; VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2009). Como o teste organoléptico pode ser influenciado pela capacidade olfatória, estado emocional do examinador e por condições climáticas (ROSENBERG; MCCULLOCH, 1992), para este estudo foi utilizado o

dispositivo portátil Oralchroma™ (Abilit, Japan) (figura 2), que utiliza um sensor de gás semicondutor altamente sensível aos CSV e de fácil utilização.



Figura 2 – OralChroma™

A coleta do ar seguiu as orientações do fabricante (OralChroma™ Manual Instruction), onde o participante foi orientado a fazer bochecho com cisteína (10 mM) por 1 minuto para diferenciar a origem dos CSV e permanecer com a boca fechada mais 1 minuto. Em seguida foi introduzido na boca do paciente uma seringa estéril descartável do mesmo fabricante, própria para coleta. O paciente permaneceu de boca fechada, respirando pelo nariz, sem tocar na seringa com a língua. A coleta do ar era realizada após 3 aspirações do ar com a seringa de dentro da boca do paciente. Após essa coleta e limpeza da ponta da seringa foi acoplada uma agulha de injeção de gás e removido o excesso de ar para o conteúdo de 0,5ml e injetado na porta de entrada do aparelho com um movimento único (figura 3) (TANGERMAN; WINKEL, 2008).



Figura 3 – Processo de realização da halimetria.

O Oralchroma™, permite a captura de valores de concentração dos gases, medindo os limiares dos CSV (de 0 a 2913 ppb), com muita precisão após 8 minutos. Os resultados são armazenados no próprio aparelho e podem ser resgatados e visualizados a qualquer momento para comparação antes, durante e após o tratamento.

Da análise dos CSV, temos como indicadores de halitose:

- Sulfeto de hidrogênio: origem principalmente das bactérias presentes no dorso da língua. Valores acima de 112 ppb são indicadores de halitose.
- Metilmercaptanas: predominantemente mais elevada nas bolsas periodontais. Valores até 26 ppb são considerados normais. A doença periodontal resulta tipicamente numa alta razão entre metilmercaptana/sulfidreto (>3:1)
- Dimetilsulfeto: tanto pode ser de origem periodontal como de origem sistêmica (intestinal, hepática, pulmonar). Há possibilidade de se fazer a distinção entre o dimetilsulfeto de origem bucal e o de origem sistêmica, através da comparação dos resultados da halimetria feita no Oralchroma™ com e sem o desafio da cisteína (cisteína 10 mM, ou seja, 16 mg de cisteína em 100 ml de água destilada – 16 mg%).

Para evitar alterações na halimetria os participantes foram instruídos a seguir as seguintes orientações: 48 horas antes da avaliação evitar a ingestão de alimentos com alho, cebola e temperos fortes, consumo de álcool e uso de antisséptico bucal. No dia da avaliação, pela manhã, puderam alimentar-se até no máximo 2 horas antes do exame, abster-se de café, balas, goma de mascar,

produtos de higiene oral e pessoal com perfume (pós-barba, desodorante, perfume, cremes e/ou tônico).

4.3.3. Aplicação da aPDT

Para a terapia fotodinâmica foi utilizado o aparelho THERAPY XT-EC® (DMC ABC Equipamentos Médicos e Odontológicos, SP, BR) (figura 4), com emissão de LASER vermelho (660nm), e ponta com diâmetro de 0,094 cm.



Figura 4 – Aparelho Therapy XT-EC - DMC ®

No momento da aplicação da aPDT estavam presentes somente o voluntário a ser tratado e o profissional responsável, ambos utilizando óculos específicos para proteção ocular. A ponta ativa do laser foi revestida com plástico transparente descartável (PVC) e o profissional foi devidamente paramentado. Foi realizada 1 sessão de aPDT com FS azul de metileno manipulado na concentração de 0,005%(Formula e Ação) e aplicado em quantidade suficiente para cobrir o terço médio e posterior do dorso da língua com tempo de pré irradiação de 5 minutos, o excesso foi removido de forma a manter a superfície úmida com o próprio FS, sem utilização de água. Foram irradiados 6 pontos com distância de 1 cm entre os pontos, considerando o halo de espalhamento da luz e efetividade da aPDT (figura 5). Com base em estudo prévio realizado (LOPES *et al.*,2015, LOPES *et al.*, 2014), o aparelho estava previamente calibrado com comprimento de onda 660nm, energia de 9J e potência de 100mW para os grupos 1 e 3 que foram irradiados durante 90 segundos por ponto, fluência de 320 J/cm² e irradiância de 3537mW/cm², com método de aplicação pontual e em contato direto com a língua.

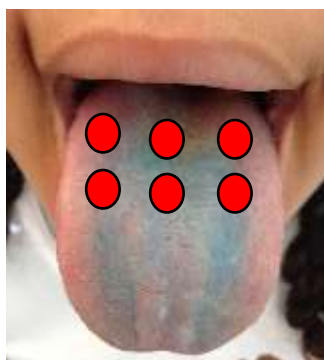


Figura 5 – Pontos de aplicação da TFD

Quadro 2: Parâmetros do Laser

PARÂMETROS	LASER VERMELHO
Comprimento de onda [nm]	660
Largura espectral (FWHM) [nm]	5
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência [mW]	100
Polarização	Random
Diâmetro de abertura [cm]	0,094
Irradiância na abertura [mW/cm ²]	3537
Perfil do feixe	Multimodo
Área do feixe [cm ²]	0,02827
Irradiância no alvo [mW/cm ²]	3537
Tempo de exposição [s]	90
Fluência [J/cm ²]	320
Energia [J]	9
Número de pontos irradiados	6
Área irradiada [cm ²]	0,169
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	1 sessão

Energia total irradiada [J]	54
-----------------------------	----

4.3.4. Análise Microbiológica

As coletas foram realizadas antes e imediatamente após o tratamento. Foram coletadas amostras de saburra lingual com swab e este foi embebido em meio de transporte reduzido (Aimes de Carvão) (Fig. 6 e 7). Após a coleta essas amostras eram levadas com um tempo máximo de 2 horas para o laboratório de análise.

As amostras foram colocadas no Vortex por aproximadamente 1 minuto. Depois de homogeneizadas, a série de diluição de dez vezes foi preparada em 180µl de solução de PBS estéril e alíquotas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , transferidas para placas de ágar sangue de carneiro. Considerando que as principais bactérias responsáveis pela produção do CSV são anaeróbicas, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose por 72h a 37°C e foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (RAANGS G *et al.*, 2013; Kara C *et al.*, 2008) (Fig. 8-10).



Fig. 6



Fig.7



Fig. 8



Fig. 9

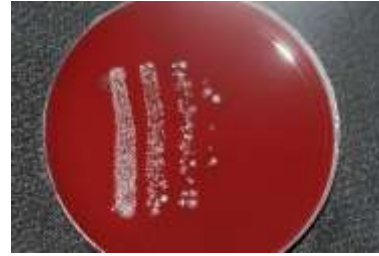


Fig.10

Figura 6 – Swab embebido em meio de transporte reduzido

Figura 7 – Coleta do dorso de língua com swab

Figura 8 - Homegeinização.

Figura 9 – Placas de poços para diluição.

Figura 10 – Estrias pós incubação por 72horas para contagem de UFC/ml.

4.4.Cálculo da amostra

Apesar de os dados desse estudo já indicarem uma diferença estatisticamente significativa, o cálculo do tamanho amostral foi aprofundado para considerar também o poder do teste.

Baseado nos dados do estudo, foi feita uma simulação do poder do teste (Kruskal Wallis ANOVA) em função do tamanho amostral, conforme pode ser observar na figura 11.

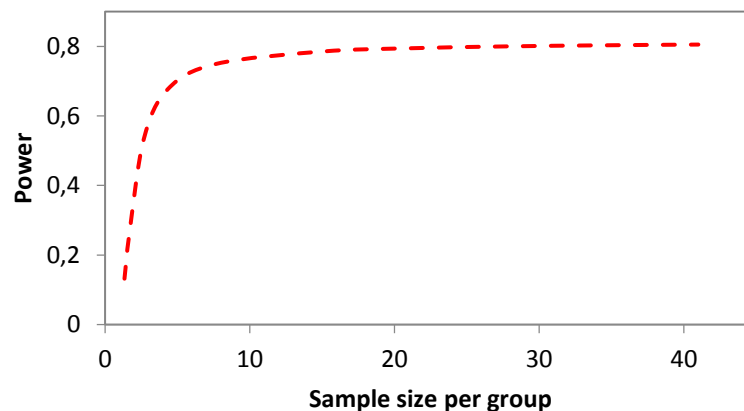


Fig.11 - poder do teste em função do tamanho amostral

A figura 11 mostra que, para um tamanho amostra $N = 15$ por grupo, o poder do teste foi de 80%.

