UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA

Pamella de Barros Motta

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED E PROBIÓTICOS NA REDUÇÃO DA HALITOSE: ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

São Paulo, SP

2024

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED E PROBIÓTICOS NA REDUÇÃO DA HALITOSE: ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Medicina - Biofotônica.

Orientadora Profa. Dra.: Sandra Kalil Bussadori

São Paulo, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Motta, Pamella de Barros.
Efeito da terapia fotodinâmica com urucum e led e probióticos na redução da halitose: ensaio clínico controlado randomizado. / Pamella de Barros Motta. 2024.
69 f.
Tese (Doutorado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.
Orientador (a): Profª. Drª. Sandra Kalil Bussadori.

1. Halitose. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Bixa orellana. 4. Probióticos.
I. Bussadori, Sandra Kalil. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 18 de setembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Pamella de Barros Motta

Título da Tese: "Efeito da terapia fotodinâmica com urucum e led e probióticos na redução da halitose-ensaio clínico controlado randomizado".

Presidente: PROFª. DRª. SANDRA KALIL BUSSADORI_____

Membro: PROFª. DRª. LARA JANSISKI MOTTA_____

Membro: PROFª. DRª. ANA PAULA TABOADA SOBRAL_____

Membro: PROFª. DRª. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA_____

Membro: PROFª. DRª. MARIA APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Seu amor e Sua graça que me alcançam todos os dias e por me capacitar para concluir mais essa etapa.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori, pela honra de ser sua orientada e pela oportunidade de realizar o doutorado. Pelo conhecimento compartilhado, pela orientação e pela paciência.

Agradeço aos membros da banca, Profas. Dras. Lara Jansiski Motta, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Ana Paula Taboada Sobral, Maria Aparecida Moreira Machado por aceitarem o convite para a realização da defesa.

Agradeço à toda minha família, meu marido Gabriel, minha mãe Mazé, meu pai Yuri, minha madrasta Quéren, meu padrastro Cláudio, meus irmãos Nathália, Matheus, Leonardo e Renê, minha sobrinha Lívia, meus avós Vera e Carlos, minhas tias Lara e Milla, meu tio André e meus primos João e Julio, minha cunhada Carol, vocês são tudo para mim e fazem todo esforço valer a pena.

A todos os pacientes participantes não só dessa, mas de todas as pesquisas, por contribuírem com a evolução da ciência no país.

Um agradecimento especial às minhas colegas que se tornaram amigas Ana Paula, Marcela e Juliana, sem vocês esse trabalho não seria possível, obrigada pelo apoio, correções e sugestões. E um agradecimento especial também à Prof Anna CRTH, que foi indispensável na parte microbiológica.

Agradeço à Uninove por essa grande oportunidade e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) por concederem auxílio a pesquisa números 2019/14229-6 e 2022/16828-7.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES 88887.818185/2023-00 pelo apoio financeiro concedido, possibilitando minha dedicação à realização dessa pesquisa.

