



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

Marcela Leticia Leal Gonçalves

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM URUCUM E
LED NA REDUÇÃO DA HALITOSE- ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO

São Paulo, SP
2018



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM URUCUM E
LED NA REDUÇÃO DA HALITOSE– ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora Profa. Dra.: Sandra Kalil Bussadori

São Paulo, SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Marcela Leticia Leal.

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com urucum e LED na redução da halitose – ensaio clínico controlado e randomizado. / Marcela Leticia Leal Gonçalves. 2018.

60 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Dr^a. Prof^a. Sandra Kalil Bussadori.

Sso Paulo, 18 de dezembro de 2018

TERMO DE APROVACAO

Aluno (a): Marcela Leticia Leal Gongalves

Titulo da Tese: "Efeito da terapia fotodinâmica com urucum e LED na redução da halitose — Ensaio clínico controlado"

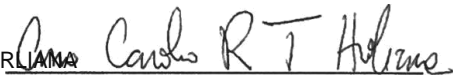
Presidente: PROF[^]. DR[^]. SANDRA KALIL BUSSADOF



Membro: PROF[^]. DR[^]. LARA JANSISKI MOTTA



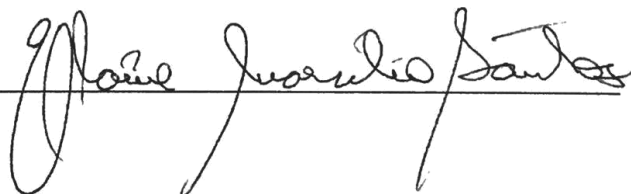
Membro: PROF[^]. DR[^]. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORL



Membro: PROF[^]. DR[^]. MARIA APARECIDA MOREIRA CHADO



Membro: PROF^o. DR[^]. ELAINE MARCILIO SAN



AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Sandra Kalil Bussadori, pela oportunidade de realização do doutorado, pelo apoio e pela orientação nas escolhas que me levaram a apresentação dessa tese e conclusão deste processo.

Agradeço aos membros da banca, Profas. Dras. Lara Jansiski Motta, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Maria Aparecida Moreira Machado e Elaine Marcílio Santos pela presença e por aceitarem nosso convite, possibilitando a realização da defesa.

Agradeço aos meus pais, Maria da Luz Guerra Leal, minha maior apoiadora, e Antonio Carlos Gonçalves, por terem possibilitado a realização deste sonho. Sem eles não teria tido o apoio necessário para o percurso acadêmico realizado.

A todos os pacientes participantes, sem os quais não haveria a pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde pelos ensinamentos que levo comigo e aos meus colegas do programa pela ajuda e companheirismo proporcionados. Um especial agradecimento a minha colega Ana Carolina Costa da Mota, que caminhou comigo desde o princípio, e a nossa aluna de iniciação científica, Lisyane de Souza Araújo Cavalcante pela ajuda indispensável.

Aos meus colegas professores do curso de Odontologia, pelo companheirismo, apoio e muitas caronas.

Por fim, agradeço a Deus, aos meus familiares e a todos que de alguma forma me apoiaram e acreditaram em mim.

RESUMO

A halitose, também conhecida como mau hálito, é um termo utilizado para definir um odor desagradável e fétido que emana da boca, podendo apresentar origem local ou sistêmica. Este projeto teve como objetivo verificar se o tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com urucum e um diodo emissor de luz (LED) é eficaz contra esta. Foram selecionados 44 alunos ou funcionários da UNINOVE com diagnóstico de halitose, apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH_2) \geq 112 ppb. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, que receberam tratamentos distintos: Grupo 1 (n=15): aPDT aplicada na região de dorso e terço médio da língua; Grupo 2 (n=14): tratamento com raspador de língua; Grupo 3 (n=15): tratamento combinado de raspador de língua e aPDT. Para a aPDT foi utilizado o urucum manipulado na concentração 20% (Fórmula e Ação[®]) em spray, aplicado em quantidade suficiente para cobrir o terço médio e dorso da língua por 2 minutos para incubação, associado a um LED azul (Valo Cordless Ultradent[®]). Foram irradiados 6 pontos no dorso da língua com distância de 1 cm entre os pontos, considerando o halo de espalhamento da luz e efetividade da aPDT. O aparelho foi previamente calibrado com comprimento de onda 395-480 nm, durante 20 segundos e energia de 9,6 J por ponto. Foram comparados os resultados da halimetria antes, imediatamente após o tratamento e 7 dias após. Para a análise dos dados oriundos do Oral Chroma[™], foi utilizado o teste de Friedman para a análise intragrupo e o teste de Kruskal Wallis para a análise entregrupos. Em todos os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre o valor de sulfidreto inicial e o valor imediatamente após o tratamento ($p < 0,05$). Nos Grupos 1 e 3, não houve diferença entre o valor inicial e o controle de sete dias. No Grupo 2, esses tempos não foram semelhantes. Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Halitose, Terapia Fotodinâmica, *Bixa orellana*, Ensaio Clínico, LED.

ABSTRACT

Halitosis, also known as bad breath, is a term used to define an unpleasant and foul odor that emanates from the mouth and may have local or systemic origin. This project aimed to verify if the treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with annatto and a light emitting diode (LED) is effective against it. A total of 44 students or UNINOVE employees with a diagnosis of halitosis were selected, presenting sulfite (SH₂) ≥ 112 ppb in gas chromatography. The patients were randomly divided into 3 groups, which received different treatments: Group 1 (n=15): aPDT applied in the region of the back and middle thirds of the tongue; Group 2 (n=14): treatment with tongue scraper; Group 3 (n=15): combined treatment of tongue scraper and aPDT. For aPDT, annatto was used in a concentration of 20% (Fórmula e Ação[®]) applied in sufficient amount to cover the back and middle third of the tongue for 2 minutes for incubation, associated with a LED (Valo Cordless Ultradent[®]). Six points were irradiated on the back of the tongue with a distance of 1 cm between the points, considering the halo of light scattering and effectiveness of aPDT. The apparatus was previously calibrated at wavelength 395-480 nm for 20 seconds and energy of 9.6 J per point. The results of the halimetry were compared before, immediately after treatment and 7 days after. For the analysis of data from the Oral Chroma[™], the Friedman test was used for the intragroup analysis and the Kruskal Wallis test for the intergroup analysis. In all groups, there was a statistically significant difference between the initial sulfhydryde value and the value immediately after the treatment ($p < 0.05$). In Groups 1 and 3, there no was difference between the baseline value and the control of seven days. In Group 2, these times were not similar. There was no statistical difference between treatments.

KEY WORDS: Halitosis, Photodynamic therapy, *Bixa Orellana*, Clinical trial, LED.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1. Halitose	13
1.2. Avaliação da Presença de Halitose.....	13
1.3. Tratamento da halitose	14
1.4. Terapia Fotodinâmica na Halitose	14
1.5. <i>Bixa orellana</i>	16
1.6. Justificativa.....	17
1.7. Hipóteses.....	17
2. OBJETIVO	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivo específico.....	18
3. MÉTODOS	19
3.1. Desenho do estudo.....	19
3.2. Critérios de Inclusão.....	19
3.3. Critérios de Exclusão.....	19
3.4. Cálculo de amostra.....	21
3.5. Intervenções.....	22
3.5.1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT).....	22
3.5.2. Raspagem lingual.....	25
3.6. Medidas de resultado.....	25
3.6.1. Halimetria.....	25
3.7. Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS	28

4.1. Estudo 1 – Protocolo.....	28
4.2. Estudo 2 – Ensaio Clínico Controlado.....	29
4.2.1. Introdução.....	29
4.2.2. Materiais e método.....	30
4.2.3. Resultados.....	33
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39
8. ANEXOS.....	45
8.1. Aprovação do Comitê de Ética.....	45
8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	47
8.3. Ficha de Exame Clínico.....	50
8.4. Artigo 1 publicado.....	51
8.5. Comprovante de submissão do artigo 2.....	58
8.6. Informações para membros externos de bancas.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama explicativo da Terapia Fotodinâmica	16
Figura 2: Fluxograma de atividades.....	20
Figura 3: Ajuste do poder do teste em função do tamanho amostral total	21
Figura 4: Análise do extrato de urucum a 20% em diferentes dissoluções com isopropanol, mostrando seu pico de absorção, próximo aos 460 nm	23
Figura 5: Banda de comprimento de onda do LED (Valo Cordless Ultradent®), mostrando que um dos seus picos (≈ 460 nm) é compatível com o do extrato de urucum [36].....	23
Figura 6: Processo de realização da halimetria [37]	26
Figura 7: Níveis de sulfidreto antes, imediatamente após e sete dias após os tratamentos.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros do LED.....	24
Tabela 2: Estatística descritiva dos dados.....	33
Tabela 3: Análise intragrupo e entregupos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CSVs	Compostos Sulfurados Voláteis
FS	Fotossensibilizador
LED	Diodo Emissor de Luz
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mW	Miliwatts
nm	Nanômetros
PDT	Terapia Fotodinâmica
ppb	Parte por bilhão
SH₂	Sulfidreto
SPIRIT	Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Halitose

A halitose, também conhecida como mau hálito, é um termo utilizado para definir um odor desagradável e fétido que emana da boca, podendo apresentar origem local ou sistêmica. Essa condição pode interferir na vida social e profissional dos pacientes, assim como em sua qualidade de vida [1,2]. O mau hálito pode ter causas intra ou extraorais, como o uso de medicamentos, xerostomia, fumo, condições sistêmicas e higiene oral insuficiente [1,3]. A presença de saburra lingual parece ser a principal causa de halitose, inclusive em pacientes jovens [4]. Produtos bacterianos de bactérias orais anaeróbias são de suma importância. Estas bactérias vivem entre as papilas que compõem a língua. Esses microorganismos produzem gases ricos em enxofre, que ocasionam a presença de um odor desagradável [5].

A prevalência de halitose é muito variável, dependendo da população em questão. Estudos mostram que um terço dos indivíduos são afetados por halitose moderada [6]. O mau hálito afeta aproximadamente de 2,4% a 57,9% de amostras quando avaliadas pelo método organoléptico ou cromatografia gasosa [7].

1.2. Avaliação da Presença de Halitose

A medição de mau cheiro é um aspecto importante para determinar a magnitude do problema em pacientes individuais e como isso os impacta. Um teste muito utilizado para a medição da halitose é o teste organoléptico, no qual um operador previamente treinado e calibrado dá uma classificação para o odor que ele sente exalar da boca do paciente [8]. No entanto, esse teste consiste em um método subjetivo, uma vez que depende do treinamento e capacidade olfatória do avaliador, além de suas condições físicas e emocionais.

A cromatografia gasosa compõe um método mais objetivo para a aferição do hálito. Ao utilizar um detector de enxofre, pode-se especificamente detectar

compostos sulfurados voláteis (CSVs) tais como sulfidreto, metil mercaptana e dimetil sulfeto, os principais componentes de mau odor oral. Porém, um cromatógrafo a gás é um aparelho caro, e não é muito utilizado clinicamente. A maioria das clínicas de respiração fazem uso do Halimeter[®]. No entanto, o Halimeter[®] não pode diferenciar os 3 CSVs. O Oral Chroma[™] (Abilit Corp., Osaka, Japão) foi introduzido no mercado para aferir CSVs. Ao contrário da cromatografia padrão, ele não precisa de um gás de transporte especial, como nitrogênio ou hélio. Ele utiliza o ar ambiente como gás de transporte para a coluna cromatográfica. Ele diferencia e quantifica os 3 CSVs separadamente, produzindo uma avaliação mais abrangente da produção CSVs pela microflora oral do que o Halimeter[®] [7]. Assim, esse aparelho detecta, além da presença de halitose, a sua provável origem, de acordo com os gases mais prevalentes [9].

1.3. Tratamento da halitose

Os tratamentos mais comuns para a halitose incluem o uso de enxaguatórios bucais, tratamento periodontal, instruções de higiene bucal e raspagem lingual [10-13]. Embora o uso de raspadores linguais seja o método convencional mais eficaz para a remoção mecânica da saburra lingual, possa ser feito facilmente pelos próprios pacientes e seja amplamente recomendado, é um procedimento de higiene bucal que é pouco praticado devido ao desconforto ou à falta de consciência [14]. Quando se trata de enxaguatórios bucais, alguns deles parecem ser eficientes na redução temporária da halitose, mas poucos dados a respeito de sua eficiência na redução da saburra estão disponíveis [15-17]. A combinação de mais de um tratamento, como limpeza da língua associada ao tratamento periodontal e enxágue, parece sempre ter melhores resultados [17,18], o que sugere a complexidade do problema. Diante disso, percebe-se que é necessário fazer mais pesquisas nessa área, introduzindo novas técnicas para a redução dessa condição.

1.4. Terapia Fotodinâmica na Halitose

Um tratamento que vêm sendo cada vez mais utilizado na clínica odontológica e médica é a terapia fotodinâmica (PDT). A PDT já foi aplicada com sucesso em lesões da cavidade oral com um nível alto de preservação de

funções como a fala e a deglutição [19]. Esta terapia se baseia no princípio de que uma substância fotossensibilizadora (FS) se liga à células cancerígenas, microrganismos ou de tecidos não desejados e é ativada por uma luz de comprimento de onda adequado. Durante este processo, radicais livres de oxigênio (incluindo o oxigênio singleto) são formados, levando a necrose ou apoptose dessas células [20-22] (Figura 1). Além disso, a terapia fotodinâmica também modula o microambiente tecidual, desencadeando uma reação que lembra o reparo tecidual [22]. A PDT apresenta diversas vantagens, como improvável desenvolvimento de resistência bacteriana, ausência de efeitos colaterais e o fato de ser um procedimento não-invasivo [23].