4.5.Organização e Tratamento Estatístico dos Dados

Os dados oriundos do Oralchroma™ foram analisados pelo teste de Shapiro – Wilk e a hipótese de normalidade foi rejeitada. Para análise estatística comparativa entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Como as amostras eram normais (Shapiro – Wilk $p > 0,01$), para a verificação das unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) antes e após o tratamento foi utilizado o teste ANOVA. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Artigo publicado da primeira etapa do estudo

Lopes RG, da Mota AC, Soares C, Tarzia O, Deana AM, Prates RA, França CM, Fernandes KP, Ferrari RA, Bussadori SK. Immediate results of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents: a randomized, controlled, clinical trial. Lasers Med Sci. 2015 Oct 28

Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510574> (Anexo 3).

Para este estudo foram realizadas as avaliações clínicas com os resultados obtidos com o Oralchroma™ antes e imediatamente após o tratamento e a análise microbiológica por contagem de UFC/ml, antes e após o tratamento.

Foram avaliados 50 pacientes, destes 4(8%) não apresentavam halitose, ou seja, apresentaram nível de SH₂ < 112 ppb.

Um total de 46 participantes foram incluídos nesta etapa do estudo, com idade mínima de 12 anos e máxima de 19 anos (média de idade de 14,80 anos, com desvio padrão de 2,50) e 48% do gênero masculino (n=22) e 52% do gênero feminino (n=24).

5.2. Avaliação Clínica

Após halimetria inicial foi constatado que todos os participantes estavam com halitose proveniente do biofilme lingual, com nível de SH₂ acima de 112 ppb sem diferença significativa entre os grupos (p=0,4598) (tabela 1).

Tabela 1 – Mediana de valores obtidos de SH₂ na halimetria inicial.

	N	Mediana (SH ₂ em ppb)	Mínima	Máxima
Grupo 1	15	1141	220	2286
Grupo 2	15	1562	247	2286
Grupo 3	16	1162	198	2286

Abreviações: SH₂ – sulfidreto; ppb – partes por bilhão.

Comparando os grupos depois do tratamento a análise de Kruskal – Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,0178$). Na análise estatística intergrupos antes e depois do tratamento a redução de SH₂ foi significativa. Quando comparadas as medianas antes e depois do tratamento, o grupo 1 reduziu em 97,6% (PDT $p=0,0015$), o grupo 2 reduziu 92,6% (raspador lingual $p=0,0015$) e o grupo 3, redução de 100% do nível de SH₂ (PDT +Raspador lingual $p=0,0007$) (tabela 2).

Tabela 2 – Mediana de valores obtidos de SH₂ na halimetria final.

	N	Mediana (ppb)	Mínima	Máxima
Grupo 1	15	27	0	259
Grupo 2	15	116	0	952
Grupo 3	16	0	0	244

Comparando os grupos depois de 7 dias do tratamento a análise de Kruskal – Wallis mostra que não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0.1704$). Na análise estatística intergrupos antes e depois 7 dias do tratamento a redução de SH₂ não foi significativa (Tabela 3)

Tabela 3 - Mediana dos valores obtidos de SH₂ na halimetria após 7 dias.

	N	Mediana (SH ₂ em ppb)	Mínima	Máxima
Grupo 1	7	1239	1	2286
Grupo 2	10	522,5	1	2286
Grupo 3	7	508	1	2286

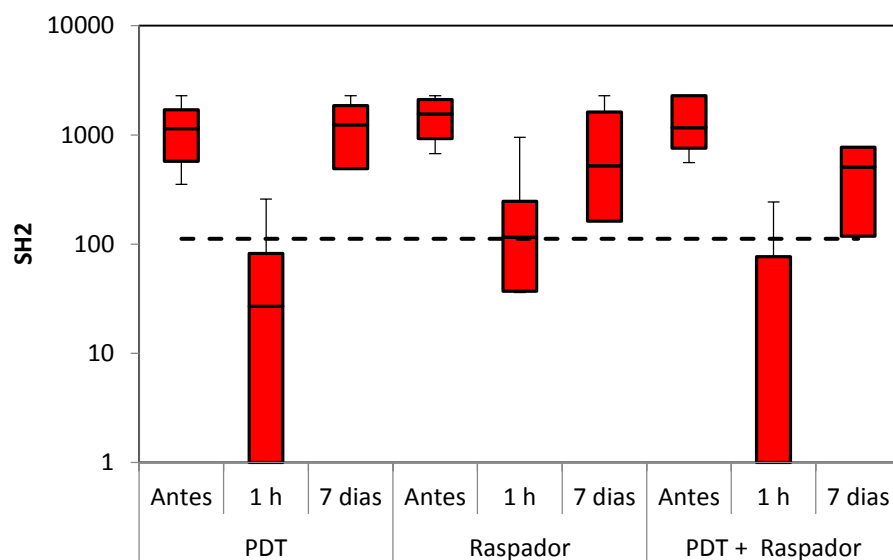


Figura 12 – Gráfico comparativo entre grupos e intergrupos antes e depois do tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2 ($p=0,0501$) e grupos 1 e 3 ($p=0,4395$), porém houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 3 ($p= 0,0057$) (Student-Newman-Keuls).

5.3. Avaliação Microbiológica

Como os dados foram paramétricos (Shapiro – Wilk $p>0.01$) para a análise microbiológica para comparação da diferença entre os grupos após o tratamento foi utilizado o teste ANOVA. A figura 13 mostra o gráfico box plot comparativo da diferença entre os grupos após o tratamento em UFC/ml (apresentados em \log_{10}). Pode-se observar uma diminuição de UFC/ml de 7% para o grupo 1 (aPDT), aumento pós tratamento de 7% no grupo 2 onde foi utilizado o raspador, e permaneceu igual para o grupo 3 (aPDT + Raspador). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2 ($p<0,01$). Porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos 1 e 3 e os grupos 2 e 3 ($p>0,05$). Para comparação antes e após o

tratamento foi utilizado o teste t com correção de Bonferroni e não foi possível observar diferença estatisticamente significativa antes e após o tratamento para todos os grupos ($p > 0,05$) (Figura 14).

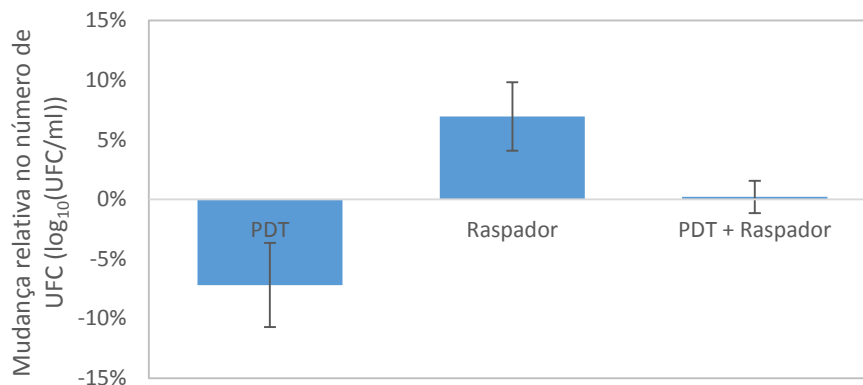


Figura 13 - Gráfico Box plot (\log_{10} (UFC/ml) após o tratamento.

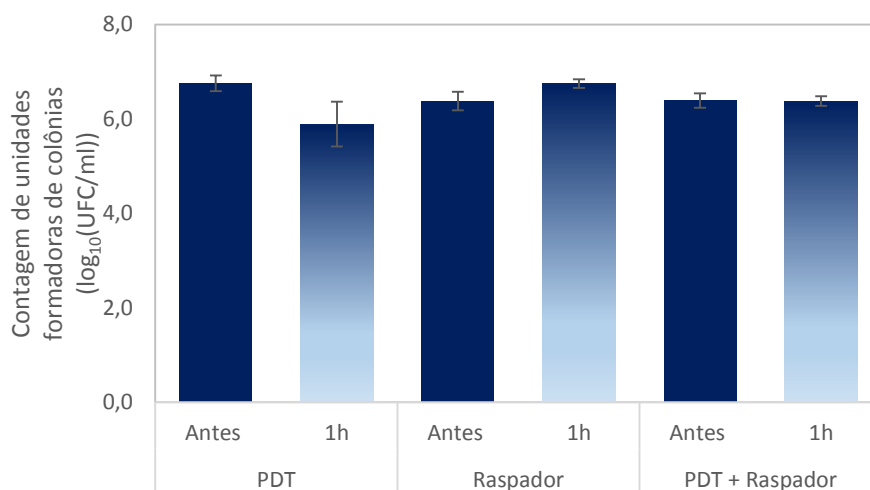


Figura 14 – Gráfico da diferença antes e após o tratamento (\log_{10} UFC/ml).