RESUMO

Halitose é um termo que define qualquer odor ou mau-cheiro proveniente da cavidade oral, que pode apresentar origem local ou sistêmica. Esta pesquisa tem como objetivo verificar se o tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e o tratamento com uso de probióticos são eficazes na sua eliminação. Foram selecionados 52 pacientes, de 18 a 25 anos, com diagnóstico de halitose, apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH2) ≥ 112 ppb. Os participantes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=13), que receberam tratamentos distintos: Grupo 1: tratamento com escovação, fio dental (todos os participantes foram orientados por meio de palestra a realizar escovação com dentifrício contendo fluoreto de amina em sua composição (Elmex®) e uso de fio dental, 3 vezes ao dia após as refeições durante 30 dias e raspador de língua; Grupo 2: escovação, fio dental e aPDT com urucum e LED azul, aplicada na região de dorso e terço médio da língua; Grupo 3: escovação, fio dental e probióticos (cápsulas manipuladas em farmácia contendo cepas *de Lactobacillus salivarius* WB21 (6,7 x 108 UFC) e xilitol (280mg). Foram entregues 42 cápsulas para cada paciente, que ingeriram 1 cápsula, 3 vezes ao dia após as refeições, durante 14 dias; Grupo 4: escovação, fio dental, aPDT e probióticos. Os resultados clínicos mostraram redução imediata da halitose com a aPDT, com o uso do raspador e com o uso das duas terapias combinadas. O resultado imediato mostra a eficácia desses tratamentos, por um período menor do que o de 7 dias. O uso de probióticos não apresentou diferença nos níveis de sulfidreto, em relação aos níveis iniciais. Quanto aos resultados microbiológicos, quando as amostras de saburra lingual foram analisadas por PCR quantitativo para *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Tannerella forsythia*, não foi possível observar diferença ($p<0,05$) entre os grupos para nenhuma das bactérias avaliadas. Quanto ao microbioma, uma amostra representativa foi analisada. Não houve diferença para alfa diversidade entre as amostras estudadas pela análise de Chao1, Shannon e Simpson. Quanto à análise de abundância relativa quanto aos gêneros encontrados foi observada diferença somente no gênero *Pseudarthrobacter* ($p<0.05$) entre o G2 e o G3 aos 14 dias. Em relação aos outros grupos e tempos não houve diferença ($p<0,05$) quanto a abundância relativa para espécie e gênero. Portanto, pode-se concluir que o tratamento com aPDT e/ou probiótico não foram capazes de alterar após 30 dias a microbiota na saburra lingual de pacientes com halitose nessas condições experimentais.

Descritores: Halitose, Terapia Fotodinâmica, *Bixa orellana*, Probióticos

Clinical Trials: NCT03996044

ABSTRACT

Halitosis is a term that defines any odor or bad smell originating from the oral cavity, which may have local or systemic origin. This project aims to verify whether treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and treatment with probiotics are effective in eliminating it. 52 patients were selected, aged 18 to 25 years, diagnosed with halitosis, presenting sulfide (SH2) ≥ 112 ppb on gas chromatography. Participants were randomly divided into 4 groups (n=13), which received different treatments: Group 1: treatment with brushing, dental floss (all participants were instructed through a lecture to brush with a toothpaste containing amine fluoride in its composition (Elmex®) and use of dental floss, 3 times a day after meals for 30 days and tongue scraper; Group 2: brushing, dental floss and aPDT with annatto and blue LED, applied to the back and middle third of the tongue ; Group 3: brushing, dental floss and probiotics (capsules manufactured in a pharmacy containing strains of *Lactobacillus salivarius* WB21 (6.7 x 108 CFU) and xylitol (280mg). 42 capsules were given to each patient, who ingested 1 capsule, 3 times a day after meals, for 14 days; Group 4: brushing, flossing, aPDT and probiotics. Clinical results showed an immediate reduction in halitosis with aPDT, with the use of the scraper and with the use of both therapies combined. The immediate results show the effectiveness of the treatments, for a period shorter than 7 days, which has yet to be discovered. The use of probiotics showed no difference in sulfide levels compared to initial levels. As for the microbiological results, when the tongue coating samples were analyzed by quantitative PCR for *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Tannerella forsythia*, it was not possible to observe a difference ($p<0.05$) between the groups for any of the bacteria evaluated. As for the microbiome, a representative sample was analyzed. There was no difference in alpha diversity between the samples studied by Chao1, Shannon and Simpson analysis. Regarding the analysis of relative abundance regarding the genera found, a difference was observed only in the genus *Pseudarthrobacter* ($p<0.05$) between G2 and G3 at 14 days. In relation to other groups and times, there was no difference ($p<0.05$) regarding relative abundance for species and genus. Therefore, taking into account the limitations of this study, it can be concluded that treatment with aPDT or probiotics were not able to alter the microbiota in the tongue coating of patients with halitosis under these experimental conditions.