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) representa uma alternativa para os tratamentos antibacterianos, antifúngicos e antivirais convencionais. Além disso, quando associada aos métodos de tratamento convencionais, a aPDT têm apresentado resultados muito satisfatórios no tratamento de infecções bacterianas na área odontológica [22-24]. Na aPDT, os fotossensibilizadores geralmente utilizados são o azul de metileno e o azul de toluidina, associados à lasers vermelhos [25]. A aPDT também pode já foi utilizada em ensaios clínicos para a redução da halitose e resultados satisfatórios foram obtidos [9, 25-27].

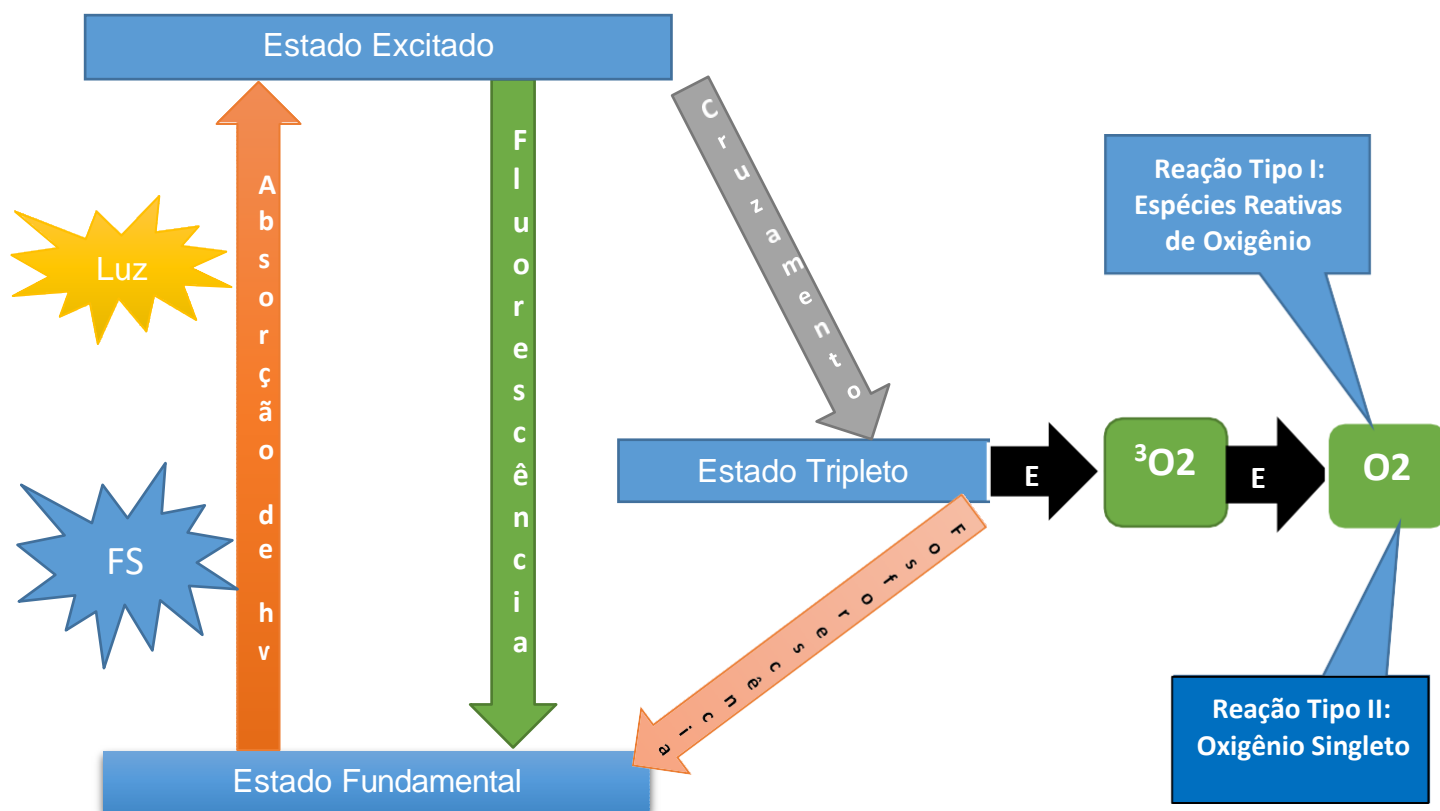


Figura 1: Diagrama Explicativo da Terapia Fotodinâmica (Fonte – Arquivo Pessoal).

1.5. *Bixa orellana* (urucum)

As qualidades que um fotossensibilizador (FS) ideal deve ter são: boa absorção na região visível do espectro de tecidos biológicos, fácil excreção do organismo após tratamento, disponibilidade com uma composição química conhecida e precursores acessíveis, baixa toxicidade ao tecido humano, mas alta fotocitotoxicidade para direcionar às bactérias ou fungos, e um elevado rendimento quântico de oxigênio singlete [28,29].

Bixa orellana, popularmente conhecida como “urucum” é uma planta nativa do Brasil [30]. Suas sementes produzem um corante que é amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, têxtil, de tintas e cosméticos. Esse corante é um dos poucos aprovados pela Organização Mundial de Saúde, devido a sua característica atóxica [30]. Ele apresenta importantes atividades antimicrobianas

[31], e estudos recentes mostraram seu potencial como agente terapêutico e corante natural [30,32]. O uso de corantes avermelhados e amarelados está sendo investigado para a sua utilização na aPDT [33,34]. Devido a suas características positivas, especialmente a falta de atividades mutagênicas e citotóxicas, aliadas aos resultados promissores reportados por estudos laboratoriais sobre seu efeito antimicrobiano, o extrato de *Bixa orellana* pode ser considerado um candidato adequado a FS. Além disso, a maioria dos dentistas já tem diodos emissores de luz (LEDs) azuis em seus consultórios, então a utilização de um corante vermelho com esses LEDs faria com que a aPDT para o tratamento da halitose seja mais acessível.

1.6. Justificativa

Justifica-se a realização do projeto devido à escassez de estudos que avaliem a redução da halitose por meio da terapia fotodinâmica, apresentando o urucum como fotossensibilizador e o LED como fonte de luz. Embora o azul de metileno combinado com o laser vermelho já tenha sido utilizado com essa finalidade, este será o primeiro estudo a avaliar o efeito da aPDT com urucum e LED para diminuição da halitose. O fato de que o urucum é vermelho facilita o trabalho combinado com um diodo emissor de luz (LED) e permite seu uso em uma escala maior. Além disso, o LED é de baixo custo e a maioria dos dentistas já tem o dispositivo em seus consultórios.

1.7. Hipóteses

Hipótese Alternativa (H1): Há redução da halitose por meio dos tratamentos com aPDT com urucum combinado com o LED e/ou raspador lingual.

Hipótese Nula (H0): Não há redução da halitose por meio dos tratamentos com aPDT com urucum combinado com o LED e/ou raspador lingual.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar se o tratamento com aPDT, utilizando o urucum como fotossensibilizador e o LED como fonte de luz, é eficaz na redução da halitose quando avaliada pela cromatografia gasosa, assim como comparar esse método com a utilização do raspador lingual, método convencional mais utilizado, e observar o efeito dos dois tratamentos combinados.

2.2. Objetivos específicos

Estudo 1: estabelecer um protocolo clínico a fim de possibilitar a verificação da redução de halitose com aPDT utilizando o urucum e o LED azul.

Estudo 2: realizar um ensaio clínico controlado e randomizado baseado no estudo 1, de modo a avaliar a efetividade dos tratamentos propostos.

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foram selecionados 44 alunos ou funcionários da UNINOVE com diagnóstico de halitose, apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH_2) ≥ 112 ppb. Os pacientes foram divididos por meio de randomização utilizando envelopes pardos com respectivos números em três grupos, de acordo com o tratamento a ser realizado (Figura 2). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE, sob o número de processo 74228417.2.0000.5511. O registro de ensaio clínico internacional foi realizado na plataforma ClinicalTrials.gov, com o número NCT03346460. O protocolo publicado segue o checklist do SPIRIT [35].

3.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos nesta pesquisa pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 25 anos, com diagnóstico de halitose apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH_2) ≥ 112 ppb.

3.3. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos com anomalias dentofaciais (como lábio leporino, fissuras palatinas e nasopalatinas), em tratamento ortodôntico e/ou ortopédico, que tinham doenças periodontais (como gengivite ou periodontite) ou cáries dentárias, que estivessem em tratamento oncológico, com alterações sistêmicas (gastrointestinais, renais, hepáticas), em tratamento com antibiótico até 1 mês antes da pesquisa, respiradores orais, pacientes com língua geográfica ou fissurada e grávidas.

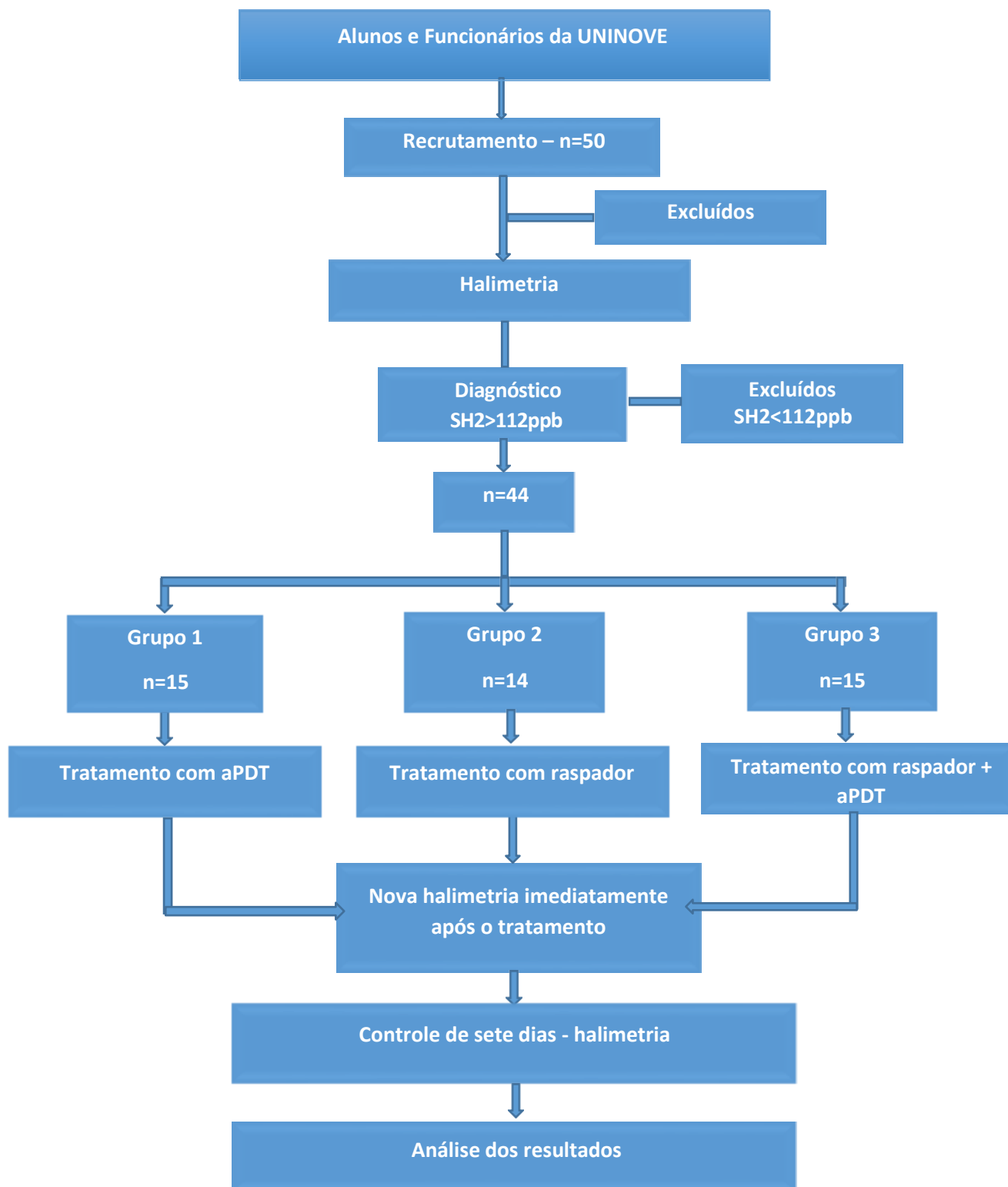


Figura 2: Fluxograma de atividades.

3.4. Cálculo de amostra

Para o cálculo do tamanho amostral foram utilizados os dados do trabalho de Mota *et al.* [26]:

Inicialmente estabeleceu-se um erro $err = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$, onde \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são os valores médios dos grupos baseline a tratamento periodontal com PDT. A partir deste erro, foi calculado o effect size, dado por

$$\frac{err}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

onde σ_1^2 e σ_2^2 são as variâncias dos grupos um e dois, respectivamente.

Assumindo que os grupos estudados possuem distribuição normal ou aproximadamente normal, que o tamanho amostral será suficientemente grande e que será utilizado um teste bicaudal, para um nível de significância $\alpha=0,05$ e mantendo o poder do teste $1-\beta=0,90$, temos um $n=13$ para cada grupo.

Na Figura 3, observa-se que com um tamanho amostral total de 39 sujeitos, ou seja, três grupos com 13 amostras cada, deverá ser demonstrada a diferença estatística mantendo o poder do teste maior ou igual a 0.90. Caso a hipótese de normalidade das distribuições seja rejeitada, o tamanho amostral deverá ser corrigido em aproximadamente 5%.