6. DISCUSSÃO

Com os dados obtidos neste estudo foi possível observar um resultado imediato, com a eliminação do mal odor pela redução da concentração dos

CSV especificamente dos níveis de SH₂ quando utilizamos o tratamento com a terapia fotodinâmica no dorso de língua de adolescentes com halitose. Este resultado corrobora com estudo prévio realizado pelos autores Lopes *et al.*, 2015 e 2014 (LOPES *et al.*, 2015,2014).

Quando feita a análise microbiológica após o tratamento foi possível observar uma diminuição de 7% na carga microbiana para o grupo aPDT, aumento de 7% para o grupo que foi utilizado o raspador lingual e igual quantidade para o grupo aPDT e raspador lingual. Foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2.

Deve-se ressaltar que não é que o raspador não funcione, mas que provavelmente ele desorganize o biofilme e as bactérias fiquem mais expostas ao meio e mais fáceis de serem captadas pelo swab quando realizamos as coletas microbiológicas. O mesmo possivelmente tenha ocorrido com o grupo 3. Já para o grupo 2 observou-se que houve uma diminuição da carga microbiana com a utilização da aPDT.

Este resultado difere do apresentado por Gondhalekar *et al.*, 2013, que analisaram microbiologicamente a escovação da língua e a raspagem da língua e obteve uma resposta satisfatória na quantidade de UFC/ml, porém avaliaram grupos de *Streptococcus mutans* (GONDHALEKAR *et al.*, 2013).

Corrobora com os estudos de Ademovski *et al.*, 2012 e 2013 que mostraram um resultado satisfatório do raspador lingual para a diminuição nos níveis de CSV, sem uma diminuição da contagem de bactérias retiradas do dorso de língua (ADEMOVSKI *et al.*, 2012;2013).

Como as bactérias mais encontradas na saburra lingual e responsáveis pela emissão de CSV são semelhantes as encontradas na doença periodontal, os resultados desses estudos corroboram com os resultados dos estudos realizados por Mongardini *et al.*, 2014 e Kolbe *et al.*, 2014 que mostraram a eficácia da aPDT como um tratamento adjunto ao tratamento periodontal

convencional, diminuindo a carga bacteriana presente nesses casos (MONGARDINI *et al.*, 2014; KOLBE *et al.*, 2014).

Como o meio oral é colonizado por diversos microorganismos e a aplicação da terapia fotodinâmica é realizada em seis pontos específicos no dorso de língua, a hipótese que pode explicar o resultado microbiológico desse estudo é que possivelmente quando é feito esse tipo de coleta microbiológica capta-se bactérias que estão presentes, porém que não estavam nos locais exatos onde a irradiação foi realizada, já que a superfície do dorso da língua tem uma área grande quando comparada com a área de absorção do FS e irradiação do laser. Provavelmente por isso não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com a coleta inicial através de uma análise por contagem de UFC/ml. Porém como foi obtido um resultado clínico imediato satisfatório é possível considerar que as bactérias que foram atingidas pela terapia fotodinâmica já foram suficientes para diminuir o nível de SH₂ e consequentemente a halitose nesses pacientes. Provavelmente, as que colonizavam mais superficialmente o dorso de língua e que estavam mais próximas ao halo de irradiação do laser.

Deve-se ressaltar a importância dos parâmetros utilizados para o sucesso da terapia fotodinâmica, como fluência e o tempo de exposição (PRATES *et al.*, 2009).

Observou-se também que após 7 dias a maioria volta para a condição inicial. Este fato só reforça a ideia que possivelmente qualquer tratamento empregado deva ser acompanhado de reforços positivos e programas de manutenções preventivas. Sendo interessante por parte do profissional fazer essa aplicação inicial para melhorar os níveis de halitose inicial apresentados pelo paciente. Como a avaliação com o Oralchroma™ é uma técnica objetiva de mensuração da halitose ficaria claro para o paciente os resultados imediatos estimulando assim a cooperação do mesmo para a manutenção do tratamento.

Podemos utiliza-la como uma grande coadjuvante nos programas de prevenção e motivação do jovem, promovendo uma dose de ataque em

conjunto com educação, motivação e controle vigilante nos adolescentes com halitose e hábitos de prevenção inadequados.

A halitose é uma condição que tem uma implicação social, ela pode prejudicar significativamente a qualidade de vida, interações sociais, levar diretamente a depressão e baixa autoestima ou outros transtornos do humor, por isso é importante saber identificar e tratar (ZALEWSKA *et al.*,2012). Este estudo promove uma nova abordagem eficaz para o tratamento dessa condição.

A eficácia da aPDT já foi bastante estudada com diferentes combinações de luz e fotossensibilizadores e a maioria dos microorganismos testados mostrou - se susceptível a esse tipo de tratamento (DAHL , MIDDEN , HARTMAN,1989; KOMERIK , MACROBERT, 2006).

Deve-se ressaltar a vantagem da aPDT frente ao raspador lingual por não ter o efeito agressivo causado pela estimulação mecânica da língua, que pode induzir a ruptura da membrana plasmática de células da língua além de causar micro hemorragia (AMANO *et al.*,2007, SEEMAN *et al.*, 2014) sugerindo assim uma limpeza lingual com baixo vigor e com cuidado, que muitas vezes não é seguido rigorosamente pelo paciente, principalmente quando se trata de um adolescente.

Alguns estudos clínicos randomizados mostraram que a geografia da língua fornece um refúgio para as espécies microbianas e funciona como um reservatório de detritos orais dificultando a ação do fluxo salivar e força mastigatória, e os resultados desses estudos que avaliam o impacto da escovação lingual sozinha, associada ao raspador lingual ou a enxaguatórios, indicam que a flora bacteriana da língua é resistente a intervenção mecânica e que os resultados da associação da escova a outros produtos apresenta maior redução bacteriana, contudo essa diferenças é pequena (QUIRYNEN *et al.*,2004, COLLINS, 1987). Ao utilizar a aPDT junto ao raspador lingual a redução do mal odor foi maior firmando a alta eficiência da técnica desenvolvida.

Além da PDT ser uma técnica de fácil aplicação, baixo custo e indolor, e que não gera resistência microbiana.

Consideramos como limitação do estudo o tempo de irradiação por ponto que gerou desconforto ao paciente e isso sugere a realização de mais estudos alterando doses e/ou a fabricação de um equipamento de aplicação única em superfícies maiores, para que se consiga uma radiação de forma homogenia em toda a superfície exposta.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo demonstraram que a aplicação da terapia fotodinâmica no dorso de língua teve um resultado imediato, diminuindo o mal odor com a diminuição da concentração de H_2S .

A aPDT pode ser uma alternativa de tratamento para substituir o uso de raspadores linguais em situações de impossibilidade de remoção mecânica da saburra lingual e por não causar injúrias as papilas, torna-se uma opção para casos que se faz necessário maior redução da carga bacteriana dessa região.

Quanto da análise microbiológica foi possível observar um aumento da carga microbiológica para o grupo que utilizou somente o raspador e uma diminuição para o grupo que utilizou a aPDT. Porém acreditamos que sejam necessários mais estudos para identificação dessas bactérias, bem como ensaios clínicos controlados alterando o tempo de irradiação do laser e tratamentos de controle a longo prazo.

8. REFERÊNCIAS

ADEMOVSKI SE, PERSSON GR, WINKEL E, TANGERMANN A, LINGSTRÖM P, RENVERT S. The short-term treatment effects on the microbiota at the dorsum of the tongue in intra-oral halitosis patients--a randomized clinical trial. **Clin Oral Investig** v.17, n. 2 p. 463-73, 2013.

ADEMOVSKI SE, LINGSTRÖM P, WINKEL E, TANGERMANN A, PERSSON GR, RENVERT S. Comparison of different treatment modalities for oral halitosis. **Acta Odontol Scand** v.70, n. 3 p. 224-33, 2012.

AIZAWA, F. et al. The analysis of characteristics of elderly people with high VSC level. **Oral diseases**, v. 11 Suppl 1, p. 80–2, jan. 2005.

AMANO K, MIYAKE K, BORKE J L, MCNEIL P L. Breaking biological barriers with a toothbrush **J. Dental Res.** 86 p.769–74, 2007.

AMIR, E.; SHIMONOV, R.; ROSENBERG, M. Halitosis in children. **J Pediatr**, v. 134, n. 3, p. 338–43, mar. 1999.