Keywords: Halitosis, Photodynamic therapy, Bixa orellana, Probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de atividades. 20

Figura 2: Ajuste do poder do teste em função do tamanho amostral total.....22

Figura 3: Processo de realização da halimetria. 27

Figura 4: Análise de sulfidreto para o grupo “Raspador” 38

Figura 5: Análise de sulfidreto para o grupo “PDT” 38

Figura 6: Análise de sulfidreto para o grupo “Probiótico”. 39

Figura 7: análise de sulfidreto para o grupo “PDT + Probiótico”. 39

Figura 8: grupos em cada período proposto para *Porphyromonas gingivalis* 41

Figura 9: grupos em cada período proposto para *Tannerella forsythia*..... 41

Figura 10: grupos em cada período proposto para *Treponema denticola*..... 42

Figura 11: verificação da alfa diversidade 43

Figura 12: verificação da alfa diversidade 44

Figura 13: verificação da alfa diversidade 44

Figura 14: 20 gêneros mais abundantes presentes nas amostras analisadas. 45

Figura 15: Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% nos grupos controles. 46

Figura 16: Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% nos grupos em que foi realizada a aPDT 46

Figura 17: Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% aos 7 dias..... 47

Figura 18: Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% aos 14 dias..... 48

Figura 19: 20 espécies mais abundantes presentes nas amostras analisadas.48

Figura 20: - Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% nos grupos controles. 49

Figura 21: Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% nos grupos em que foi realizada a aPDT 50

Figura 22: Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% aos 7 dias..... 50

Figura 23: Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% aos 14 dias..... 51

Figura 24: predição do metabolismo entre os grupos e tempos analisados. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros do LED. 24

Tabela 2: Iniciadores utilizados para a obtenção dos amplicons para o preparo da curva padrão e utilização nas reações de qPCR 33

Tabela 3: Ciclos utilizados para a reação de qPCR por espécie analisada 33

Tabela 4: Grupos para análise estatística 35

Tabela 5: dados demográficos dos sujeitos da pesquisa 37

LISTA DE ABREVIATURAS

aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
^{o}C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm^2	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

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO. 15

1.1. Halitose..... 15

1.2. aPDT 15

1.3. Probióticos.....16

2. Justificativa..... 16

3. Hipóteses 17

4. OBJETIVO 17

4.1. Objetivo geral..... 17

4.2. Objetivo específico..... 17

5. MATERIAIS E MÉTODOS 18

5.1. Desenho do estudo..... 18

5.2. Critérios de Inclusão..... 18

5.3. Critérios de Exclusão..... 19

5.4. Randomização..... 19

5.5. Cálculo de amostra..... 21

5.6. Intervenções..... 22

5.6.1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)..... 24

5.6.2. Raspagem lingual..... 25

5.6.3. Tratamento com Probióticos..... 25

5.6.4. Escovação com dentifrício com fluoreto de amina..... 26

5.6.5. Índice de Saburra lingual..... 26

5.7. Medidas de resultado..... 26

5.7.1. Halimetria..... 26

5.7.2. Análise Microbiológica..... 28

SUMÁRIO

5.7.3. Avaliação por PCR..... 31

5.7.4. Microbioma..... 34

5.8. Análise Estatística..... 34

6. RESULTADOS..... 36

6.1. Estudo 1 – Protocolo..... 36

6.2. Estudo 2 – Revisão Sistemática..... 36

6.3. Estudo 3 – Ensaio Clínico Controlado..... 36

6.3.1 Resultados Clínicos..... 37

6.4. Estudo 4 – Estudo Piloto..... 40

6.4.1 Resultados Microbiológicos 40

7. DISCUSSÃO..... 52

8. CONCLUSÃO..... 55

9. REFERÊNCIAS..... 56

10. ANEXOS..... 61

10.1. Aprovação do Comitê de Ética..... 61

10.2. Termo de consentimento livre e esclarecido..... 63

10.3. Artigo 1 publicado..... 66

10.4. Artigo 2 publicado..... 67

10.5. Artigo 3 publicado..... 68

10.6. Artigo 4 publicado..... 69

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Halitose

Halitose é um termo que define qualquer odor ou mau-cheiro proveniente da cavidade oral, que pode apresentar origem local ou sistêmica [1].

Compostos Sulfurosos Voláteis (CVS) são componentes químicos que estão relacionados com a halitose são eles: o sulfeto de hidrogênio (H2S), metilmercaptanas (CH3SH) e o Dimetilsulfeto (CH3SCH3) [2-5].