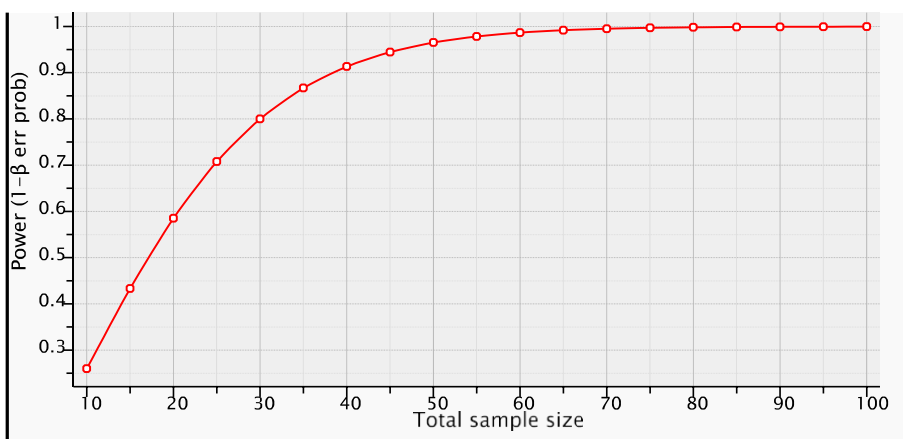


Figura 3: Ajuste do poder do teste em função do tamanho amostral total.

3.5. Intervenções

3.5.1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Foi utilizado o aparelho fotopolimerizador LED – Valo Cordless Ultradent[®], um aparelho de consultório, com radiômetro acoplado. No momento da realização 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 LED era revestida com plástico transparente descartável (evitando contaminações cruzada e por motivo de higiene) e o profissional estava devidamente paramentado.

Foi realizada 1 sessão de aPDT com o fotossensibilizador (FS) urucum manipulado na concentração 20% (Fórmula e Ação[®]) em spray, aplicado em quantidade suficiente para cobrir o terço médio e dorso da língua por 2 minutos para incubação. O extrato de urucum a 20% foi testado em diferentes bases (óleo mineral e sorbitol), com a intenção de suavizar o seu sabor. Porém, o extrato puro a 20% foi o que teve melhor desempenho quando submetido a análise de absorvância no espectrofotômetro (Figura 4), mostrando, inclusive, uma maior absorção em um comprimento de onda próximo a 460 nm, o que é compatível com o comprimento de onda superior efetivo do LED utilizado (Figura 5). O excesso era removido com sugador 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. O aparelho foi previamente calibrado com comprimento de onda 395-480 nm, durante 20 segundos por ponto, energia de 9,6 J, e a luz era irradiada de modo que seja formado um halo de 2 cm de diâmetro por ponto. A Tabela 1 contém todos os parâmetros utilizados.

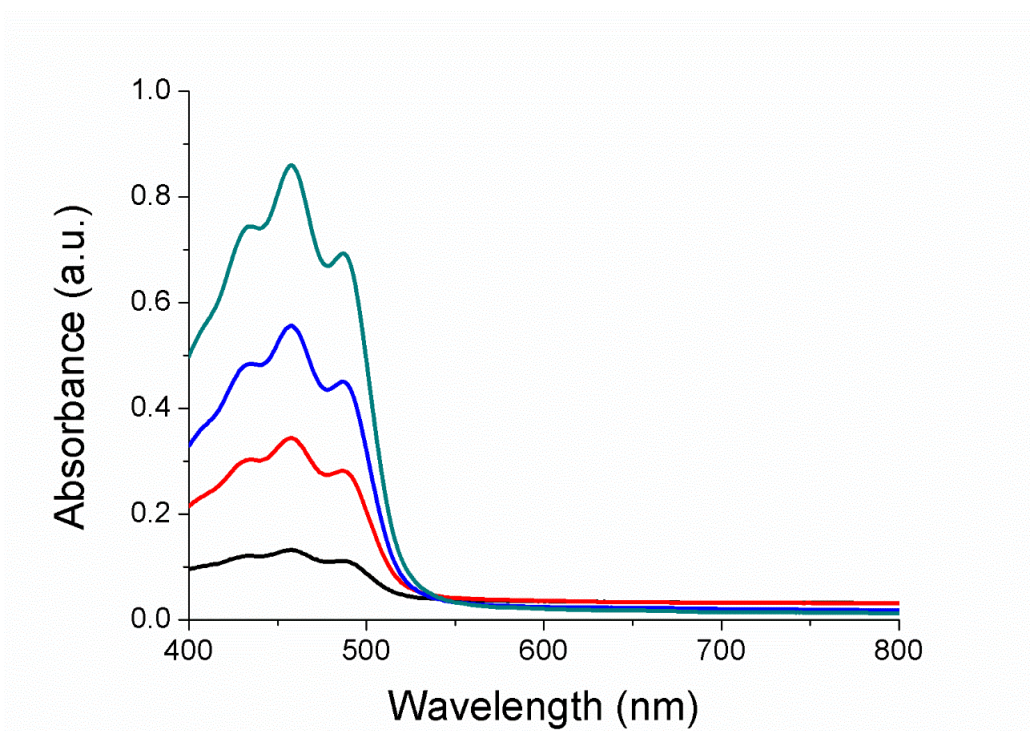


Figura 4: Análise do extrato de urucum a 20% em diferentes dissoluções com isopropanol, mostrando seu pico de absorção, próximo aos 460 nm.

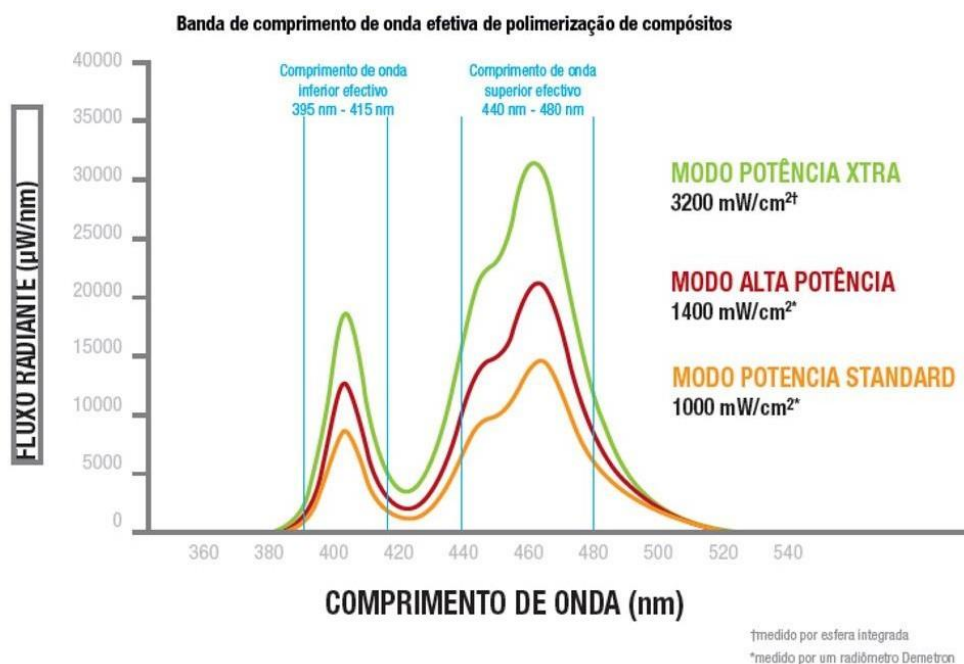


Figura 5: Banda de comprimento de onda do LED (Valo Cordless Ultradent®), mostrando que um dos seus picos (≈ 460 nm) é compatível com o do extrato de urucum [36].

Tabela 1: Parâmetros do LED.

Comprimento de onda (nm)	395-480
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência radiante média (mW)	480
Polarização	aleatória
Diâmetro de abertura (cm)	0.9
Irradiância na abertura (mW/cm²)	762
Perfil do Feixe	Top hat
Area irradiada (cm²)	3.14
Irradiância no alvo (mW/cm²)	153
Tempo de exposição (s)	20
Fluência (J/cm²)	6.37
Energia radiante (J)	9.6
Número de pontos irradiados	6
Área total irradiada (cm²)	18.8
Número de sessões	1
Energia radiante total (J)	57.6

3.5.2. Raspagem Lingual

A raspagem lingual foi realizada por um mesmo operador em todos os pacientes. Eram realizados movimentos póstero-anteriores com o raspador sobre o dorso lingual, seguidos da limpeza do raspador com uma gaze. Esse procedimento era realizado dez vezes em cada paciente, com o objetivo de padronizar a remoção mecânica da saburra lingual.

3.6. Medidas de resultado

3.6.1. Halimetria

A coleta do ar bucal seguiu as orientações do fabricante (Oral Chroma™ Manual Instruction), onde o participante era orientado a fazer um bochecho com cisteína (10 mM) por 1 minuto, e em seguida permanecer com a boca fechada por mais 1 minuto. Era introduzida na boca do paciente uma seringa do mesmo fabricante, própria para coleta do ar bucal. Durante 30 segundos, o paciente permanecia de boca fechada, respirando pelo nariz, sem tocar na seringa com a língua. O êmbolo era puxado para fora, voltávamos a esvaziar o ar da seringa na boca do paciente e novamente puxávamos o êmbolo para encher a seringa com a amostra do hálito. Limpávamos a ponta da seringa com gaze para remover a umidade da saliva, colocávamos a agulha de injeção de gás na seringa, e ajustávamos o êmbolo para 0,5 ml. Injetavam-se os gases coletados na porta de entrada do aparelho com um movimento único (Figura 6).

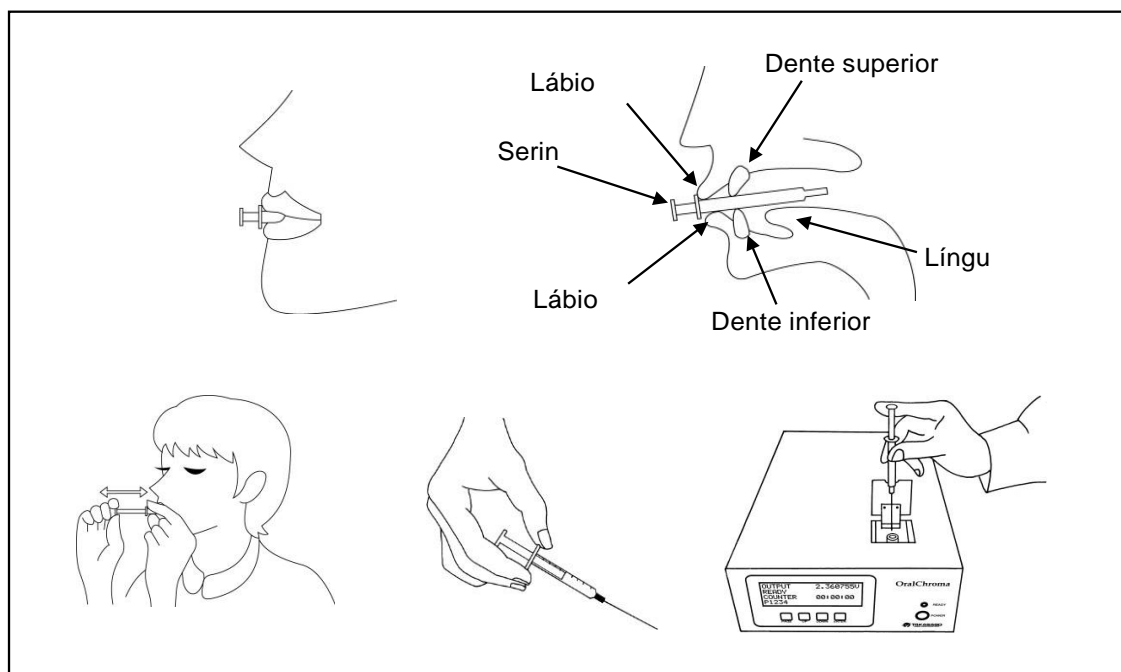


Figura 6: Processo de realização da halimetria [37].

Da análise dos CSVs capturados pelo sistema, temos:

- Sulfidreto: origem principalmente das bactérias presentes no dorso da língua. Valores acima de 112 ppb são indicadores de halitose.
- Metilmercaptana: 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). Também pode ser causado, temporariamente, pela ingestão de certos alimentos e bebidas. 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 com e sem o desafio da cisteína (cisteína 10 mM, ou seja 16 mg de cisteína em 100 ml de água destilada – 16 mg%). O limiar de percepção do dimetilsulfeto é o mais baixo, 8 ppb. Outros odores (não CSVs) podem aparecer num pico anterior ao teoricamente primeiro pico, que é o do sulfidreto.

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, podiam 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) e a escovação deveria ser feita apenas com água. Todas as avaliações eram realizadas no período da tarde, aproximadamente no mesmo horário.

3.7. Análise Estatística

Os dados oriundos do Oral Chroma™ foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que a hipótese de normalidade foi rejeitada, foi utilizado o teste de Friedman para a análise intragrupo e o teste de Kruskal Wallis para a análise entregrupos.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo 1 – Protocolo

O estudo 1 trata-se de um protocolo clínico publicado, conforme a referência abaixo:

Gonçalves MLL, Mota ACC, Deana AM, Guedes GH, Cavalcante LAS, Prates RA, Horliana ACRT, Pavani C, Motta LJ, Bitencourt GB, Fernandes KPS, Salgueiro MCC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DFT, França CM, Bussadori SK. Photodynamic therapy with Bixa orellana extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial. *Trials*. 2018;19:590. doi: [10.1186/s13063-018-2913-z](https://doi.org/10.1186/s13063-018-2913-z).