BLOM T, SLOT DE, QUIRYNEN M, VAN DER WEIJDEN GA. The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. **Int J Dent Hyg**, v. 10 n. 3, p. 209-22, 2012.

BOLLEN, C. M. L.; BEIKLER, T. Halitosis: the multidisciplinary approach. **Int J Oral Sci**, v. 4, n. 2, p. 55–63, jun. 2012.

CALIL, C. M.; MARCONDES, F. K. Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds. **Life sciences**, v. 79, n. 7, p. 660–4, 10 jul. 2006.

COLLINS L, M.; DAWES, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. **J Dental Res**, v. 66, n. 8, p. 1300–2, 1987.

DAL RIO, A. C. et al. CO2 laser cryptolysis by coagulation for the treatment of halitosis. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 5, p. 630–6, 2006.

DAHL T, MIDDEN W, HARTMAN P. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **J Bacteriol**. v.171, p. 2188–94, 1989.

DELANGHE G, GHYSELEN J, VAN STEENBERGHE D, FEENSTRA L . Multidisciplinary breath- odour clinic.**Lancet**. v.19 n.350 p.9072, Jul 1997.

GONDHALEKAR R, RICHARD KM, JAYACHANDRA MG, ASLAM S, REDDY VN, BARABDE AS. Effect of tongue cleaning methods and oral mutans streptococci level. **J Contemp Dent Pract**. v. 14, n. 1, p. 119-22, 2013.

HOPE, C.; WILSON, M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 1227–1230, 2006.

KARA, C. et al. Effect of Nd: YAG laser irradiation on the treatment of oral malodour associated with chronic periodontitis. **Int Dent J**, v. 58, p. 151–158, 2008.

KARA, C.; TEZEL, A.; ORBAK, R. Effect of oral hygiene instruction and scaling on oral malodour in a population of Turkish children with gingival inflammation. **Int J Paediatr Dent**, v. 16, n. 6, p. 399–404, nov. 2006.

KIM, S. Y. et al. Prevalence and Associated Factors of Subjective Halitosis in Korean Adolescents. **Plos One**, v. 10, n.10, p.1-11, 2015.

KOLBE MF, RIBEIRO FV, LUCHESI VH, CASARIN RC, SALLUM EA, NOCITI FH JR, AMBROSANO GM, CIRANO FR, PIMENTEL SP, CASATI MZ. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. **J Periodontol**. v. 85, n. 8, p.277-86, 2014.

KOMERIK N, MACROBERT AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** v. 25 p. 487–504, 2006.

KUO YW, YEN M, FETZER S, LEE JD. Toothbrushing versus toothbrushing plus tongue cleaning in reducing halitosis and tongue coating: a systematic review and meta-analysis. **Nurs Res**, v. 62, n. 6, p. 422-9, 2013.

LIU P-F, ZHU W-H, HUANG C-M. Vaccines and Photodynamic Therapies for Oral Microbial-Related Diseases. **Curr Drug Metab.** v. 10, n. 1, p. 90–4, 2009.

LOPES RG, et al. Immediate results of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents: a randomized, controlled, clinical trial. **Lasers Med Sci**, 2015.

LOPES, R. G. et al. Photodynamic Therapy as Novel Treatment for Halitosis in Adolescents: A Case Series Study. **J Laser Med Sci**, v. 5, n. 3, p. 146–152, 2014.

MAROCCHIO, L. S.; CONCEIÇÃO, M. D. DA; TÁRZIA, O. Remoção da saburra lingual: comparação da eficiência de três técnicas. **RGO**, v. 57, p. 443–448, 2009.

MONGARDINI C, DI TANNA GL, PILLONI A. Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. **Lasers Med Sci.**, v.29, n. 1, p. 1-8, 2014.

MOTTA L, J. et al. Association between halitosis and mouth breathing in children. **Clinics**, v. 66, n. 6, p. 939–942, 2011.

OUTHOUSE TL, FEDOROWICZ Z, KEENAN JV, AL-ALAWI R.A. Cochrane systematic review finds tongue scrapers have short-term efficacy in controlling halitosis. **Gen Dent**, v. 54, n. 5, p. 352-9, 2006.

PADILHA MSE. Halitose em adolescentes de diferentes estratos sociais do município de Ribeirão Preto/SP.[TESE]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2006.

PHAM, T. et al. Clinical trial of oral malodor treatment in patients with periodontal diseases. **J Periodont Res**, v. 46, n. 6, p. 722–9, dez. 2011.

PINHEIRO SL, SILVA JN, GONÇALVES RO, VILLALPANDO KT. Manual and rotary instrumentation ability to reduce *Enterococcus faecalis* associated with photodynamic therapy in deciduous molars. **Braz Dent J**. v. 25, n. 6, p. 502-7, 2014.

PRATES RA et al. Light Parameters Influence Cell Viability in Antifungal Photodynamic Therapy in a Fluence and Rate Fluence. **Laser Physics**, v.19, n.5, p.1038-1044, 2009.

QUIRYNEN, M. et al. Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. **J Clin Periodontol**, v. 31, p. 506–510, 2004.

QUIRYNEN, M. et al. Characteristics of 2000 patients who visited a halitosis clinic. **Journal of clinical periodontology**, v. 36, n. 11, p. 970–5, nov. 2009.

QUIRYNEN, M.; MONGARDINI, C.; VAN STEENBERGHE, D. The effect of a 1-stage full-mouth disinfection on oral malodor and microbial colonization of the tongue in periodontitis. A pilot study. **J Periodontol**, v. 69, n. 3, p. 374–82, 1998.

RAANGS, G.; WINKEL, E.; VAN WINKELHOFF, A. In vitro antimicrobial effects of two antihalitosis mouth rinses on oral pathogens and human tongue microbiota. **Int J Dent Hyg**, v. 11, n. 3, p. 203–7, 1 fev. 2013.

ROSENBERG, M. Bad breath, diagnosis and treatment. **Univ Tor Dent J**, v. 3, n. 2, p. 7–11, 1990.

ROSENBERG, M. et al. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. **J Dental Res**, v. 70, n. 11, p. 1436–1440, 1991.

ROSENBERG, M.; MCCULLOCH, C. A. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. **J Periodontol**, v. 63, n. 9, p. 776–82, 1992.

SAAD, S.; GREENMAN, J.; SHAW, H. Comparative effects of various commercially available mouthrinse formulations on oral malodor. **Oral Dis**, v. 17, n. 2, p. 180–6, mar. 2011.

SAAD, S.; HEWETT, K.; GREENMAN, J. Effect of mouth-rinse formulations on oral malodour processes in tongue-derived perfusion biofilm model. **Journal of breath research**, v. 6, n. 1, p. 016001, mar. 2012.

SALAKO, N. O.; PHILIP, L. Comparison of the use of the Halimeter and the Oral Chroma™ in the assessment of the ability of common cultivable oral anaerobic bacteria to produce malodorous volatile sulfur compounds from cysteine and methionine. **Med Princ Pract**, v. 20, n. 1, p. 75–9, jan. 2011.

SEEMANN R, M D CONCEICAO, A FILIPPI, J GREENMAN, P LENTON, S NACHNANI, M QUIRYNEN, S ROLDAN, H SCHULZE, N STERER. Halitosis management by the general dental practitioner—results of an international consensus workshop. **Journal of Breath Research**, v.8, n. 1, 2014.

SLOT DE, DE GEEST S, VAN DER WEIJDEN FA, QUIRYNEN M. Treatment of oral malodour. Medium-term efficacy of mechanical and/or chemical agents: a systematic review. **J Clin Periodontol**. v. 16, p 303-16, 2015.

SPRINGFIELD, J. et al. Spontaneous fluctuations in the concentrations of oral sulfur-containing gases. **J Dental Res**, v. 80, n. 5, p. 1441–1444, 2001.

TANGERMAN, A; WINKEL, E. G. The portable gas chromatograph OralChromaTM: a method of choice to detect oral and extra-oral halitosis. **J Breath Res**, v. 2, n. 1, mar. 2008.

TOLENTINO, E. D. S.; CHINELLATO, L. E. M.; TARZIA, O. Saliva and tongue coating pH before and after use of mouthwashes and relationship with parameters of halitosis. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 2, p. 90–4, abr. 2011.

TONZETICH J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol*, 48:13–20,1977.

VANDEKERCKHOVE, B. et al. Clinical reliability of non-organoleptic oral malodour measurements. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 11, p. 964–9, nov. 2009.