Existem diferentes métodos de diagnóstico de halitose: a avaliação clínica, conhecida como teste organoléptico, um método subjetivo que consiste em sentir o cheiro exalado pela boca e pelo nariz, e em seguida, quantificar esse odor com o uso de uma escala. Os CVS podem ser medidos com o uso de monitores de sulfeto. E a cromatografia gasosa, o método mais apropriado para o diagnóstico da halitose de qualquer origem, pois realiza a mensuração de 3 principais gases sulfidreto, metilmercaptana e dimetilsulfeto [6-8]. Apesar de ter uma etiologia complexa, as bactérias anaeróbias são apontadas como a principal causa [6]. A prevalência de halitose é alta, sendo possível encontrar na literatura valores acima de 50% [9].

Os tratamentos convencionais utilizados no controle da halitose consistem basicamente no uso de dentifrícios e colutórios, contendo substâncias bactericidas, uso de raspador lingual, tratamento das lesões de cárie e da doença periodontal, além do controle da xerostomia [10]. Alguns estudos sugerem que o fluoreto de amina tem efeito positivo na diminuição da halitose [9].

1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Estudos mostram que tratamentos alternativos, como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) [12-14] e probióticos, tem sido usado na tentativa de controlar a halitose [9,10,15].

A aPDT é um tratamento no qual é utilizado um agente fotossensibilizador que na presença de luz, produz radicais livres de oxigênio levando à morte celular [16].

Os probióticos são definidos como microorganismos que proporcionam efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro quando absorvidos por ele. São frequentemente utilizados em alimentos e produtos fermentados, além de serem utilizados em manipulações farmacêuticas [17].

As vantagens de abordagens alternativas são reduzir os danos aos tecidos e evitar resistência bacteriana.

Protocolos com o uso de LED na redução da halitose já foram desenvolvidos e obtiveram resultados positivos, observando recolonização a partir de 7 dias do tratamento [12, 19], a proposta desse projeto é dar continuidade a esses protocolos, acrescentando o uso de probióticos e a análise por cromatografia gasosa até 30 dias após o tratamento para avaliar sua eficácia.

1.3 Probióticos

O uso de probióticos na odontologia apresenta um tratamento inovador, capaz de modificar a microbiota oral, pois esses microrganismos aderem e recolonizam a cavidade bucal, principalmente no que diz respeito à halitose já que a microbiota oral é complexa, sendo um grande desafio no desenvolvimento de protocolos de prevenção e tratamento da doença [20].

Em uma revisão sistemática e meta-análise, Huang *et al.* (2022) concluíram que algumas cepas de probióticos como *Lactobacillus salivarius, Lactobacillus reuteri, Streptococcus salivarius* e *Weissella cibaria* podem aliviar a halitose em curto prazo [21]

O presente estudo propõe um ensaio clínico controlado para comparar o efeito da terapia fotodinâmica e o uso de probióticos no controle da halitose.

2. JUSTIFICATIVA

A halitose é considerada um importante fator social, pois interfere nas relações interpessoais. Além de gerar preocupações relacionadas à saúde física do indivíduo pode provocar alterações psicológicas, conduzindo à uma barreira social [18].

Justifica-se a realização do projeto devido à escassez de estudos que avaliem a redução da halitose por meio da terapia fotodinâmica e do uso de probióticos,

apresentando o urucum como fotossensibilizador e o LED como uma fonte de luz mais acessível aos dentistas. Embora o azul de metileno combinado com o laser vermelho já tenha sido utilizado com essa finalidade [12, 13, 14, 19], este estudo irá 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.

3. HIPOTESES

H1: Há diminuição da halitose após o uso da terapia fotodinâmica empregando o uso de corante vermelho e LED azul.
H2: Há diminuição da halitose após o tratamento com probióticos.
H3: Há alteração microbiológica após a terapia fotodinâmica antimicrobiana.
H4: Há alteração microbiológica após o tratamento com probióticos.

H0: Não há alteração da halitose após o uso da terapia fotodinâmica empregando o uso de corante vermelho e LED azul. Não há alteração da halitose após o tratamento com probióticos. Não há alteração na halitose após o tratamento associado com aPDT e probióticos. Não há alteração microbiológica após a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Não há alteração microbiológica após o tratamento com probióticos. Não há alteração microbiológica após o tratamento associado com aPDT e probióticos.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral:

Verificar se o tratamento com aPDT, utilizando o urucum como fotossensibilizador e o LED como fonte de luz, é eficaz na redução imediata da halitose quando avaliada pela cromatografia gasosa.