Link: [https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-018-2913-](https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-018-2913-z)

Z

4.2. Estudo 2 – Ensaio Clínico Controlado

4.2.1. Introdução

A halitose é um importante problema de saúde multifatorial que afeta a vida psicológica, social e a qualidade de vida dos pacientes. É o motivo mais comum para o encaminhamento para dentistas após a cárie dentária e doenças periodontais [39,40]. A prevalência estimada de halitose em adolescentes e adultos parece estar próxima a 31,8% [41]. As condições na cavidade bucal são responsáveis por 80% a 90% dos casos de halitose e acredita-se que as bactérias do dorso da língua sejam a principal causa de mau odor [42]. Compostos sulfurados voláteis (CSVs) são gases causadores de halitose produzidos por bactérias. Esses gases são o sulfidreto, a metilmercaptana e sulfeto de dimetila [39], e o sulfidreto é produzido principalmente na saburra lingual. Para diagnosticar a halitose, a avaliação organoléptica, baseada no cheiro do ar exalado pela boca e nariz e comparando os dois, é amplamente utilizada. No entanto, este método depende do avaliador, portanto, os resultados são subjetivos e podem ser controversos. Portanto, a medição de CSVs com dispositivos (cromatografia gasosa) está sendo cada vez mais estudada. O OralChroma™ tem se mostrado altamente acurado e discrimina entre os três principais CSVs associados à halitose, contribuindo não só para o diagnóstico, mas também para melhor subclassificação da halitose, segundo sua origem [43]. Escovação dental, limpeza da língua e métodos químicos, como enxaguatórios bucais, estão disponíveis para controlar o mau cheiro. No entanto, há discordância na literatura quanto ao tratamento dessa condição [44].

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) baseia-se na combinação de um fotossensibilizador não tóxico (FS) e um comprimento de onda apropriado de luz visível, que na presença de oxigênio ambiente é ativado e pode promover uma resposta fototóxica, causando a morte de microorganismos [23]. Ela parece ser uma ferramenta eficaz no tratamento de infecções no campo da odontologia. Embora não possa substituir a terapia antimicrobiana em seu estágio atual, ela pode ser usada como terapia adjuvante para facilitar o tratamento de infecções orais [45]. Em estudos anteriores, a aPDT foi utilizada para a redução da halitose, com azul de metileno como FS e laser vermelho como fonte de luz, e resultados

satisfatórios foram obtidos [9-26,27].

Bixa orellana é uma planta nativa da América do Sul e Central. As sementes desta planta produzem um dos corantes mais utilizados mundialmente, chamado urucum. Este é utilizado, não apenas em produtos alimentícios, mas também nas indústrias têxtil, de tintas e cosméticos [30]. Após o açafrão, o urucum é o segundo corante economicamente mais importante e apresenta grande importância medicinal e industrial [46]. Suas folhas têm sido relatadas como possuintes de atividades antimicrobiana, antifúngica, anticonvulsivante, analgésica e antiinflamatória [47]. As folhas e sementes de *B. orellana* mostraram atividade importante contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [48]. Como é um corante natural não tóxico, o urucum pode ser considerado um potencial fotossensibilizador. Além disso, o fato de ser vermelho, permite seu uso com um diodo emissor de luz (LED) azul, e este tipo de dispositivo é mais acessível aos dentistas, visto que a maioria já o possui em seus consultórios. Conseqüentemente, o uso de urucum associado a LEDs azuis possibilitaria o tratamento da halitose com aPDT em maior escala.

O objetivo deste estudo foi verificar a redução da halitose avaliada com o Oralchroma™ ao utilizar a aPDT com urucum e LED azul, bem como comparar essa terapia com o método convencional mais utilizado, raspagem lingual, e verificar a associação de ambos os tratamentos.

4.2.2. Materiais e método

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho sob o número de processo 74228417.2.0000.5511. Os indivíduos que concordaram em participar assinaram voluntariamente um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme estipulado na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo para este estudo foi registrado na plataforma ClinicalTrials.gov, sob o número NCT03346460 e também se baseia no protocolo clínico publicado na revista *Trials* [49]. Como se trata de um ensaio clínico randomizado, este artigo está de acordo com o checklist do CONSORT [50].

Alunos e funcionários da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) foram recrutados. Nossos critérios incluíram pacientes de ambos os sexos, de 18 a 25

anos de idade, que apresentavam sulfidreto (SH_2) ≥ 112 ppb, medido pelo Oral Chroma™ (Figura 2). Indivíduos com anomalias dentofaciais (como lábio leporino ou fenda palatina); que estavam em tratamento ortodôntico e/ou ortopédico; que tinham doenças periodontais (como gengivite ou periodontite) ou cáries dentárias; que estavam em tratamento oncológico; com alterações sistêmicas (gastrointestinais, renais, hepáticas); que haviam sido submetidos a antibioticoterapia até 1 mês antes da pesquisa; que estavam grávidas e fumantes foram excluídos do estudo. O estudo foi realizado na clínica odontológica da *Universidade Nove de Julho* (UNINOVE).

O cálculo amostral baseado no estudo de Mota *et al.* [26] foi realizado, e um mínimo de 13 pacientes por grupo foi estabelecido. Os pacientes foram randomizados em três grupos, de acordo com o tratamento a ser realizado (Figura 2). O Grupo 1 recebeu aPDT com urucum e LED azul; no Grupo 2, os pacientes foram tratados com raspagem lingual; no Grupo 3, tanto a raspagem lingual como a aPDT foram realizadas. Os pacientes foram randomizados com o uso de envelopes opacos com folhas contendo o número do grupo experimental correspondente.

Em todos os grupos, foi realizada a coleta de ar por via oral, seguindo as orientações do fabricante Oral Chroma™. Sendo um dispositivo, o OralChroma™ era um assessor cego. Os pacientes foram solicitados a bochechar com uma solução de cisteína (10 mM) por 1 minuto, e posteriormente, permanecer com a boca fechada por 1 minuto. Uma seringa do mesmo fabricante para coleta de ar foi introduzida na boca do paciente. Em seguida, o paciente permaneceu com a boca fechada por 30 segundos, respirando pelo nariz, sem tocar na ponta da seringa com a língua. O êmbolo foi puxado para fora, esvaziado na boca do paciente e puxado novamente para encher a seringa com a amostra de ar. O êmbolo foi ajustado para 0,5 ml e os gases coletados foram injetados na porta de entrada da unidade em um único movimento. Este procedimento foi realizado em todos os grupos antes, imediatamente após o tratamento, e após sete dias para comparação dos níveis de sulfidreto. Para minimizar as alterações neste processo, os participantes foram instruídos a seguir estas instruções: 1) 48 horas antes da avaliação: evitar a ingestão de alimentos com alho, cebola e temperos fortes, consumo de álcool e uso de

bocas. 2) No dia da avaliação: não comer 2 horas antes do exame; abster-se de café, doces, goma de mascar, produtos de higiene bucal e escovar os dentes apenas com água. Para tornar as avaliações mais semelhantes, todos os pacientes foram todos agendados à tarde, aproximadamente no mesmo horário, seguindo as mesmas instruções.

O Grupo 1 foi tratado com aPDT. O dispositivo de fotopolimerização LED Valo Cordless Ultradent® foi utilizado. Tanto o voluntário quanto o profissional estavam utilizando óculos específicos para proteção ocular e a ponta do LED foi revestida com plástico descartável (PVC) transparente, evitando a contaminação cruzada. Uma sessão de aPDT com urucum em spray foi realizada. O extrato de *Bixa orellana* foi manipulado na concentração de 20% (Fórmula e Ação®) e aplicado em quantidade suficiente para cobrir o terço médio e posterior da língua. Após 2 minutos de tempo de pré-irradiação, seis pontos no dorso da língua com uma distância de 1 cm entre eles foram irradiados. O aparelho foi pré-calibrado com o comprimento de onda de 395-480 nm por 20 segundos e 9,6 J de energia por ponto, que é semelhante à energia usada em outros protocolos de aPDT na língua que tiveram resultados satisfatórios [7,26,27]. A Tabela 1 mostra todos os parâmetros do LED.

No Grupo 2, a raspagem da língua foi feita pelo mesmo operador em todos os pacientes. Movimentos póstero-anteriores foram realizados com um raspador de plástico (Halicare®) sobre o dorso lingual, e o raspador era limpo com gaze. Esse procedimento foi realizado dez vezes em cada paciente, a fim de padronizar a remoção mecânica da saburra.

No Grupo 3, os pacientes receberam a raspagem de lingual, conforme descrito no Grupo 2, seguido da aPDT com extrato de *Bixa orellana* e LED azul, descrito no Grupo 1.

Análise Estatística

Os dados do Oral Chroma™ foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez rejeitada a hipótese de normalidade, utilizou-se o teste de Friedman para a análise intragrupo e o teste de Kruskal Wallis para a análise intergrupos.

4.2.3. Resultados

Na Tabela 2, podemos observar a descrição da população estudada.

Tabela 2: Estatística descritiva dos dados.

	Gênero	Idade Média (anos)	Mediana de sulfidreto inicial	Mediana de sulfidreto imediatamente após	Mediana de sulfidreto após 7 dias
Grupo 1 – aPDT (n=15)	M= 33,3% F = 66,7%	21	821 ppb	45 ppb	624 ppb
Grupo 2 – Raspador (n=14)	M = 20% F = 80%	22	920 ppb	88 ppb	402 ppb
Grupo 3 – aPDT com raspador (n=15)	M = 60% F = 40%	21	343 ppb	25 ppb	323 ppb

Em todos os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre o valor de sulfidreto inicial e o valor imediatamente após o tratamento ($p < 0,05$), indicando que os tratamentos foram eficazes na redução imediata da halitose. Nos Grupos 1 e 3, não houve diferença entre o valor inicial e o controle de sete dias, indicando que a halitose retornou aos níveis iniciais após sete dias. No Grupo 2, esses tempos não foram semelhantes. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3: Análise intragrupo e entregupos.

Intragrupo								
Friedman	p<0.0001		Friedman	p<0.0001		Friedman	p0.0007	
	Before	After		Before	After		Before	After
After	p<0.05		After	p<0.05		After	p<0.05	
7 days	ns	p<0.05	7 days	ns	ns	7 days	ns	p<0.05
Entregupos								
Kruskal Wallis	0,0591		Kruskal Wallis	0,1343		Kruskal Wallis	0,0743	

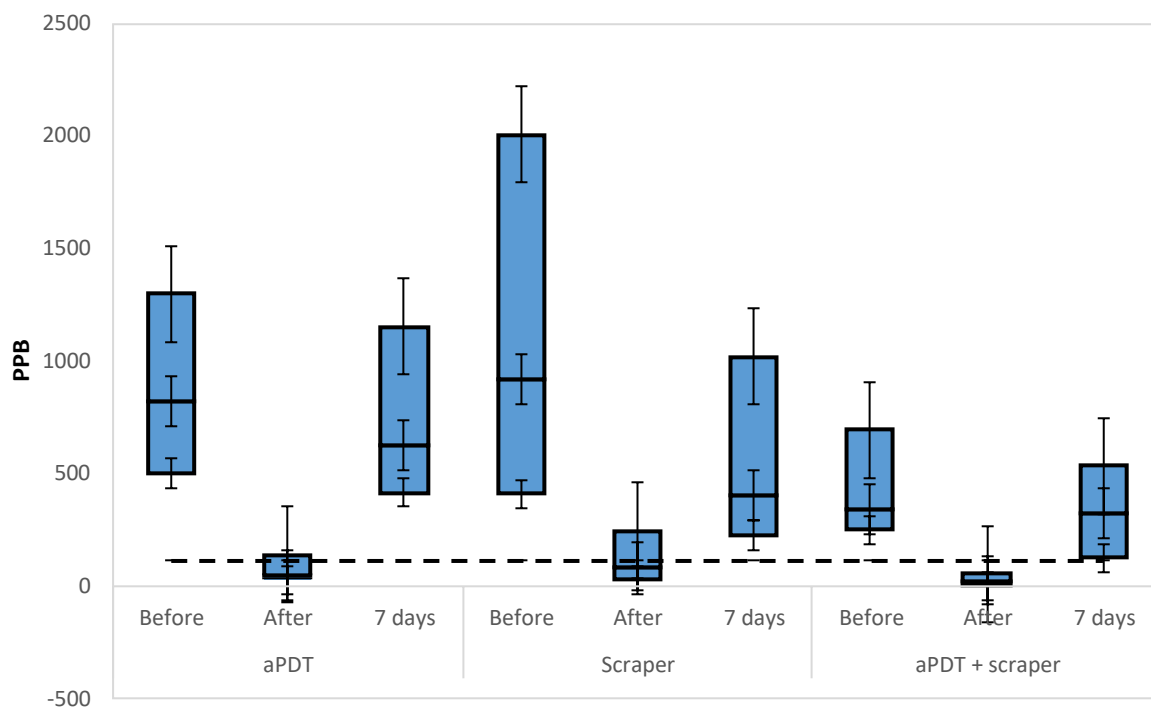


Figura 7: Níveis de sulfidreto antes, imediatamente após e sete dias após os tratamentos.

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro ensaio clínico a investigar os efeitos da aPDT com urucum e LED azul na redução da halitose. Apresenta um protocolo inovador e simples que poderia ser utilizado em larga escala na odontologia, devido ao fato de que a maioria dos dentistas já possui LEDs azuis em seus consultórios. Nossos resultados mostram que essa terapia parece ser efetiva na redução imediata da halitose, mas após 7 dias, esse efeito não permaneceu. O período de 7 dias para controle foi estabelecido a fim de verificar a recolonização das bactérias [49], mas esta geralmente ocorre muito rapidamente na língua e, conseqüentemente, não obtivemos resultados positivos. Além disso, ao pensar na prática odontológica, o intervalo de 7 dias também representa um período em que os pacientes podem voltar ao consultório, retomar a halimetria e repetir a aPDT, se necessário. Os dentistas seriam capazes de controlar a presença de halitose e tratar pacientes uma vez por semana em casos persistentes. Por outro lado, os resultados imediatos após os diferentes tratamentos são os mais importantes, pois demonstram a sua eficácia. É necessário realizar novos ensaios com diferentes tempos de controle, a fim de verificar a durabilidade da redução da halitose nessa técnica.