VAN DER SLEEN MI, SLOT DE, VAN TRIJFFEL E, WINKEL EG, VAN DER WEIJDEN GA. Effectiveness of mechanical tongue cleaning on breath odour and tongue coating: a systematic review. **Int J Dent Hyg**. vol. 8, n. 4, . 258-68.

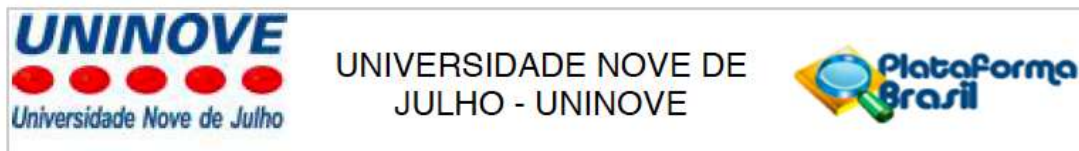
WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 13–28, 1998.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, p. 412–418, 2004.

ZALEWSKA A1, ZATOŃSKI M, JABŁONKA-STROM A, PARADOWSKA A, KAWALA B, LITWIN A. Halitosis--a common medical and social problem. A review on pathology, diagnosis and treatment. **Acta Gastroenterol Belg** v. 75, n. 3, p-300-9, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 - CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO DO USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM ADOLESCENTES COM HALITOSE

Pesquisador: Rubia Garcia Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17482113.1.0000.5511

Instituição Proponente: Universidade Nove de Julho - UNINOVE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 313.779

Data da Relatoria: 24/06/2013

Anexo 2 (TCLE)

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
DIRETORIA DA SAÚDE
MESTRADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do Voluntário: _____

Nome do Responsável: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Email: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela aluna Ana Carolina Costa da Mota (mestranda em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho) e Prof^a. Dr^a Sandra Kalil Bussadori, objetivando firmar acordo escrito mediante o qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1. Título do Trabalho Experimental: Terapia Fotodinâmica No Tratamento Da Halitose Em Adolescentes
2. Objetivos: avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica no nível de halitose em adolescentes de 13 a 18 anos.
3. Justificativa: diante da ausência de relatos na literatura relacionados a utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da halitose, faz-se necessário avaliar esta relação, assim como identificar o nível e o tipo de halitose presente em adolescentes e um protocolo eficaz de tratamento.
4. Procedimentos da Fase Experimental: A pesquisa será realizada com pacientes de ambos os sexos. Primeiramente será verificada a presença ou não de halitose por meio do dispositivo portátil Oral Chroma, onde, coloca-se a seringa própria para a coleta do ar bucal na boca do paciente, com o êmbolo completamente inserido. O paciente fecha a boca, respira pelo nariz e aguarda com a boca fechada por 1 minuto. Pede-se ao paciente que não toque a ponta da seringa com a língua. Puxa-se o êmbolo para fora, volta-se a esvaziar o ar da seringa na boca do paciente e novamente puxa o êmbolo para encher a seringa com a amostra do hálito. Para o tratamento da halitose, o grupo 1 receberá terapia fotodinâmica, o grupo 2 raspador lingual e o 3 terapia fotodinâmica na língua (região de dorso e terço médio) e raspador lingual.
5. Desconforto ou Riscos Esperados: Os voluntários não serão submetidos a riscos durante o período experimental. Nenhum desconforto é esperado para análise dos níveis de halitose. No tratamento com a PDT o paciente pode sentir náusea quando o profissional manipular a língua.
6. Informações: O voluntário tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos benefícios e outros assuntos

relacionados com pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

Qualquer dúvida os responsáveis poderão ser contatados pelos fones: Dra. Sandra (11) 98381-7453 ou Ana Carolina (11) 9979889199. Dúvidas sobre questões éticas deverão ser encaminhadas ao Comitê de ética e pesquisa da Uninove através do email comiteetica@uninove.br.

7. Métodos Alternativos Existentes: A pesquisa citada dispensa qualquer método alternativo.
8. Retirada do Consentimento: o voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.
9. Aspecto Legal: Elaborados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.
10. Garantia do Sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.
11. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da participação na Pesquisa: Serão ressarcidas despesas com eventuais deslocamentos.
12. Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida na Universidade Nove de Julho localizado à Rua Vergueiro, 235 – Liberdade, São Paulo, SP.

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – Liberdade – SP - CEP. 01504- 001 -1º andar

13. Nome Completo e telefones dos pesquisadores para contato:

Orientador: Profª Drª Sandra Kalil Bussadori – Tel (11) 98381-7453

Pesquisadora: Ana Carolina Costa da Mota – Tel (11) 97988- 9199

14. Consentimento pós-informação:

Eu, _____, responsável pelo menor _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que a participação é voluntária e que é permitido se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo no meio científico.

* Não assine este termo se ainda tiver alguma dúvida a respeito.

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

Nome do responsável (por extenso): _____

Assinatura: _____

Anexo 3

DOI 10.1007/s10103-015-1822-6

**ORIGINAL ARTICLE**

Immediate results of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents: a randomized, controlled, clinical trial

Rubia Garcia Lopes¹ & Ana Carolina Costa da Mota¹ & Carolina Soares² & Olinda Tarzia² & Alessandro Melo Deana¹ & Renato Araújo Prates¹ & Cristiane Miranda França¹ & Kristianne Porta Santos Fernandes¹ &

Raquel Agnelli Mesquita Ferrari¹ & Sandra Kalil Bussadori¹

Received: 7 May 2015 / Accepted: 13 October 2015
Springer-Verlag London 2015

Abstract Light with or without chemical agents has been used to induce therapeutic and antimicrobial effects. With photodynamic therapy, the antimicrobial effect is confined to areas covered by a photosensitive dye and irradiated with light. The aim of the present study was to evaluate the effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents through the analysis of volatile sulfur compounds, especially sulfide. A controlled, clinical trial was conducted with 45 adolescents randomly allocated to three groups: group 1, photodynamic therapy administered to the dorsum of the tongue; group 2, treatment with a tongue scraper; and group 3, treatment with a tongue scraper combined with photodynamic therapy. The diagnosis of halitosis was performed using gas chromatography before and after treatment. Comparisons were made using the Kruskal-Wallis test followed by the Student-

Newman-Keuls test, with the level of significance set at 5 % ($p < 0.05$). After treatment, a statistically significant reduction in halitosis was found in all groups ($p < 0.001$). The greatest reduction in total sulfides (median=0) occurred with the combination of tongue scraper and photodynamic therapy. The present study describes a novel option for the treatment of halitosis in adolescents with an immediate effect that does not involve the mechanical aggression of the lingual papillae that occurs with conventional treatment.

Trial registration:

Photodynamic Therapy in Adolescents Halitosis

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02007993?term=NCT02007993&rank=1>)

Number: NCT02007993

Funding:

FAPESP

Number: 2013/13032-8

Keywords Laser .Halitosis .Photodynamictherapy
.Tongue

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) was discovered by Oskar Raab and Hermann von Tappeiner in 1900. In the 1970s, this method was developed as a treatment for cancer.

* Sandra Kalil Bussadori sandra.skb@gmail.com

¹ Biophotonics Applied to Science Health Post Graduation Program, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil

² Center of Excellence in the Treatment of Halitosis, São Paulo, Brazil

reacting with oxygen to form reactive oxygen species. This phototoxic reaction induces the destruction of bacteria. However, the antimicrobial effect is confined to the areas covered by the dye and irradiated with light, acting quickly on the target organism,

depending on the energy dose and output power employed [1–3]. According to Wainwright [4], bacterial resistance to PDT is unlikely, as singlet oxygen and free radicals interact with different bacterial cell structures and metabolic pathways [3].

Halitosis (bad breath) is an unpleasant odor that emanates from the oral cavity that can have a local or systemic origin [5–7]. This is a common problem that affects a large portion of the population worldwide. Halitosis causes embarrassment and is a negative factor in social situations, exerting a direct impact on quality of life [8]. Studies on the etiology of halitosis demonstrate that 2 % of cases are related to metabolic syndromes as well as kidney, liver, endocrine, and gastrointestinal problems, such as infection by *Helicobacter pylori* or intestinal obstruction; 8 % of cases are caused by respiratory and ear-nose-throat problems, such as acute tonsillitis, postnasal drip, and sinusitis; and 80 to 90 % of cases are directly linked to conditions of the oral cavity, such as periodontal disease (13 %), coated

Antimicrobial PDT has been recently employed as a treatment option for localized infections [1].

PDT involves the use of a non-toxic, light-sensitive dye (photosensitizer) combined with light at a visible wavelength that coincides with the absorption spectrum of the photosensitizer, which absorbs the photons and reaches a state of excitation,

tongue (51 %), a combination of periodontal disease and coated tongue (22 %), poor oral hygiene, salivary abnormalities (change in pH and diminished production of saliva), stomatitis, oral tumors, tooth pulp exposure, post-tooth extraction wounds, and dental crowding [9–13].