4.2 Objetivos específicos:

1- Comparar a aPDT com a utilização do raspador lingual, método convencional mais utilizado, uso de fio dental e escovação com dentifrício com fluoreto de amina (Elmex®) e uso de probióticos associado ou não a aPDT.
2- Realizar a análise microbiológica quantitativa das bactérias presentes na saburra lingual antes e depois do tratamento, por meio do PCR em tempo real e Microbioma.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, sob o número de processo 20123519.4.0000.5511 (CAAE) e parecer 3.669.442, no dia 29 de outubro de 2019. O registro de ensaio clínico internacional foi realizado na plataforma ClinicalTrials.gov, com o número NCT03996044. O protocolo publicado segue o checklist do SPIRIT.

Essa pesquisa teve auxílio financeiro da Fapesp (2019/ 14229-6 e 2022/16828-7) e apoio da Capes (88887.818185/2023-00).

Foram incluídos 52 participantes, alunos ou funcionários da UNIMES e da UNINOVE, de ambos os sexos, de 18 a 25 anos, com diagnóstico de halitose apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH_2) ≥ 112 ppb. Os 52 participantes diagnosticados com halitose foram divididos aleatoriamente nos 4 grupos experimentais (n = 13 por grupo). Grupo 1: tratamento com escovação, fio dental (todos os participantes foram orientados, por meio de aulas e arquivos enviados, a realizar escovação com dentifrício contendo fluoreto de amina em sua composição (Elmex®) e o uso de fio dental, 3 vezes ao dia após as refeições, durante 30 dias) e raspador de língua; Grupo 2: escovação, fio dental e aPDT

com urucum e LED azul, aplicada na região de dorso e terço médio da língua; Grupo 3: escovação, fio dental e probióticos (cápsulas manipuladas em farmácia contendo cepas de *Lactobacillus salivarius* WB21 (6,7 x 108 UFC) e xilitol (280mg). Foram entregues 42 cápsulas para cada paciente, que deveria ingerir 1 cápsula, 3 vezes ao dia após as refeições, durante 14 dias); Grupo 4: escovação, fio dental, aPDT e probióticos.

5.2 Critérios de Inclusão

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

5.3 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 estejam em tratamento oncológico, com alterações sistêmicas (gastrointestinais, renais, hepáticas), em tratamento com antibiótico até 1 mês antes da pesquisa e grávidas.

5.4 Randomização

A randomização foi realizada utilizando o site randomizer.org, a ordem foi colocada em envelope pardo e o operador retirou o envelope no momento do tratamento.