No grupo no qual foi utilizado o raspador lingual (Grupo 2), embora tenha havido um aumento de halitose quando comparado aos resultados imediatos, os níveis de sulfidreto não retornaram ao valor inicial, ao contrário dos outros grupos. Isso pode ter acontecido porque, com o uso do raspador de língua durante a sessão, os pacientes poderiam se tornar mais conscientes de como a limpeza da língua deveria acontecer e tentar repeti-la em casa. Um resultado semelhante deveria ser esperado, então, no Grupo 3 (raspagem e aPDT). No entanto, esse resultado provavelmente não foi alcançado porque o valor basal de SH₂ nesse grupo já era menor quando comparado com os outros grupos (Tabela 3 e Figura 7), e conseqüentemente os valores voltaram mais facilmente ao inicial.

O tratamento da halitose é um tema controverso na literatura e que ainda precisa de atenção, pois muitas vezes essa condição resulta no isolamento social do paciente e pode, eventualmente, causar depressão [51]. A combinação de tratamentos, como limpeza da língua, tratamento periodontal e enxaguatórios,

parece sempre apresentar melhores resultados [17,18]. A raspagem da língua pode ser feita facilmente pelos próprios pacientes e é amplamente recomendada, mas é pouco praticada devido ao desconforto, pois pode causar náusea, ou pela falta de consciência da necessidade de raspar o dorso lingual [14]. Além disso, estudos mostraram que a autolimpeza da língua por si só não é completamente eficiente para a redução da halitose e deve estar associada a tratamentos no consultório, como os periodontais [13,52]. Quando se trata do uso de enxaguatórios bucais, há evidências limitadas de que eles podem ser eficazes na redução da halitose e estudos não mostram um efeito benéfico para a redução da saburra lingual [15]. Ademais, o uso de agentes antimicrobianos está associado a alguns efeitos colaterais, como sabor desagradável, manchamento e danos à microflora oral normal [53]. A complexidade desta condição e seu controle está sendo cada vez mais pesquisada e novos métodos, como o uso de probióticos [54] e agentes naturais [55], semelhantes à *Bixa orellana*, estão sendo introduzidos nos estudos.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) está sendo usada em várias áreas, como cáries, tratamentos periodontais e endodônticos e feridas orais [23]. Ao contrário dos métodos antimicrobianos convencionais, a aPDT tem as vantagens de ser um procedimento não invasivo, não resulta em efeitos colaterais indesejáveis, e o desenvolvimento de resistência por bactérias é improvável [23]. Além disso, pode-se especular que os pacientes também tendem a valorizar formas novas e tecnológicas de tratamento, o que poderia aumentar a satisfação com essa terapia. A aPDT para a redução da halitose foi aplicada em outros estudos e bons resultados foram obtidos [9,26,27]. Nestes artigos, o azul de metileno, como um fotossensibilizador, e lasers vermelhos foram usados. Por outro lado, essas investigações usando aPDT para o tratamento da halitose mostram seus efeitos apenas imediatamente após o tratamento.

A *Bixa orellana* é um FS natural, inovador e avermelhado, o que permite seu uso com LEDs azuis, podendo tornar este protocolo de tratamento mais acessível, já que a maioria dos dentistas já possui essa fonte de luz em seus consultórios para a fotopolimerização das resinas compostas. Novos aparelhos devem ser testados para testar sua efetividade com essa técnica. Embora alguns estudos com curcumina e LEDs azuis para a desinfecção oral já tenham sido

realizados [56,57], este é o primeiro estudo a utilizar o extrato de *Bixa orellana* na redução da halitose. Em um estudo recente, o efeito da luz azul na presença de corantes vermelhos na produção de maus odores em um biofilme oral experimental foi testado [58] e concluiu-se que eles podem ser eficazes contra bactérias produtoras de CSVs. Portanto, a aPDT para o tratamento da halitose poderia ser mais facilmente introduzida na prática odontológica.

Também é importante ressaltar que, enquanto a halitose é uma questão importante para os jovens, a maioria dos estudos sobre esse assunto é realizada em pacientes adultos/idosos. Além disso, a saburra lingual parece ser a principal causa de halitose nessa população [4]. É crucial estudar a faixa etária em questão neste protocolo e possíveis tratamentos para reduzir a presença de saburra lingual em adultos jovens.

O diagnóstico de halitose também pode ser questionável. O mau odor oral pode ser medido por meio de medidas organolépticas, nas quais um operador treinado avalia a respiração ou a cromatografia gasosa [59]. Como depende do avaliador, o método organoléptico pode ser muito subjetivo. O padrão ouro para medir objetivamente a respiração é quantificar os compostos sulfurados voláteis (CSVs) produzidos pela flora oral usando o dispositivo Oral Chroma™ [60]. Além disso, devido à sua capacidade de distinguir entre os CSVs, o OralChroma™ se apresenta como o mais adequado para determinar a halitose na pesquisa científica [8] e, por isso, escolhemos este método em nosso estudo.

Como limitações do estudo, podemos citar a falta de análise microbiológica e o fato de que alguns pacientes sentiram desconforto durante a raspagem da língua e aPTD. Além disso, houve alguma dificuldade em convencer os pacientes a retornarem para o controle de 7 dias, porém não houve perda de pacientes.

6. CONCLUSÃO

A aPTD com urucum e LED azul parece ser efetiva na redução imediata da halitose, mas esse efeito não permaneceu no controle de sete dias. Não houve diferença entre o raspador lingual e a aPDT. Mais estudos são necessários para verificar diferentes tempos de controle e análises em nível microbiológico.

7. REFERÊNCIAS

- 1- Mubayrik AB, Hamdan RA, Hadlaq EMA, AlBagieh H, AlAhmed D, Jaddoh H, Demyati M, Shryei RA. Self-perception, knowledge, and awareness of halitosis among female university students. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2017;9:45-52.
- 2- Schumacher MG, Zurcher A, Filippi A. Evaluation of a halitosis clinic over a period of eleven years. *Swiss Dent J*. 2017;127:846-851.
- 3- Torsten M, Gómez-Moreno G, Aguilar-Salvatierra A. Drug-related oral malodour (halitosis): a literature review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:4930-4934.
- 4- Bigler T, Filippi A. Importance of halitosis. *Swiss Dent J*. 2016;126:347-353.
- 5- Tanwir F, Momin IA. Halitosis. *Pakistan Oral & Dental Journal* 2011;31(2):304-308.
- 6- Milanesi FC, Kauer B, Wagner TP, Daudt LD, Haas AN. Self-reported halitosis and associated demographic and behavioral factors. *Braz. Oral Res*. 2016;30(1):e71.
- 7- Aimetti M, Perotto S, Castiglione A, Ercoli E, Romano F. Prevalence estimation of halitosis and its association with oral health-related parameters in an adult population of a city in North Italy. *J Clin Periodontol*. 2015. doi: 10.1111/jcpe.12474.
- 8- Laleman I, Dadamio J, De Geest S, Dekeyser C, Quirynen M. Instrumental assessment of halitosis for the general dental practitioner. *J Breath Res*. 2014;8(1):017103.
- 9- Gonçalves MLL, Bussadori SK, Fragoso YD, Silva VVBD, Deana AM, Ciarcia AC, Pinto EH, Horliana ACRT, França CM. Effect of photodynamic therapy in the reduction of halitosis in patients with multiple sclerosis - clinical trial. *J Breath Res*. 2017. doi: 10.1088/1752-7163/aa8209.
- 10- 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*. 2015;42(Suppl.16):S303–S316. doi: 10.1111/jcpe.12378.

- 11- Seemann R, Conceicao MD, Filippi A, Greenman J, Lenton P, Nachnani S, *et al.* Halitosis management by the general dental practitioner—results of an international consensus workshop. *J Breath Res.* 2014;8:017101.
- 12- Patil S, Acharya S, Hathiwala S, Singhal DK, Srinivasan SR, Khatri S. Evaluation of the Efficacy of G32 (Commercially Available Ayurvedic Preparation) in Reducing Halitosis – A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(9):ZC79-ZC83.
- 13- Wang J, He J. Effect of mechanical self-cleaning of tongue coating on malodour in halitosis patients originating from tongue coating. *Journal of Peking University (Health Sciences).* 2017;49(2).
- 14- Bordas A, McNab R, Staples AM, Bowman J, Kanapka J, Bosma MP. Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. *Archives of oral biology* 53, Suppl. 1 (2008) S13–S18.
- 15- Blom T, Slot DE, Quirynen M, Van der Weijden GA. The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. *Int J Dent Hygiene.* 2012. DOI: 10.1111/j.1601-5037.2012.00546.x
- 16- Yadav SR, Kini VV, Padhye A. Inhibition of Tongue Coat and Dental Plaque Formation by Stabilized Chlorine Dioxide Vs Chlorhexidine Mouthrinse: A Randomized, Triple Blinded Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2015 Sep, Vol-9(9): ZC69-ZC74
- 17- Feller L, Bignaut E. Halitosis: a review. *SADJ.* 2005; 60(1): 17-9.
- 18- Quirynen M, Zhao H, Soers C, Dekeyser C, Pauwels M, Coucke W, Steenberghe D. The Impact of Periodontal Therapy and the Adjunctive Effect of Antiseptics on Breath Odor-Related Outcome Variables: A Double-Blind Randomized Study. *J Periodontol.* 2005; 76(5): 705-712.
- 19- Mohan N, Jalaluddin MD, Kotina S, Routray S, Ingale Y. Photodynamic Therapy: The Imminent Millieu For Treating Oral Lesions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013;7(6):1254-1257.
- 20- Malik R, Manocha A, Suresh D K. Photodynamic therapy - A strategic review. *Indian J Dent Res.* 2010;21:285-91.
- 21- Garg AD, Nowis D, Golab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis* 2010;15:1050–1071.

- 22- Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15:323-7.
- 23- Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, Hamblin MR, Rastelli ANS. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* 2016 December; 26(12). doi:10.1088/1054-660X/26/12/123001.
- 24- Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2015;30(6):1647-56. doi: 10.1007/s10103-014-1632-2.
- 25- Lopes et al.: Photodynamic therapy as a novel treatment for halitosis in adolescents: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2014;15:443.
- 26- Costa da Mota AC, França CM, Prates R, Deana AM, Costa Santos L, Lopes Garcia R, Leal Gonçalves ML, Mesquita Ferrari RA, Porta Santos Fernandes K, Kalil Bussadori S. Effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents - a controlled, microbiological, clinical trial. *J Biophotonics.* 2016 Dec;9(11-12):1337-1343.
- 27- Lopes RG, da Mota AC, Soares C, Tarzia O, Deana AM, Prates R A, 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.* 2015:1–7.
- 28- Serpe L, Ellena S, Barbero N, Foglietta F, Prandini F, Gallo MP, et al. Squaraines bearing halogenated moieties as anticancer photosensitizers: synthesis, characterization and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry* 2016.
- 29- Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013;6:817-40.
- 30- Vilar DA, Vilar MSA, Moura TFAL, Raffin FN, Oliveira MR, Franco CFO, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. *Scientific World Journal.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857292>.

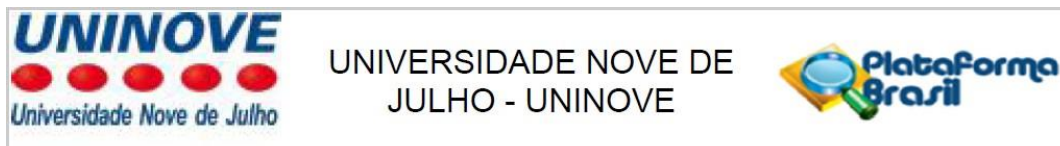
- 31- Cuong TV, Chin KB. Effects of Annatto (*Bixa orellana* L.) Seeds Powder on Physicochemical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Pork Patties during Refrigerated Storage. *Korean J. Food Sci. An.* 2016;36(4);476-486.
- 32- Shahid-ul-Islam, Rather LJ, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. *Journal of Advanced Research* (2016) 7, 499–514. *J. Adv. Res.* 2016;7:499-514.
- 33- Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Kharazi Fard MJ, Bahador A. . An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Lasers Med Sci.* 2016;7(1):21-25. doi:10.15171/jlms.2016.05.
- 34- Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanita PV, Pavarina AC, et al. (2017) Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS ONE* 12(11): e0187418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187418>.
- 35- Available from <http://www.spirit-statement.org/>.
- 36- Manual de Instruções, Valo Cordless, Ultradent Products, Inc.
- 37- Manual de Instruções, Oral Chroma™.
- 38- PINTO EH, LONGO PL, CAMARGO CCBDE, ET AL. Assessment of the quantity of microorganisms associated with bronchiectasis in saliva, sputum and nasal lavage after periodontal treatment: a study protocol of a randomized controlled trial. *BMJ Open* 2016;6:e010564. doi:10.1136/bmjopen-2015- 010564.
- 39- Bicak DA. A Current Approach to Halitosis and Oral Malodor- A Mini Review. *Open Dent J* 12, 322-330. DOI: 10.2174/1874210601812010322.
- 40- Colussi PRG, Hugo FN, Muniz FWMG, Rosing CK (2017) Oral Health-Related Quality of Life and Associated Factors in Brazilian Adolescents. *Braz Dent J* 2018;28(1): 113-120.
- 41- Silva MF, Leite FRM, Ferreira LB, Pola NM, Scannapieco FA, Demarco FF, Nascimento GG. Estimated prevalence of halitosis: a systematic review and meta-regression analysis. *Clin Oral Invest* 2017;22(1):47-55. DOI 10.1007/s00784-017-2164-5.