Halitosis is mainly caused by volatile sulfur compounds (VSCs) produced by anaerobic Gram-negative bacteria, such as *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Eubacterium* [2] on substrates in the oral cavity containing sulfur [14]. The VSCs produced by this metabolism are hydrogen sulfide (H_2S), which is found mainly on the dorsum of the tongue; methanethiol (CH_3SH), which is found in gingival pockets; and dimethylsulfide (CH_3SCH_3), which has an extraoral origin [15]. The concentration of these gases is used as an indicator of halitosis [7, 16]. The anaerobic, Gram-negative bacterium *Solobacterium moorei* (also known as *Bulleidia moorei*) has also recently been associated with halitosis due to the production of H_2S in the presence of different supplementations with amino acids, especially cysteine [17, 18].

Halitosis can be evaluated subjectively or objectively. The objective evaluation involves the use of gas chromatography or a sulfide monitor [19, 20]. Studies that compare the effectiveness of these tests indicate that gas chromatography is the most objective and efficacious method [10, 15] and is currently considered the gold standard for the evaluation of halitosis [14]. However, most researchers have used a combination of both

methods, whereas others have only used the subjective, organoleptic method due to its low cost and easy execution [19].

Conventional treatments for halitosis related to conditions of the oral cavity consist of the chemical reduction of microorganisms with a mouthwash (0.2 % chlorhexidine, essential oils, triclosan, and oxygenated water), the mechanical reduction of intraoral nutrients with the use of a tongue scraper or brush, masking of the odor with chewing gum, mints, and spray, or the transformation of VSC using zinc combined with chlorhexidine [6, 10]. However, the reduction of the bacterial burden is hampered by their regular characteristics of the surface of the tongue [6, 21], which is lined with numerous papillae classified as four different types: fungiform, filiform, vallate, and foliate. Tongue conditions are determined by papillary characteristics and include hairy tongue, coated tongue, fissured tongue, papillary atrophy, geographic tongue, median rhomboid glossitis, crenation tongue, macroglossia, and ankyloglossia [22].

Considering the difficulty in reducing the bacterial burden, questions regarding the precise treatment of halitosis, and the scarcity of studies addressing the use of PDT on coated tongue, the aim of the present study was to evaluate the effectiveness of PDT administered to the dorsum of the tongue in adolescents with halitosis through an analysis of VSCs.

Material and methods

Ethics

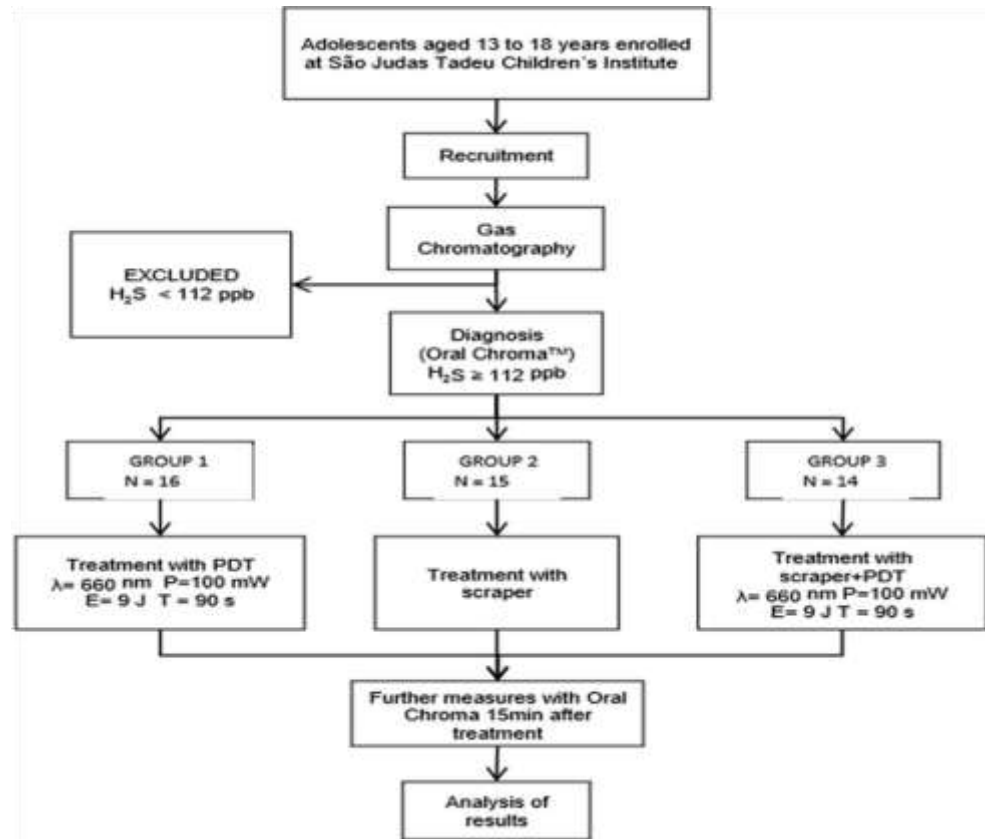
This study received approval from the Human Research Ethics Committee of University Nove de Julho (São Paulo, Brazil) under process number 313.779/2013. All legal guardians received clarifications regarding the objectives and procedures of the study and signed a statement of informed consent, authorizing the participation of the adolescents, in compliance with Resolution 196/96 of the Brazilian National

Board of Health. This study is registered with clinical trials (registry number NCT02007993) and received funding from the State of São Paulo Research Assistance Foundation (FAPESP; process number 2013/13032-8). The protocol for this study was published in trials [23]. As this is a randomized clinical trial, the recommendations of the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) were used to ensure greater transparency and quality (Fig. 1).

Inclusion and exclusion criteria

Forty-five male and female adolescents aged 13 to 18 years enrolled at the São Judas Tadeu Children's Institute in the city of São Paulo, Brazil, were recruited. To participate in the present study, the subjects needed to have a diagnosis of halitosis. The diagnosis was performed using gas chromatography with a cysteine challenge, and individuals with $H_2S \geq 112$ parts per billion (ppb) were accepted [14, 15, 24]. After diagnosis, the selected individuals were randomly divided into three groups in order of arrival, where the first participant was directed to group 1 (n=16), the second to group 2 (n= 15), and the third to group 3 (n=14), continuing the distribution of participants to three groups following the same order. Subjects with dental-facial anomalies, currently undergoing orthodontic or orthopedic treatment, the use of a removable orthodontic appliance, implants or dentures, periodontal disease, dental caries, currently undergoing cancer treatment, diabetes mellitus, systemic (gastrointestinal, kidney, or liver), ear-nose-throat or respiratory disorders, use of antibiotic therapy in the previous 30 days, pregnancy [10], or hypersensitivity to the photosensitizer were excluded from the study.

Fig. 1 Flowchart of study. P output power, E energy, T time in seconds



Diagnosis

The participants were instructed not to consume foods with garlic, onions, or strong spices; drink alcoholic beverages; or use an antiseptic mouthwash 48 h prior to the evaluation. On the day of the evaluation, the participants were instructed not to eat anything 2 h beforehand; abstain from coffee, candy, mints, chewing gum, oral hygiene products, or personal hygiene products with perfume (after-shave, deodorant, perfume, creams, etc.); and brush only with water [13, 25].

The collection of air from the oral cavity was performed following the manufacturer's instructions (OralChroma™ Instruction Manual). Each participant was instructed to rinse his/her mouth with cysteine (10 mM–16 mg of cysteine in 100 ml of distilled water [16 mg%]) [15] for 1 min and maintain the mouth closed for an additional minute. A syringe from the same manufacturer was inserted into the mouth for the collection of 5 ml of air, which was then injected into the input of the equipment with the appropriate needle in a single movement [15].

The OralChroma™ software program was used to measure VSC thresholds (H_2S , CH_3SH , and CH_3SCH_3) and construct a graph showing the peaks (0 to 2913 ppb) after 8 min. Halitosis was determined as H_2S greater than 112 ppb, CH_3SH greater than 26 ppb, and CH_3SCH_3 greater than 8 ppb [15].

The participants were randomly divided into three groups using a block randomization process. Group 1 ($n=16$) was submitted to PDT on the dorsum of the tongue. Group 2 ($n=15$) used a tongue scraper. Group 3 ($n=14$) used a tongue scraper and was submitted to PDT on the dorsum of the tongue.