- **Procedimentos**

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

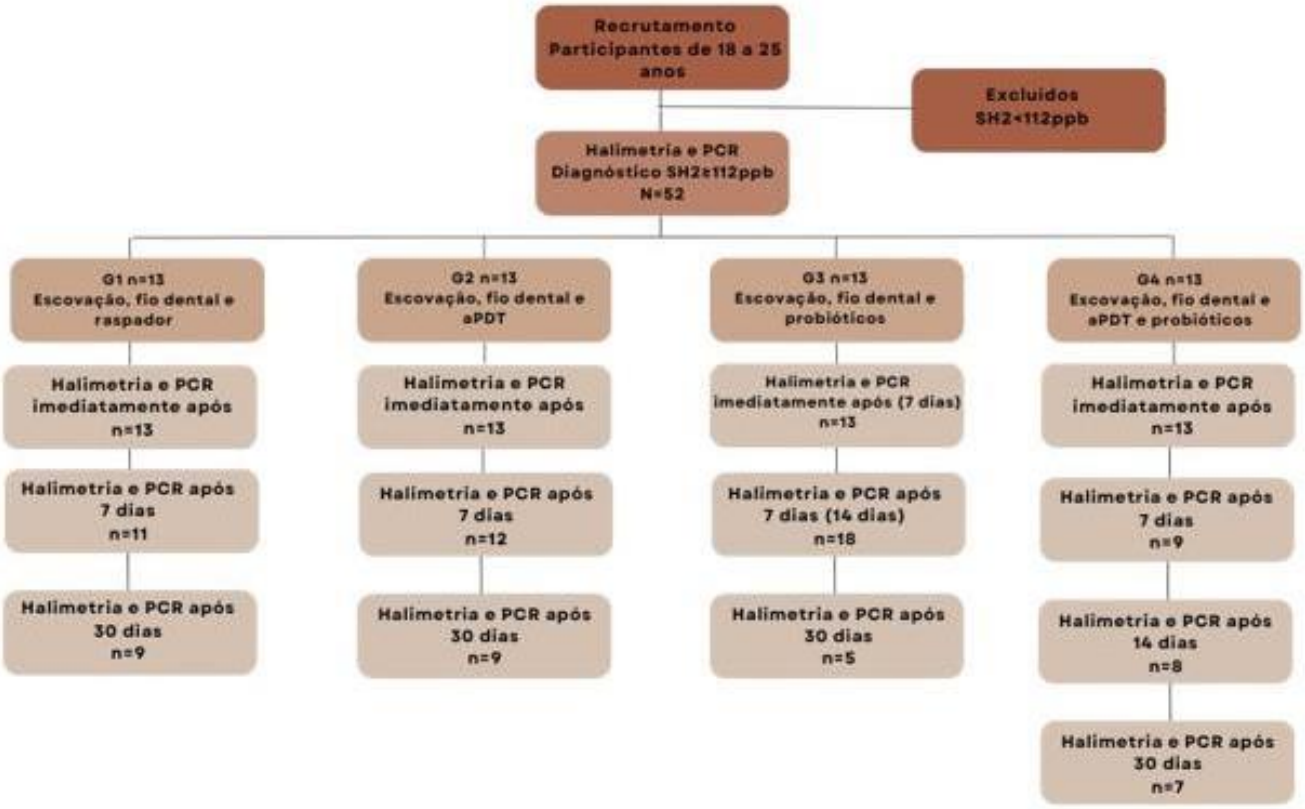


Figura 1: Fluxograma de atividades.

5.5 Cálculo de amostra

Para o cálculo do tamanho amostral foram utilizados os dados do trabalho de Costa da

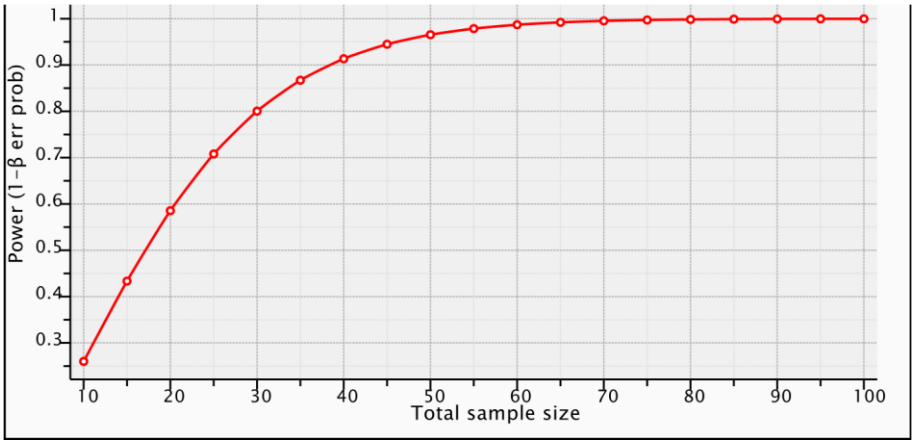
Mota *et al*. (Effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents - a controlled, microbiological, clinical trial) [14].
Inicialmente estabeleceu-se um erro $err = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$, onde x_1 e $\bar{x}_2$ são os valores médios dos grupos baseline a tratamento periodontal 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 foi suficientemente grande e que foi utilizado um teste bicaudal, para um nível de significância α = 0,05 e mantendo o poder do teste 1β = 0,90, temos um n=13 para cada grupo.
Na figura 2 observa-se que com um tamanho amostral total de 39 sujeitos, ou seja, três grupos com 13 amostras cada, que 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 2: Ajuste do poder do teste em função do tamanho amostral total.



Na figura 2 observa-se que com um tamanho amostral total de 52 sujeitos, ou seja, quatro grupos com 13 amostras cada, que 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%.