- 42- Seerangaiyan K, van Winkelhoff AJ, Harmsen HJM, Rossen JWA, Winkel EG. The tongue microbiome in healthy subjects and patients with intraoral halitosis. *J Breath Res.* 2017. DOI: 10.1088/1752-7163/aa7c24.
- 43- Nakhleh MK, Quatredeniens M, Haick H. Detection of Halitosis in Breath: Between the Past, Present and Future. *Oral Dis* 2018;24(5):685-695. DOI 10.1111/odi.12699.
- 44- Khurana C, Tandon S, Chinmaya BR. A crossover clinical trial to assess the effectiveness of different oral hygiene regimens on the reduction of morning bad breath in healthy young adults. *Indian J Dent Res* 2018;29:434-439.
- 45- Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest* 2103;17(4):1113-25. DOI 10.1007/s00784-012-0845-7.
- 46- Pacheco TG, Lopes AS, Viana GDM, Silva ON, Silva GM, Vieira LN, Guerra MP, Nodari RO, Souza EM, Pedrosa FO, Otoni WC, Rogalski M. Genetic, evolutionary and phylogenetic aspects of the plastome of annatto (*Bixa orellana* L.), the Amazonian commercial species of natural dyes. *Planta.* 2018. DOI: 10.1007/s00425-018-3023-6
- 47- Yong et al. Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013;13:32. DOI: 10.1186/1472-6882-13-32.
- 48- T.C. Fleischer, Ameade EP, Mensah ML, Sawyer IK. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa Orellana*. *Fitoterapia* 2013;74(1-2):136-8.
- 49- Gonçalves MLL, Mota ACC, Deana AM, Guedes GH, Cavalcante LAS, Prates RA, Horliana ACRT, Pavani C, Motta LJ, Bitencourt GB, Fernandes KPS, Salgueiro MCC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DFT, França CM, Bussadori SK. Photodynamic therapy with *Bixa orellana* extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial. *Trials* 2018;19:590. DOI: 10.1186/s13063-018-2913-z.
- 50- Available from <http://www.consort-statement.org/>.
- 51- Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Hirofuji T. Relationship between halitosis and psychologic status. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(4):542-7

- 52- Oyetola OE, Owotade FJ, Fatusi OA, Olatunji S. Pattern of presentation and outcome of routine dental interventions in patients with halitosis. *Niger Postgrad Med J* 2016;23:215-20.
- 53- Roldán S, Herrera D, Sanz M. Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. *Clin Oral Investig*. 2003 Dec;7(4):189-97.
- 54- Georgiou AC, Laine ML, Deng DM, Brandt BW, van Loveren C, Dereka X. *J Breath Res* 2018;12(4):046010. DOI: 10.1088/1752-7163/aacf49.
- 55- Akkaoui S, Ennibi OK. Use of traditional plants in management of halitosis in a Moroccan population. *J Intercult Ethnopharmacol* 2017;6(3):267-273.
- 56- Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg*. 2014 Nov;32(11):627-32. doi: 10.1089/pho.2014.3805.
- 57- Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg*. 2012 Feb;30(2):96-101. doi: 10.1089/pho.2011.3053.
- 58- Jeffet U, Nasrallah R, Sterer N. Effect of red dyes on blue light phototoxicity against VSC producing bacteria in an experimental oral biofilm. *J Breath Res*. 2016;10(4):046011.
- 59- Dudzik A, Chomyszyn-Gajewska M, Łazarz-Bartyzel K. An Evaluation of Halitosis using Oral Chroma™ Data Manager, Organoleptic Scores and Patients' Subjective Opinions. *J Int Oral Health* 2015;7(3):6-11.
- 60- Salako NO, 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* 2011;20:75–79.

8. ANEXOS

8.1. Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED NA REDUÇÃO DA HALITOSE; ENSAIO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO

Pesquisador: Marcela Leticia Leal Gonçalves

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 74228417.2.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.525.893

Apresentação do Projeto:

A halitose, também conhecida como mau hálito, é um termo utilizado para definir um odor desagradável e fétido que emana da boca, podendo apresentar origem local ou sistêmica.

Objetivo da Pesquisa:

observar a presença de halitose e verificar se o tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é eficaz contra esta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No tratamento com a PDT e raspador, o paciente pode sentir náusea quando o profissional manipular a língua. Caso isso ocorra, o procedimento será interrompido e retomado apenas quando o paciente relatar melhora na náusea.

Benefício: Redução imediata da halitose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo direcionado para avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica no nível de halitose, qualidade da saliva e funções orofaciais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências anteriores foram sanadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f).

De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_980780.pdf	06/12/2017 16:50:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLEurucum.docx	06/12/2017 16:49:16	Marcela Leticia Leal Gonçalves	Aceito

Justificativa de Ausência	TCLEurucum.docx	06/12/2017 16:49:16	Marcela Leticia Leal Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Novoprojetourucumdoutorado.docx	23/11/2017 21:09:33	Marcela Leticia Leal Gonçalves	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_2326915.pdf	02/11/2017 09:19:05	Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	21/08/2017 14:02:36	Marcela Leticia Leal Gonçalves	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 05 de Março de 2018

Assinado por:
Andrey Jorge Serra
(Coordenador)

8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
DIRETORIA DA SAÚDE
DOUTORADO 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 Marcela Leticia Leal Gonçalves (doutoranda 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: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED NA REDUÇÃO DA HALITOSE– ENSAIO CLÍNICO
2. Objetivos: avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica no nível de halitose, qualidade da saliva e funções orofaciais.
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 e um protocolo eficaz de tratamento.
4. Procedimentos da Fase Experimental: A pesquisa será realizada com pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 50 anos. 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, receberão,

raspagem lingual e terapia fotodinâmica. Espera-se que as consultas durem um total de aproximadamente 40 minutos.

5. Desconforto ou Riscos Esperados: No tratamento com a PDT e raspador, 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 Marcela L. L.Gonçalves (13) 997047174. 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 (UNINOVE).

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: Marcela Leticia Leal Gonçalves – Tel (11) 99704-717

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.

Santos, _____ de _____ de 2017.

Nome do responsável (por extenso): _____

Assinatura: _____

1ª via: Instituição

2ª via: Voluntário

8.3. Ficha de Exame Clínico

NOME	IDADE		
	SIM	NãO	QUAL/QUANTOS?
ANAMNESE			
Tem algum problema de saúde?			
Faz uso de algum medicamento? Qual?			
Tem ou teve alguma reação alérgica (alimento/medicamento)?			
Fuma?			
Tem ou teve problema no coração?			
Tem dificuldade de digestão ou algum problema estomacal?			
Tem problema no intestino?			
É respirador bucal (respira a maior parte do tempo pela boca)?			
Tem diabetes?			
Faz uso de algum tipo de substância ilícita (droga)?			
Quantas vezes por dia escova os dentes?			
Qual creme dental utiliza?			
Usa enxaguatório bucal?			
Usa fio dental?			
Tem hábito de limpar a língua?			
Sua gengiva sangra?			
Sente a boca descamar?			
Tem sensação de boca seca?			
Senti gosto ruim na boca ou sensação de mal hálito?			
EXAME CIÍNICO			
Presença de cárie?			
Alterações gengivais?			
Descamação da mucosa?			
Lábios ressecados?			
LÍNGUA			
Saburra: 1/3, 2/3, total?			
HALIMETRIA			
ORALCHROMA COM CISTEINA ANTES			
	antes	depois	7 dias
SH2			
CH3SH			
TRATAMENTO			
RASPADOR			
aPDT			
aPDT + RASPADOR			

8.4. Artigo 1 publicado

Gonçalves et al. *Trials* (2018) 19:590
<https://doi.org/10.1186/s13063-018-2913-z>


Trials

STUDY PROTOCOL

Open Access



Photodynamic therapy with *Bixa orellana* extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial

Marcela Leticia Leal Gonçalves¹, Ana Carolina Costa da Mota¹, Alessandro Melo Deana¹, Guelton Hirano Guedes¹, Lisyane Araújo de Souza Cavalcante², Renato Araújo Prates¹, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana¹, Christiane Pavani¹, Lara Jansiski Motta¹, Greice de Brito Bitencourt³, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Monica da Consolação Canuto Salgueiro³, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari³, Daniela Fátima Teixeira da Silva¹, Cristiane Miranda França⁴ and Sandra Kalil Bussadori^{1*} 

Abstract

Background: Halitosis is an unpleasant breath odour that can interfere with the professional life, social life and quality of life of people who suffer from it. A modality of treatment that has been increasing in dentistry is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). *Bixa orellana*, popularly known as “urucum” is a plant native to Brazil. The seeds are used to produce a dye that is largely used in the food, textile, paint and cosmetic industries. The aim of this study is to verify whether aPDT with *Bixa orellana* extract and blue light-emitting diodes (LEDs) is effective in reducing halitosis. This method will also be compared with tongue scraping, the most commonly used conventional method for tongue coating removal, and the association of both methods will be evaluated.

Methods/design: A randomized clinical trial will be conducted at the dental clinic of the Universidade Nove de Julho. Thirty-nine patients will be divided by block randomization into three groups ($n = 13$) according to the treatment to be performed. In Group 1, tongue scraping will be performed by the same operator in all patients for analysis of the immediate results. Patients will also be instructed on how to use the scraper at home. Group 2 will be treated with aPDT with *Bixa orellana* extract and the LED light curing device: Valo Cordless Ultradent®. Six points in the tongue dorsum with a distance of 1 cm between them will be irradiated. The apparatus will be pre-calibrated at wavelength 395–480 nm for 20 s and 9.6 J per point. In Group 3, patients will be submitted to the tongue scraping procedure, as well as to the previously explained aPDT. Oral air collection with the Oral Chroma™ and microbiological collections of the tongue coating shall be done before, immediately after and 7 days after treatment for comparison.

Discussion: Halitosis treatment is a topic that still needs attention. The results of this trial could support decision-making by clinicians regarding aPDT using blue LEDs for treating halitosis on a daily basis, as most dentists already have this light source in their offices.

Trial registration: ClinicalTrials.gov, [NCT03346460](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03346460). Registered on 17 November 2017.

Keywords: Halitosis, Photodynamic therapy, *Bixa orellana*

* Correspondence: sandraskb@gmail.com

¹Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, Vergueiro Street, 235/249, Liberdade, São Paulo, SP ZIP 01504-001, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Halitosis is an unpleasant breath odour that can interfere with the professional life, social life and quality of life of people who suffer from it [1, 2]. The prevalence of this condition may greatly vary, depending on the population. Studies show that moderate halitosis affects one third of individuals [3]. Bad breath can have both extraoral and intraoral causes, such as the use of some types of medication, dry mouth, smoking, systemic conditions and inefficient oral hygiene [1, 4]. Particularly in young patients, the presence of tongue coating seems to be the main cause of halitosis [5]. To diagnose halitosis, some tests can be conducted [6]. Among them, the organoleptic method is very often used; however, it is considered a subjective measure. The use of the Oral Chroma™, on the other hand, is the most indicative way of determining the presence of halitosis, since it has the ability to distinguish between the volatile sulphur compounds (VSCs) responsible for halitosis. Additionally, it can determine not only the presence of halitosis, but also its origin, according to the most prevalent gases [7].

The most common treatments for halitosis include the use of mouthwashes, periodontal treatment, oral hygiene instructions and tongue coating cleaning [8, 9]. While the mechanical removal of tongue coating can be easily done by patients themselves and is widely recommended, it is an oral hygiene procedure that is little practiced due to discomfort or lack of awareness [10]. Regarding mouthwashes, some of them seem to be efficient in the temporary reduction of halitosis, but few data with respect to their efficiency in tongue coating reduction are available [11–13]. The combination of more than one treatment, such as tongue cleaning associated with periodontal treatment and rinses, always seems to have better results [13, 14], which indicates the complexity of the problem. Considering this, it is thus necessary to do more research in this area, introducing new techniques for the reduction of this condition.

A modality of treatment that has been increasing in dentistry is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). This therapy is based on the principle that the combination of a dye, called a photosensitizer (PS), with an appropriate wavelength light source and the ambient oxygen can produce reactive oxygen species that may lead to the death of microorganisms [10]. aPDT presents a series of advantages, such as unlikely development of resistance by bacteria and the fact that it is a non-invasive procedure [15]. Its use is being studied in several areas in dentistry, such as periodontics [16] and endodontics [17] and in the treatment of mucosa wounds [18] and cavities [19]. aPDT has also been used in clinical trials for the reduction of halitosis with methylene blue and red laser, and satisfactory results have been obtained [7, 20–22].

Bixa orellana, popularly known as "urucum", is a plant native to Brazil. The seeds are used to produce a dye that

is largely used in the food, textile, paint and cosmetic industries. This dye is one of the few that are accepted by the World Health Organization (WHO), due to the fact that it is not toxic [23]. It has important antioxidant and antimicrobial activities [24], and recent studies have shown its potential as a therapeutic agent, source of drugs and natural dye [23, 25]. Also, the use of red/yellowish dyes, such as curcumin, is being researched for their application in aPDT [26, 27]. Due to its positive characteristics, especially regarding the lack of mutagenic and cytotoxic activity, allied to the promising results reported by laboratory studies regarding its antimicrobial effect, *Bixa orellana* extract could be considered a suitable candidate as a PS. Besides that, most dentists already have blue light-emitting diodes (LEDs) in their offices, so using a red dye with these LEDs would make aPDT treatment more accessible.