Photodynamic therapy procedures

The THERAPY XT-EC® (DMC ABC Equipamentos Médicos e Odontológicos, SP, Brazil) was used for PDT. All individuals wore eye protection. The active tip of the laser was covered in disposable plastic wrap (PVC) to avoid contamination, and the operator wore proper vestments.

One session of PDT (groups 1 and 3) was performed with a methylene blue photosensitizer at a concentration of 0.005 % (165 μ M) applied to the dorsum of the tongue with a 5-min pre-irradiation time. Excess photosensitizer was removed with an aspirator to maintain a moist surface without the use of water. Six sites were irradiated. Considering the light scattering halo and effectiveness of PDT, the distance of between sites was 1 cm in both directions. Based on studies addressing the treatment of periodontal disease with PDT [26, 27] and a pilot study [28], the irradiation parameters were used as described in Table 1. The irradiation technique was direct contact with the tongue.

Table 1 Spectral and irradiation parameters

Parameter	
Center wavelength (nm)	660.52
Spectral bandwidth (FWHM) (nm)	0.71
Operating mode	Continuous wave
Average radiant power (mW)	100
Polarization	Random
Aperture radius (cm)	0.095
Power Density (mW/cm ²)	3527
Beam profile	Multimode
Beam spot size at target (cm ²)	0.02835
Irradiance at target (mW/cm ²)	3537
Exposure duration (seconds per point)	90
Energy density (J/cm ²)	317.43
Radiant energy (J)	9
Number of points irradiated	6
Total Area irradiated (cm ²)	0.1701
Application technique	Contact with tongue
Number of treatment sessions	1
Frequency of treatment sessions	Single irradiation
Total radiant energy (J)	54

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to determine the distribution of the data. As the normality hypothesis was rejected ($p < 0.05$), the alternative hypothesis was accepted (i.e., the data present non-normal

distribution). Thus, the data are displayed in a boxplot and median/quartiles table. The inferential analysis was performed using the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons between groups, and Student-NewmanKeuls test was the post hoc test. The Wilcoxon test was used to compare the data before and after each treatment. The significance level for all tests was set to $\alpha = 0.05$.

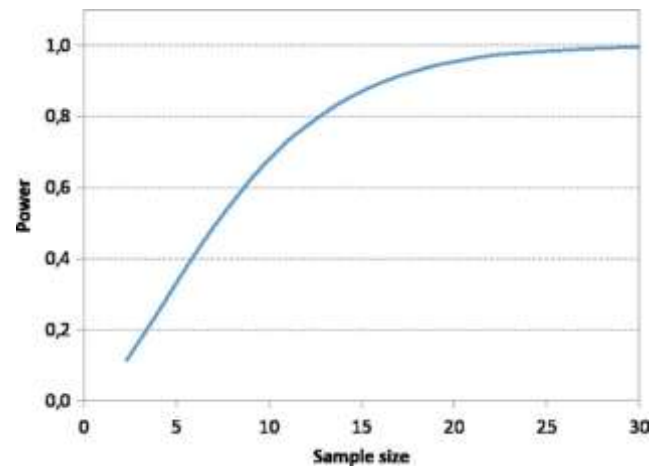


Figure 2 Test power as a function of the sample size per group

Table 2 Demographic data of subjects

	Male, n (%)	Female, n (%)	Age \pm SD
Group 1	68 (75)	31 (25)	13.5 \pm 0.86
Group 2	20	80	14 \pm 1.46
Group 3	35 (72)	64 (28)	14.35 \pm 1.71

Figure 2 shows the power analysis as a function of the group sample size and shows that 15 samples per group would provide a test power > 0.80 at the significance level.

Results

Forty-five adolescents were enrolled in the present study (Table 2).

The initial breath analysis demonstrated that all participants had halitosis stemming from lingual bacteria (H_2S above 112 ppb), with no significant difference among groups ($p = 0.258$): median value of

791 ppb in group 1, 466 ppb in group 2, and 1508 ppb in group 3 (Table 3).

After treatment, significant differences were found among groups ($p=0.0008$; Kruskal-Wallis test), as shown in Table 3 in comparison to Table 4.

Figure 3 shows the boxplot of all groups.

To allow visualization, Fig. 3 was plotted in log-scale. The median H_2S concentration was reduced by 88.6 % in group 1 (PDT, $p=0.0004$), 97 % in group 2 (tongue scraper, $p=0.0007$), and 100 % in group 3 (PDT+tongue scraper, $p=0.0010$)

Comparing all the study groups before the treatment, the Kruskal-Wallis test returned $p=0.2584$; therefore, the null hypothesis was accepted and variation between the groups was likely due to statistical fluctuations. Groups 1 and 2 were also statistically equal after the treatments

Table 4 H_2S concentration during final breath analysis concentration of the photosensitizer, fluency, and fluency rate of

	Number	Median (ppb)	1st quartile (ppb)	3rd quartile (ppb)
Group 1	16	791	270.25	926.5
Group 2	15	466	449.5	1950
Group 3	14	1508	627.5	2846.25

with PDT and scraper, respectively ($p=0.4104$).

However, group 3 (PDT+scraper) differed statistically from groups 1 ($p=0.0003$) and 2 ($p=0.0055$).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effectiveness of PDT for the treatment of halitosis in

Table 3 H_2S concentration during initial breath analysis

	Number	Median (H_2S in ppb)	1st quartile (ppb)	3rd quartile (ppb)
Group 1	16	791	270.25	926.5
Group 2	15	466	449.5	1950
Group 3	14	1508	627.5	2846.25

H_2S hydrogen sulfide, ppb parts per billion

infections in the oral cavity [32]. In the present study, the reduction in halitosis in groups 1 and 3 may be explained by the direct elimination of pathogens on the H_2S hydrogen sulfide, ppb parts per billion surface of the tongue and between papillae caused by phototoxic effect of PDT, as the microorganisms were submitted to high

adolescents through an analysis of the concentration of VSCs, concentrations of reactive oxygen species generated by the irraspecifically H_2S . Gas chromatography using the diation of the photosensitizer. However, the thickness of the linOralChroma™ equipment, which is considered the gold stan- gual biofilm does not allow the complete penetration of the phodard for the objective analysis of halitosis [13, 14], demon- tosensitizer between papillae, which explains the similar results strated that a single session eliminated bad breath due to the achieved in groups 1 and 2.

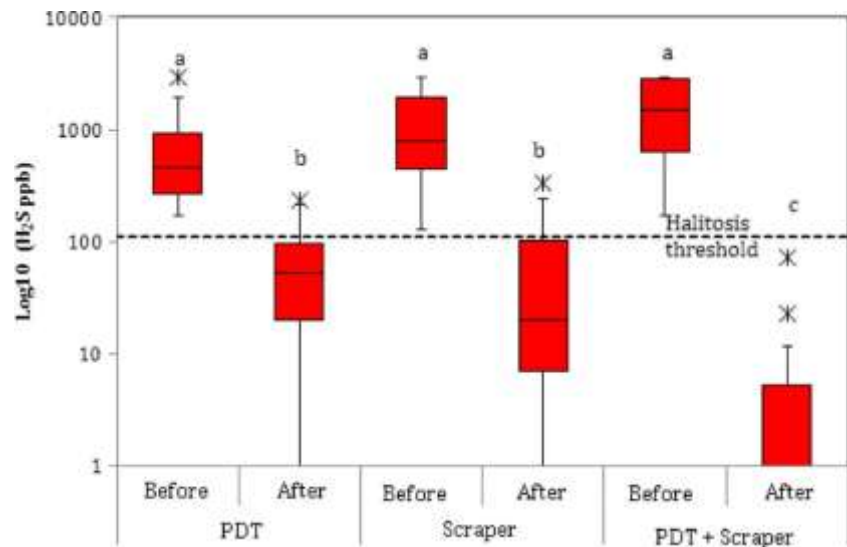
reduction in H_2S . PDT administered to the dorsum of the In a previous study involving 2000 adults, 43.4 % of the tongue achieved a similar result as treatment with a tongue cases of halitosis stemmed from coated tongue, as demonstratscraper, but with the advantage of not having the aggressive ed by the organoleptic test, Halimeter® and OralChroma™ effect of mechanical removal, which can cause the rupture of [13]. Similar findings are described in a study involving chilthe plasma membrane of cells and micro-hemorrhage [29]. dren and adolescents aged 5 to 14 years [9]. Due to the ab-