5.6 Intervenções

Grupo 1 - Escovação, fio dental e raspador

1- Halimetria inicial

2- Coleta de saburra lingual com swab

3- Raspagem lingual

4- Orientações de Higiene Oral

5- Halimetria imetiatamente após raspagem

6- Halimetria após 7 e 30 dias

Grupo 2 – Escovação, fio dental e aPDT

1- Halimetria inicial

2- Coleta de saburra lingual com swab

3- Aplicação de spray de urucum no dorso da língua por 2 minutos

4- Aplicação de LED em 6 pontos

5- Orientações de Higiene Oral

6- Halimetria imetiatamente após aPDT

7- Halimetria após 7 e 30 dias

Grupo 3 – Escovação fio dental e uso de probióticos

1- Halimetria inicial

2- Coleta de saburra lingual com swab

3- Entrega e orientações quanto ao uso dos probióticos

4- Orientações de Higiene Oral

5- Halimetria no 14º dia de tratamento com probióticos

6- Halimetria 7 e 30 dias após a finalização do tratamento

Grupo 4- Escovação, fio dental, aPDT e probióticos

1- Halimetria inicial

2- Coleta de saburra lingual com swab

3- Aplicação de spray de urucum no dorso da língua por 2 minutos

4- Aplicação de LED em 6 pontos

5- Entrega e orientações quanto ao uso dos probióticos

6- Orientações de Higiene Oral

7- Halimetria no 14º dia de tratamento com probióticos

8- Halimetria 7 e 30 dias após a finalização do tratamento

5.6.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Foi utilizado o aparelho fotopolimerizador LED – Valo Cordless Ultradent®, um aparelho de consultório, com radiômetro acoplado, espectro de 440-480nm e irradiância de 450mW/cm. No momento da realização da aPDT estavam presentes somente o participante a ser tratado e o profissional responsável, ambos utilizando óculos específicos para proteção ocular. A ponta ativa do LED foi revestida com plástico transparente descartável (PVC) (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, a ser aplicado em quantidade suficiente para cobrir o terço médio e dorso da língua (5 borrifadas) por 2 minutos para incubação. O excesso foi 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 estava previamente calibrado com comprimento de onda 395-480 nm, durante 20 segundos por ponto, energia de 9,6J, e a luz foi irradiada de modo que fosse formado um halo de 2 cm de diâmetro por ponto. A Tabela 1 contém todos os parâmetros utilizados.

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
Área 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

5.6.2 Raspagem Lingual

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

5.6.3 Tratamento com probióticos

Foram utilizadas cápsulas manipuladas em farmácia contendo cepas de *Lactobacillus salivarius* WB21 (6,7 x 10^8 UFC) e xilitol (280mg). Foram entregues 42 cápsulas para cada participante, que deverá ingerir 1 cápsula, 3 vezes ao dia após as refeições, durante 14 dias.

5.6.4 Escovação com dentifrício com fluoreto de amina

Para todos os grupos, primeiramente, os participantes foram orientados, por meio de palestra e envio de arquivos, a realizar escovação com dentifrício contendo fluoreto de amina em sua composição (Elmex®) e o uso de fio dental, 3 vezes ao dia após as refeições durante 30 dias. A técnica ensinada aos participantes foi a de Bass, em que as cerdas da escova ficam posicionadas num ângulo aproximado de 45º para dentro do sulco gengival, tanto nas faces livres como nas proximais, além de movimentos vibratórios curtos e ligeiramente circulares [22,23].

5.6.5 Índice de saburra lingual

Logo em seguida, fez-se a avaliação inicial da Saburra Lingual empregando-se o Índice de Saburra Lingual (CTI – Coated Tongue Index) proposto por Shimizu *et al.* [24]. A língua foi dividida em 9 partes, para cada parte era dada uma nota, sendo 0 – ausência de saburra lingual, 1 – presença de saburra lingual com papilas visíveis, 2 – espessura de saburra lingual que impossibilita visualizar as papilas. Essas notas foram somadas divididas por 18 e multiplicadas por 100, para obter um índice final de 0-100 %. Cabe esclarecer que os participantes foram somente orientados e não fizeram a escovação e uso do fio dental na mesma sessão do tratamento.