Hypothesis

Based on this background, this research will test the hypothesis that aPDT with *Bixa orellana* extract and blue LED is effective in the reduction of halitosis.

Objective

The aim of this study is to verify whether aPDT with *Bixa orellana* extract and blue LED is effective in the reduction of halitosis, providing an accessible treatment for this condition, as the majority of dentists already have this sort of device in their offices. This method will also be compared with tongue scraping, the most commonly used conventional method for tongue coating removal, and the association of both methods will also be evaluated.

Methods/design

Study design

The protocol is in accordance with the 2013 Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) Statement. The SPIRIT checklist can be found as Additional file 1, and the schedule of enrollment, interventions and assessments of the present study is depicted in Fig. 1.

This study has been approved by the Ethics Committee of Universidade Nove de Julho under process number 742284172.0000.5511. Possible changes in this project shall be reported to the committee. All participants who agree to participate voluntarily will sign an informed consent form, as stipulated in Resolution 466/2012 of the Brazilian National Board of Health. A randomized clinical trial will be conducted at the dental clinic of the Universidade Nove de Julho. Patients will be divided by block randomization into three groups (n per group = 13), according to the treatment to be performed (Fig. 2). Opaque envelopes will be identified, and a sheet containing the information of the corresponding experimental group will be inserted. The envelopes will be

TIMEPOINT	STUDY PERIOD					
	Enrolment	Allocation	Post-allocation			Close-out
	10 March 2018 – 31 Oct 2018	0	T ₁ Baseline	T ₂ Immediately after	T ₃ Seven days control	01 Nov 2018 – 5 Dec 2018
ENROLMENT:						
Eligibility screen	X					
Informed consent	X					
Allocation		X				
INTERVENTIONS:						
Treatment with tongue scraper			X			
Treatment with aPDT			X			
Treatment with tongue scraper + aPDT			X			
ASSESSMENTS:						
Halimetry with OraChroma™			←————→			
Microbiological Sample Collection			←————→			
Statistical Analysis						X

Fig. 1 Schedule of enrollment, interventions and assessments of the present study

sealed and will remain sealed in numerical order in a safe place until execution of the procedures.

Participants

Students and employees from the Universidade Nove de Julho will be screened, and 39 subjects who fulfil the inclusion and exclusion criteria will be selected to participate in this research.

The inclusion criteria are as follows: patients of both genders, from 18 to 25 years old, who present a volatile sulphur compounds (SH₂) > 112 ppb measured using the Oral Chroma™.

The exclusion criteria are as follows: individuals with dentofacial anomalies (such as cleft lip or cleft palate), who are undergoing orthodontic and/or orthopaedic treatment, who have periodontal diseases (such as gingivitis or periodontitis) or dental cavities, who are undergoing oncological treatment, with systemic alterations (gastrointestinal, renal, hepatic), who have undergone

antibiotic therapy up to 1 month before the survey, who are pregnant or who are smokers.

Sample composition

To calculate the sample size, the data from the article by Costa da Mota et al. [21] were used. We established an error $err = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$, where \bar{x}_1 and \bar{x}_2 are the baseline values for periodontal treatment with aPDT. From this error, the effect size was calculated, given by:

$$\frac{err}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

where σ_1^2 and σ_2^2 are the variances of Groups 1 and 2, respectively.

Assuming that the studied groups have a normal or approximately normal distribution, that the sample size will be sufficiently large and that a two-tailed test will be used, for a significance level $\alpha = 0.05$ and maintaining

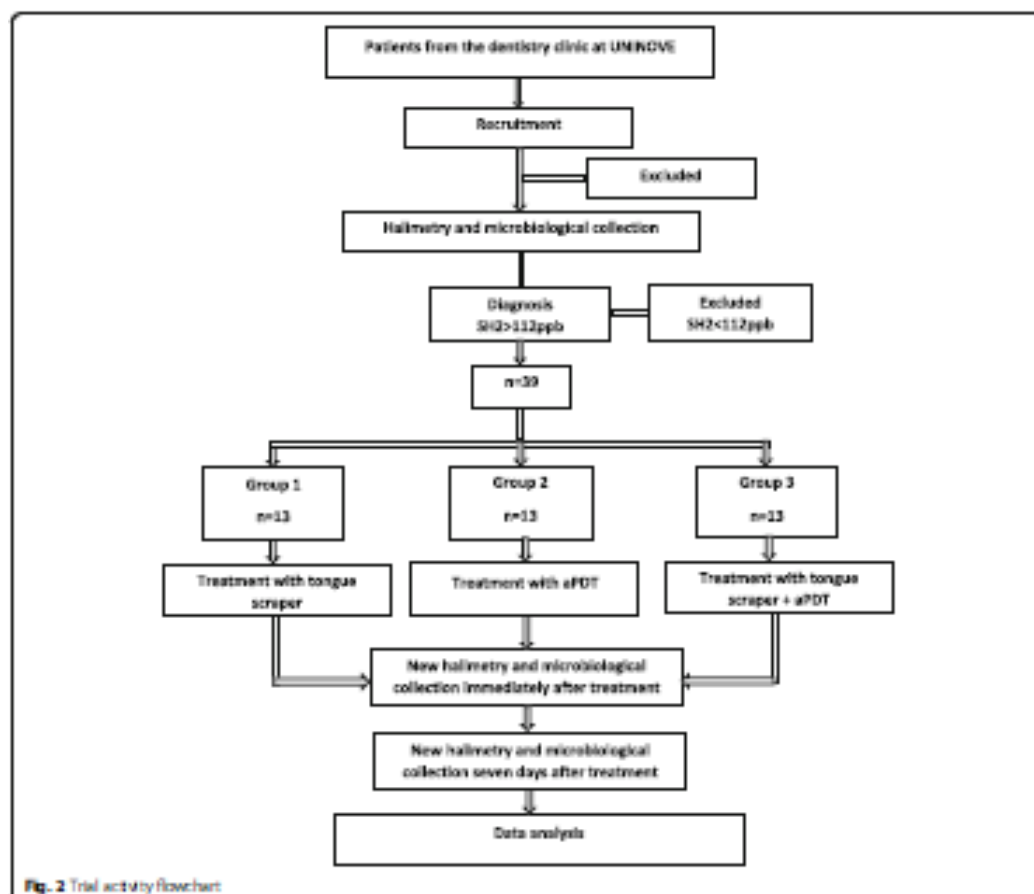


Fig. 2 Trial activity flowchart

the power of the test $1 - \beta = 0.90$ we have Group 1: 13 patients, Group 2: 13 patients, Group 3: 13 patients.

Interventions

Tongue scraping

In Group 1, tongue scraping will be performed by the same operator in all patients. Posterior-anterior movements will be performed with a plastic scraper (Hallimæ*) over the lingual dorsum, followed by cleaning of the scraper with gauze. Also, the tip of the tongue will be cleaned with another piece of gauze in order to remove the tongue coating that could be accumulated in this area. This procedure will be performed ten times in each patient in order to standardize the mechanical removal of the coating. In the groups in which we use tongue scrapers (Groups 1 and 3), the scrapers will be given to the patients, and they will be instructed to use them every night. Data on whether they use the scraper

regularly will be collected on the 7 days control, so the effect of tongue scraping can be checked as well as the compliance of patients to this technique.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT)

Group 2 will be treated with aPDT. The LED light curing device Valo Costless Ultradent*, an office appliance, with a coupled radiometer, and a spectrum of 440–480 nm will be used. Both the volunteer to be treated and the professional will be using specific eye protection glasses. The active end of the LED will be coated with clear disposable plastic (PVC), thus avoiding cross contamination. One session of aPDT with *Bixa orellana* extract in spray will be performed. *Bixa orellana* extract manipulated at a concentration of 20% (Fórmula e Ação*) will be applied in a sufficient amount to cover the middle third and back of the tongue. Following 2 min of pre-irradiation time, six points in the tongue

dorsum with a distance of 1 cm between them will be irradiated. The apparatus will be pre-calibrated at wavelength 395–480 nm for 20 s and 9.6 J of energy per point, which is similar to the energy used in other protocols of aPDT in the tongue that have had satisfactory results [7, 15–17]. Table 1 shows all the parameters that shall be used. The energy of 9.6 J per point is similar to the energy used in other protocols of aPDT in the tongue that had satisfactory results [7, 15–17], which is why we are maintaining this parameter.

In Group 3, patients will receive tongue scraping performed by the same operator with instructions to perform the tongue scraping as described in Group 1, and also aPDT with *Blue ovalness* extract as described in Group 2.

Outcome measures

Halimetry

Oral air collection will follow the Oral Chroma[™] manufacturer's guidelines. The participant will be instructed to rinse with a cysteine solution (10 mM) for 1 min and then remain with his/her mouth closed for 1 min. A syringe from the same manufacturer for collection of mouth air will be introduced into the patient's mouth. For 30 s the patient will remain with his/her mouth closed, breathing through the nose, without touching the syringe with the tongue. The plunger will be pulled out, re-emptied into the patient's mouth and pulled out again to fill the syringe with the breath sample. We will place the gas injection needle in the syringe and adjust the plunger to 0.5 ml. The collected gases will be injected into the entrance door of the unit in a single movement. This

Table 1 LED parameters to be used in this study

Wavelength (nm)	395–480
Operating mode	Continuous wave
Average radiant power (mW)	480
Polarization	Random
Aperture diameter (cm)	0.9
Irradiance at aperture (mW/cm ²)	762
Beam profile	Top hat
Beam spot size at target (cm ²)	3.14
Irradiance at target (mW/cm ²)	153
Exposure duration (s)	20
Radiant exposure (J/cm ²)	6.37
Radiant energy (J)	9.6
Number of points irradiated	6
Area irradiated (cm ²)	18.8
Application technique	Contact
Number and frequency of treatment sessions	1
Total radiant energy (J)	57.6

procedure will be carried out in all of the groups before treatment, immediately after treatment and after 7 days for comparison of the levels of VSCs.

To avoid changes in the halimetry, participants will be instructed to follow these instructions: 1. 48 h before evaluation, avoid ingesting food with garlic, onion or strong seasoning, alcohol consumption and the use of mouthwashes; 2. on the day of the evaluation, do not eat 2 h before the exam; abstain from coffee, candies, chewing gum and oral hygiene products; and perform tooth brushing only with water. In order to make the evaluations more similar, all patients will be scheduled in the afternoons, at approximately the same time, following the same instructions, so we can minimize variations. In addition, patients will be submitted to a brief anamnesis. Data will be collected about past and current health conditions, the use of dental floss, frequency of tooth brushing, tongue cleaning habits and the use of mouthwashes. These data will be collected in the baseline appointment and confirmed in the 7 days follow-up.

Two calibrated operators will also evaluate the presence of tongue coating. They will be trained and submitted to exercises in order to grade the presence of coating. These exercises will be conducted with 40 pictures, which will also be guided by a benchmark examiner who is specialized in halitosis and will provide the theoretical explanation before the training. The intra-examiner calibration will be performed with an interval of 2 days. A grade "0" will be awarded in cases where no coating can be seen; "1/3" in cases where only the posterior third of the tongue is covered with coating; "2/3" in cases where the posterior and middle thirds of the tongue are covered with coating; and "3/3" in cases where the whole dorsum of the tongue is covered with coating [28].

Microbiological analysis

The microbiological analysis of tongue coating will be performed by collecting biofilm samples from the region of the lingual dorsum with a 1- μ l inoculation loop. Samples will be transferred into individual vials containing 1.5 ml of reduced transport fluid and placed in the vortex for approximately 30 s. After homogenization, the ten-fold dilution series will be prepared in 180 μ l of sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution and 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} aliquots and transferred to blood agar plates. Considering that the main bacteria responsible for the production of VSCs are Gram-negative and anaerobic, plaques will be incubated in an anaerobic jar for 72 h at 37 °C, for later counting of the colony-forming units (CFUs). This procedure will be performed before, immediately after and 7 days after treatment.

Harms

The participants will be treated at the university, to make it easier for them to return, avoiding absences. No adverse effects are expected from any of the treatments.

Statistical analysis

Data from Oral Chorma™ will be analysed for their normality by the Shapiro-Wilk test. If the normality hypothesis is accepted, the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test will be used when necessary to perform the between-groups analysis. To analyse the results of the treatment in both periods of the study, the *t* test for paired data will be used. If the normality hypothesis is rejected, the Kruskal-Wallis test followed by the Student-Newman-Keuls test, when necessary, will be used. To analyse the results of each treatment in both periods of the study, the Wilcoxon test will be used.

The kappa test will also be used to check inter-rater reliability in the evaluation of the presence of tongue coating.

Discussion

Halitosis treatment is a topic that still needs attention, as it very often results in the social isolation of the patient and may eventually cause depression [29]. Studies have shown that self-cleaning of the tongue alone is not completely efficient for the reduction of halitosis, highlighting the importance of dental professionals in both treatment and prevention of this condition [9, 30]. Regarding the use of mouth rinses, there is limited evidence that they may be effective in the reduction of halitosis, and studies do not show a beneficial effect for the reduction of tongue coating [11]. Also, it has been suggested that the use of antimicrobial agents is associated with some collateral effects, such as unpleasant taste, staining effects and especially harm to normal oral microflora [31]. In contrast, aPDT has been proven as a good complementary treatment for this condition [7, 20–22]. As opposed to conventional antimicrobial methods, aPDT has the advantages of being a non-invasive procedure, it does not result in undesired side effects, and the development of resistance by bacteria is unlikely [15]. Additionally, one could speculate that patients also tend to appreciate new and technological methods of treatment, which could increase the satisfaction regarding this therapy.