Over the years, randomized clinical trials have demonstrated the effect of PDT on coated ed that the topography of the tongue provides a refuge for tongue, the parameters employed in the present study were microbial species and serves as a reservoir for oral detritus, based on article describing the treatment of periodontal dis which hinders the action of salivary flow and chewing force ease with PDT [26], in which the use of methylene blue and [6, 21]. The results of these studies, which evaluated the im-wavelengths ranging from 635 to 670 nm successfully repact of tongue brushing with and without the use of a tongue duced levels of *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, and *T. denticola* scraper or mouthwash, indicate that the bacterial flora of the [26], which are also found in coated tongue.

tongue is resistant to mechanical intervention, and the greatest The penetration of light and spreading of the photosensireduction in bacteria was achieved with the combination of a tizer were affected by the lingual biofilm, but not by the patongue brush and other product. However, the difference was pillae. While PDT led to an excellent response, the best results small. In the present study, the combination of a tongue scrap- were achieved with the combination of a tongue scraper and er and PDT led to the complete reduction of H_2S , which dem- PDT, which is in agreement with studies involving PDT in onstrates the high degree of efficiency of the technique. combination with conventional methods for the treatment of

The effect of PDT on microorganisms has been widely inves- periodontal disease [19, 26, 33]. The results in group 3 (100 % tigated using different combination of light and photosensitizers. reduction in H_2S) were likely due to the initial reduction of the The degree of damage caused by light depends on the type and bacterial burden with the tongue scraper, which diminished

Fig. 3 H_2S concentration in different groups before and after treatment. H_2S hydrogen sulfide, ppb parts per billion. Dashed line represents the halitosis threshold (112 ppb). Equal letters represent equality between groups. Asterisks indicate outlier



the thickness of the lingual biofilm and may have allowed better penetration of the photosensitizer and consequent action of PDT on microorganisms located between papillae. However, the bacteria on the dorsum of the tongue were also affected by PDT, as such microorganisms are associated with the production of high concentrations of H_2S [2, 14], especially in the presence of an amino acid, such as cysteine, as demonstrated in both in vivo and in vitro studies [14, 34].

The ease of applicability of the technique and the immediate response favor the control of oral infections in adolescents, who experience intensive hormonal transformations that exert an influence on the gingival inflammatory process, thereby facilitating the occurrence of coated tongue due to the increase in the flaking of the gingival epithelium [34]. This method could be used on adolescents who exhibit mouth breathing, which alters salivary flow and the amount of mucin, thereby favoring the formation of lingual biofilm and consequent halitosis [35, 36]. PDT could also be used on children with postnasal drip, as studies have demonstrated a significant association between bad breath and the direct contact of mucus from the paranasal sinuses with the dorsum of the tongue [9, 10].

The ease of application of the dye in regions of difficult access and the sharp tip of the light device favor the use of PDT and treatment of the posterior region of the tongue. However, the irradiation time per point is a drawback of this method, as it generated discomfort among the participants. Thus, further studies are needed to test different energy doses. Moreover, the development of equipment that allows a single application over a larger surface area would be quite useful.

Implications and contribution

The present study describes a novel option for the treatment of halitosis in adolescents with an immediate effect that does not involve the mechanical aggression of the lingual papillae that occurs with conventional treatment.

Acknowledgments The cooperation of the Center for Excellence in the Treatment of Halitosis and the São Judas Tadeu Children's Institute as well as the support from the FAPESP and Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences of University Nove de Julho, São Paulo, Brazil are greatly acknowledged.

References

1. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG et al (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol* 3:120
2. Liu P-F, Zhu W-H, Huang C-M (2009) Vaccines and photodynamic therapies for oral microbial-related diseases. *Curr Drug Metab* 10(1):90–4
3. Wilson M (2004) Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 3:412–8
4. Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 42:13–28
5. Shimura M, Watanabe S, Iwakura M, Oshikiri Y, Kusumoto M, Ikawa K et al (1997) Correlation between measurements using a new halitosis monitor and organoleptic assessment. *J Periodontol* 68(12):1182–5
6. Quirynen M, Avontroot P, Soers C, Zhao H, Pauwels M, Van Steenberghe D (2004) Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *J Clin Periodontol* 31:506–10
7. Rosenberg M, McCulloch CA (1992) Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol* 63(9):776–82
8. Kizhner V, Xu D, Krespi YP (2011) A new tool measuring oral malodor quality of life. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 268:1227–32

9. Amir E, Shimonov R, Rosenberg M (1999) Halitosis in children. *J Pediatr* 134(3):338–43
10. Bollen CML, Beikler T (2012) Halitosis: the multidisciplinary approach. *Int J Oral Sci* 4(2):55–63
11. Dal Rio AC, Passos CA, Nicola JH, Nicola EMD (2006) CO₂ laser cryptolysis by coagulation for the treatment of halitosis. *Photomed Laser Surg* 24(5):630–6
12. Marocchio LS, da Conceição MD, Tárzia O (2009) Remoção da saburra lingual: comparação da eficiência de três técnicas. *RGO* 57: 443–8
13. Quirynen M, Dadamio J, Van den Velde S, De Smit M, Dekeyser C, Van Tornout M et al (2009) Characteristics of 2000 patients who visited a halitosis clinic. *J Clin Periodontol* 36(11):970–5
14. Salako NO, Philip L (2011) Comparison of the use of the Halimeter and the Oral Chroma™ in the assessment of the ability of common cultivable oral anaerobic bacteria to produce malodorous volatile sulfur compounds from cysteine and methionine. *Med Princ Pract* 20(1):75–9
15. Tangerman A, Winkel EG (2008) The portable gas chromatograph OralChroma™: a method of choice to detect oral and extra-oral halitosis. *J Breath Res* 2(1)
16. Rosenberg M, Kulkarni G, Bosy A, McCulloch C (1991) Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *J Dent Res* 70(11):1436–40
17. Tanabe S, Grenier D (2012) Characterization of volatile sulfur compound production by *Solobacterium moorei*. *Arch Oral Biol* 57(12): 1639–43, Elsevier Ltd
18. Haraszthy VI, Gerber D, Clark B, Moses P, Parker C, Sreenivasan PK et al (2008) Characterization and prevalence of *Solobacterium moorei* associated with oral halitosis. *J Breath Res* 2(1):017002
19. Kara C, Demir T, Orbak R, Tezel A (2008) Effect of Nd: YAG laser irradiation on the treatment of oral malodour associated with chronic periodontitis. *Int Dent J* 58:151–8
20. Kara C, Tezel A, Orbak R (2006) Effect of oral hygiene instruction and scaling on oral malodour in a population of Turkish children with gingival inflammation. *Int J Paediatr Dent* 16(6):399–404
21. Collins LM, Dawes C (1987) The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* 66(8):1300–2
22. Avcu N, Kanli A (2003) The prevalence of tongue lesions in 5150 Turkish dental outpatients. *Oral Dis* 188–95
23. Lopes R, Godoy C, Deana A, Santi M, Prates R, França C et al (2014) Photodynamic therapy as a novel treatment for halitosis in adolescents: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 15(1):443
24. Pham T, Ueno M, Zaitsu T, Takehara S, Shinada K, Lam P et al (2011) Clinical trial of oral malodor treatment in patients with periodontal diseases. *J Periodontal Res* 46(6):722–9
25. Donaldson AC, Riggio MP, Rolph HJ, Bagg J, Hodge PJ (2007) Clinical examination of subjects with halitosis. *Oral Dis* 13(1):63–70
26. Lui J, Corbet E, Jin L (2011) Combined photodynamic and low level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 46:89–96
27. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 36:575–80
28. Lopes RG, Santi MESO, Franco BE, Deana AM, Prates RA, França CM et al (2014) Photodynamic therapy as novel treatment for halitosis in adolescents: a case series study. *J Laser Med Sci* 5(3):146–52
29. Seemann R, Conceição M, Filippi A, Greenman J, Lenton P, Nachnani S et al (2014) Halitosis management by the general dental practitioner—results of an international consensus workshop. *J Breath Res* 8(1):017101
30. Hamblin MR, Hasan T (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 3(5):436–50
31. Dahl T, Midden W, Hartman P (1989) Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol* 171:2188–94
32. Komerik N, MacRobert AJ (2006) Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25(1-2):487–504
33. Betsy J, Prasanth C, Baiju K, Prasanthila J, Subhash N (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*
34. Kleinberg I, Codipilly D (2002) Cysteine challenge testing: a powerful tool for examining oral malodour processes and treatments in vivo. *Int Dent J* 3:221–8
35. Demir T, Orbak R, Tezel A, Canakç V, Kaya H (2009) The changes in the T-lymphocyte subsets in a population of Turkish children with puberty gingivitis. *Int J Paediatr Dent* 19(3):206–12
36. Motta LJ, Bachiega JC, Guedes CC, Laranja LT, Bussadoril SK (2011) Association between halitosis and mouth breathing in children. *Clinics* 66(6):939–42