To date, studies using aPDT have been carried out using methylene blue in combination with a red laser. *Bixa orellana* is a natural, innovative and reddish PS, which allows its use with blue LEDs and could turn this protocol of treatment into a more accessible one, since the majority of dentists already have this source of light in their offices. Therefore, the present study could be of great importance to clarify if the application of aPDT with a blue LED and *Bixa orellana* results in the same

trend of reduction of halitosis as that reported in the literature when using the combination of treatments [13, 14].

The period of 7 days for control was established in order to verify the recolonization of bacteria, which usually happens very quickly in the tongue. The results immediately after the different treatments are the most important ones, as they will really show their efficacy. Additionally, the investigations using aPDT for the treatment of halitosis show its effects immediately after treatment [7, 21, 22]. Furthermore, this trial was designed to be applied in the dental practice in the future, so the 7-day interval also represents a period in which patients could come back to the dental office, retake the halimetry and repeat the aPDT, if necessary. This way, dentists will be able to control the presence of halitosis and treat patients once a week in persistent cases. This protocol will also enable the comparison of aPDT alone with tongue scraping alone and with the combination of both techniques in order to verify the most efficient treatment.

It is also important to point out that, while halitosis is an important issue for young people, most studies on this subject are conducted in older patients. Moreover, tongue coating seems to be the principle cause of halitosis in this population [5]. In conclusion, it is crucial to study the age range in question in this protocol and possible treatments to reduce the presence of tongue coating in young adults.

Trial status

This study is not yet recruiting participants.

Additional file

Additional file 1: SPIRIT 2013 checklist recommended items to address in a clinical trial protocol and related documents. (DOC 121 kb)

Abbreviations

aPDT: Antimicrobial photodynamic therapy; CFU: Colony-forming unit; LED: Light-emitting diode; Sily: Sulphide; SPIRIT: Standard Protocol Items Recommendations for Interventional Trials; VSC: Volatile sulphur compound

Acknowledgements

The authors would like to thank Unilensidade Nove de Julho for the support it will provide.

Funding

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), process number 2017/0983-5, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 305504/2017-2, for the conveyed grants.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analysed during the current study will be available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

LBM, ACRT, RAM, KPST, AWQ, RAP, CP, GIG and SKB helped in creating the protocol and the study design. MCCS, MILG, ACCM, GIL, LASC and DITS are helping with patient recruitment and performance of the procedures and also

drafted the text. SD and CMF helped in the analysis of the text and revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study has been approved by the Universidade Nova de Lisboa Ethics Committee under protocol number: R2296/17.200005511.

Consent for publication

All patients who agree to participate in the study will be asked to sign an informed consent form.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Author details

¹Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nova de Lisboa, Vergueiro Street, 205246, Liberdade, São Paulo, SP ZIP 01504-001, Brazil. ²Universidade Nova de Lisboa, Vergueiro Street, 235249, Liberdade, São Paulo, SP ZIP 01506-003, Brazil. ³Research Innovation Sciences, Universidade Nova de Lisboa, Vergueiro Street, 235249, Liberdade, São Paulo, SP ZIP 01504-001, Brazil. ⁴Biomechanics and Biomechanics, School of Dentistry, Oregon Health and Science University, 3730 S.W. Moody Ave, Portland, OR 97201, USA.

Received: 22 March 2018 Accepted: 10 September 2018

Published online: 29 October 2018

References

- Mutayrikh AS, Hamdan RA, Haddad ISMA, Al-Jaghieh H, Al-Naimi Q, Jaddoh H, Garmal M, Syed R. Self-perception, knowledge, and awareness of halitosis among dental university students. *Clin Cosmetol Inveig Dent*. 2017; 9(4):52.
- Schurmeier MG, Zuchner A, Filippi A. Evaluation of a halitosis clinic over a period of eleven years. *Swiss Dent J*. 2017; 127(9):66–51.
- Milneri FC, Nogueira B, Wigger TR, Duarte LD, Haas AN. Self-reported halitosis and associated demographic and behavioral factors. *Swiss Dent J*. 2016; 120(3):67.
- Torres M, Gómez-Morán G, Aguilera-Salvador A. Drug-related oral malodour (halitosis): a literature review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 21(4):60–4.
- Sigler T, Filippi A. Importance of halitosis. *Swiss Dent J*. 2016; 126(9):3–53.
- Falcho CP, Miranda PC, Almeida FFG, Galvão MG, Fregni F, Amorim RB. Assessment of the accuracy of portable monitors for halitosis evaluation in subjects without malodor complaint. Are they reliable for clinical practice? *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(5):59–65.
- Gonçalves ML, Buzardot SK, Rappos YD, Silva WRG, Deana AM, Camêlo AC, Pinho FJ, Ferreira ACG, Fungo CM. Effect of photodynamic therapy in the reduction of halitosis in patients with multiple sclerosis: clinical trial. *J Breath Res*. 2017. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aad009>
- Pati S, Acharya S, Hattiwata S, Singhal DK, Srinivasan SR, Khatri S. Evaluation of the efficacy of G33 (commercially available ayurvedic preparation) in reducing halitosis—a randomized controlled trial. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(6):739–40.
- Wang L, He J. Effect of mechanical self-cleaning of tongue coating on malodour in halitosis patients originating from tongue coating. *Journal of Peking University (Health Sciences)*. 2014; 39(2):144–8.
- Bonito A, Michab R, Staples AM, Bowman J, Heniple J, Sierra MP. Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(Suppl. 1):S3–8.
- Blom T, Slot DC, Quynen M, Van der Weijden GA. The effect of mouthrinses on oral malodour: a systematic review. *Int J Dent Hygiene*. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.00966.x>
- Yada SR, Kati WW, Padhye A. Inhibition of tongue coat and dental plaque formation by stabilized chlorine dioxide vs. chlorine dioxide mouthrinse: a randomized, triple blinded study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(7):769–74.
- Feller L, Bignardi C. Halitosis: a review. *SAGE*. 2005; 6(3):17–9.
- Quynen M, Zhao H, Soets C, Dekeyser C, Pauwels M, Coucke W, Steenbergh G. The impact of periodontal therapy and the adjunctive effect of antiseptics on breath odor-related outcome variables: a double-blind, randomized study. *J Periodontol*. 2005; 76(3):305–13.
- Carneiro D, Dias JB, Costa SC T, Mercantório RC, Bernardi ACA, Bignardi VJ, Barbin MR, Rastelli AVS. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys*. 2016; 26(3). <https://doi.org/10.1002/las.20466>
- Melmond M, Talebi Afsarian MR, Firoozi Nejad A, Yousefnejad P, Saedi K, Djavad MR. The effect of photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a review of literature. *J Lasers Med Sci*. 2017; 8(Suppl 1):S7–21. <https://doi.org/10.1517/jlms.2017.07.02>
- Amêlo RAG, Nakano RD, Antunes LAA, Ferreira GB, Fontes CSRC, Antunes LS. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canal infected with *Enterococcus faecalis*. *J Oral Sci*. 2014; 36(4):37–42.
- Dehimi R, Khademil H, Sharg R, Al-Hajjoubadi M. Histological evaluation of wound healing process after photodynamic therapy of rat calvarial skull ulcer. *J Dent Shiraz Univ Med Sci*. 2016; 17(1):43–8.
- Rodito LGD, Connado LAJ, Tuzel CP, Fungo FMC, Belding RT, Amari R S. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LAZER or light emitting diode on orofacial leukoplakia: an in vitro study. *Br J Dent*. 2014; 84(2):9–14.
- Lopes, et al. Photodynamic therapy as a novel treatment for halitosis in adolescents: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014; 15(461).
- Costa da Mota AC, Fungo CM, Pato R, Deana AM, Costa Santos L, Lopes Garcia R, Leal Gonçalves M, Mesquita Benari RA, Pato Sandra Fernandes K, Kall Susardot S. Effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents — a controlled, microbiological, clinical trial. *J Biophotonics*. 2016; 9(1–2):137–48.
- Lopes RG, da Mota AC, Soares C, Tosta G, Deana AM, Pato RA, Fungo CM, Fernandes KR, Benari RA, Susardot SK. Immediate results of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents: a randomized, controlled, clinical trial. *Laser Med Sci*. 2016; 31(4):1–7.
- Vilel CA, Mar MSA, Mous TRAL, Riffin FV, Oliveira M V, Franco CFQ, Abajay-Ribeiro P, Diniz MFRM, Santos-Filho M. Traditional Jain, chemical constituents, and biological activities of *Bac ocellata* L.: a review. *Sd World J*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/27202>
- Cuong TV, Chin WJ. Effects of annatto (*Bixa orellana* L.) seeds powder on physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of pork patties during refrigerated storage. *Korean J Food Sci An*. 2016; 36(4):476–86.
- Shahidul-Islam, Rather LJ, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural pigment production for industrial applications — a review. *J Adv Res*. 2016; 7(4):6–14.
- Naefi S, Waqar-Zadeh M, Paknejad M, Pourangy G, Rastad Farid M, Bahador A. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Lasers Med Sci*. 2016; 7(1):1–5. <https://doi.org/10.1517/jlms.2016.05>
- Tipo Gutierrez B, Zanatta GC, Orrego ALM, Balseguel MEC, PVSÁ, Pavaina AC, et al. Incorporation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *PLoS One*. 2012; 7(1):1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037418>
- Yokoi A, Matsuyama T, Yamazaki R, Okuni G, Tomifuji T, Wakiyama H, Yamazaki Y, Motoki M. Relationship between orofacial dryness concentration in mouth air and tongue coating volume. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(1):64–70. <https://doi.org/10.1590/1607-7772.2014.0231>
- Suzuki N, Yoshida M, Kubo T, Yamamoto T, Hirauchi T. Relationship between halitosis and psychologic status. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(4):54–7.
- Oyebode OC, Ouyebode FI, Itanul GA, Olatunji S. Review of presentation and outcome of routine dental interventions in patients with halitosis. *Niger Postgrad Med J*. 2016; 28(2):15–20.
- Rodito LG, Ferreira D, Sara M. Biflora and the tongue: therapeutic approaches for the control of halitosis. *Clin Oral Inveig*. 2005; 9(4):389–93.

8.5. Comprovante de submissão do artigo 2

Clinical Oral Investigations

Antimicrobial photodynamic therapy with Bixa orellana extract and blue LED in the reduction of halitosis – a randomized, controlled clinical trial

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CLOI-D-18-01554
Full Title:	Antimicrobial photodynamic therapy with Bixa orellana extract and blue LED in the reduction of halitosis – a randomized, controlled clinical trial
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Sandra Kalil Bussadori, Ph.D. Universidade Nove de Julho São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Nove de Julho
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marcela Leticia Leal Gonçalves
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marcela Leticia Leal Gonçalves Ana Carolina Costa da Mota Alessandro Melo Deana Lisyanne Araújo de Souza Cavalcante Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana Christiane Pavani Lara Jansiski Motta Kristianne Porta Santos Fernandes Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari Daniela Fátima Teixeira da Silva Cristiane Miranda França Sandra Kalil Bussadori, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Objectives</p> <p>To evaluate the reduction of halitosis when using antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with annatto and blue LED.</p> <p>Materials and Methods</p> <p>Forty-four students or UNINOVE employees with a diagnosis of sulfide (SH₂) ≥ 112 ppb in gas chromatography were selected. The patients were divided in groups: Group 1 (n=15): aPDT with annatto and LED; Group 2 (n=14): tongue scraping; Group 3 (n=15): tongue scraping and aPDT. For aPDT, annatto was used in a concentration of 20% (Fórmula e Ação®) on the tongue for 2 minutes, associated with a LED (Valo Cordless Ultradent®). Six points were irradiated on the back of the tongue with a distance of 1 cm, at wavelength 395-480 nm for 20 seconds, energy of 9.6 J and radiant energy of 6.37 J/cm² per point. The results of the halimetry were compared</p>

	<p>before, immediately after treatment and 7 days after. The Friedman test was used for the intragroup analysis and the Kruskal Wallis test for the intergroup analysis.</p> <p>Results</p> <p>In all groups, there was a difference between baseline and the value immediately after the treatment. In Groups 1 and 3, there was no difference between the baseline and the 7 days control. In Group 2, these times were not similar. There was no statistical difference between groups.</p> <p>Conclusions</p> <p>Groups 1 and 3 provided immediate reduction of halitosis, but did not maintain the reduced levels after 7 days.</p> <p>Clinical Relevance</p> <p>It is an innovative, inexpensive and simple technique that could be used in a large scale in dentistry because most dentists already have blue LEDs in their offices.</p>
Suggested Reviewers:	

8.6. Informações para membros externos de bancas

Caro(a) professor(a), agradecemos ter aceitado nosso convite, ficaremos muito honrados com sua presença.

Para facilitar sua análise, esclarecemos que os trabalhos de dissertação e tese do Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde devem seguir a seguinte estrutura:

1. Contextualização do objeto de estudo com a respectiva justificativa;
2. Objetivos que devem estar alinhados aos artigos publicados;
3. Métodos. Toda metodologia utilizada no(s) artigo(s);
4. Resultados. Descrição dos resultados ainda não publicados e/ou apenas a referência completa do(s) manuscrito(s) publicado(s) ou aceito(s) para publicação no caso de todos resultados já terem sido aceitos ou publicados. Os artigos devem estar disponíveis na seção “Anexos”.
5. Discussão. Abordagem do conjunto dos resultados frente à literatura pertinente;
6. Conclusão. Descrição concisa do significado dos resultados;
7. Anexo. Informações adicionais não reportadas nas seções anteriores e o(s) artigo(s) publicado(s) ou submetido(s) a publicação.