5.7 MEDIDAS DE RESULTADO

5.7.1 Halimetria

A coleta do ar bucal seguiu as orientações do fabricante (Oral Chroma^{TM} Manual Instruction), onde o participante foi orientado a fazer bochecho com cisteína (10 mM) por 1 minuto, em seguida permanecer com a boca fechada mais 1 minuto. Foi introduzida na boca do participante uma seringa do mesmo fabricante própria para coleta do ar bucal. Durante 1 minuto o participante permaneceu de boca fechada, respirando pelo nariz, sem tocar na seringa com a língua. O êmbolo foi puxado para fora, esvaziou-se o ar da seringa na boca do participante e novamente puxou-se o êmbolo para encher a seringa com a amostra do hálito. Limpou-se a ponta da seringa com gaze para remover a umidade da saliva, colocou-se a agulha de injeção de gás na seringa, e ajustou-se o êmbolo para 0,5 ml. Injetam-se os gases coletados na porta de entrada do aparelho com um movimento único (Figura 3).

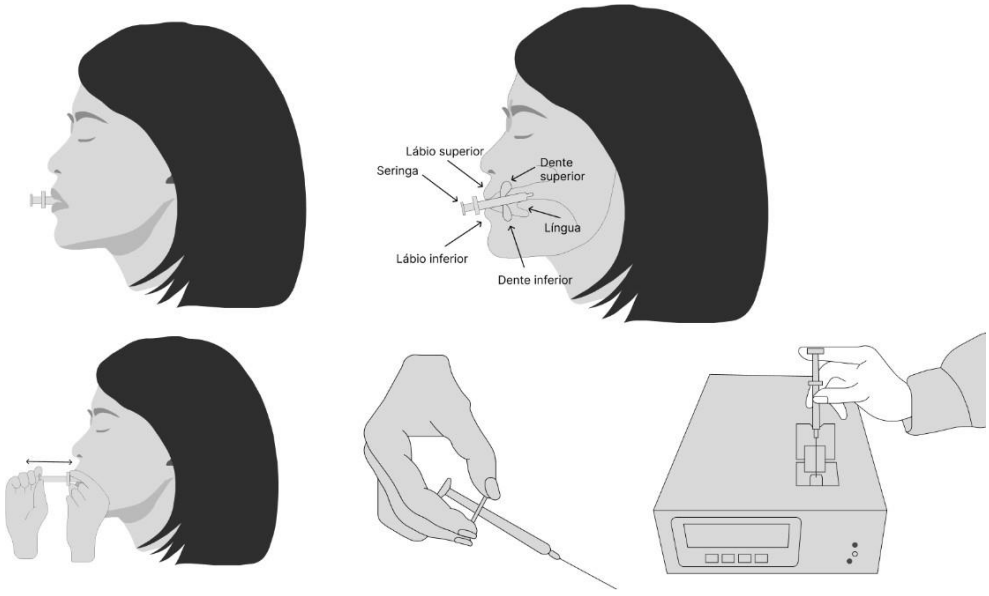


Figura 3: Processo de realização da halimetria.

Da análise dos VSCs 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 VSCs) 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, poderão 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 foi apenas com água. O processo de halimetria com o OralChroma^{TM} foi realizado antes, imediatamente após os tratamentos, 7 dias, 14 dias e 30 dias após a coleta inicial, a depender dos grupos. No Grupo 1 (raspador) e no Grupo 2 (aPDT), os aferimentos foram feitos nos tempos inicial, imediatamente após, 7 dias e 30 dias, para controle. No Grupo 3 (probióticos), os tempos inicial, 7 dias, 14 dias e 30 dias foram realizados. Nesse grupo, não era possível realizar o tempo “imediatamente após”, uma vez que o participante tinha que começar a ingestão dos probióticos. Consequentemente, o tempo de 14 dias para controle foi adicionado, pois o participante ingeria as cápsulas durante 14 dias. No Grupo 4 (aPDT + probióticos), todos os tempos foram realizados (inicial, imediatamente após, 7 dias, 14 dias e 30 dias após).

5.7.2 Análise Microbiológica

Após descongelamento, as amostras foram submetidas ao vórtex por um minuto. Para extração do DNA bacteriano, foi utilizado o Kit Puro Master DNA Extraction (Epicentre Tecnologies, Chigago, Illinois, USA). Para iniciar a extração, 100µL de cada amostra diluída em TE foi utilizada. Foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4ºC por 10 minutos. Na sequência, foi preparado o MIX (300µl TCL + 2 µl Prot K para cada amostra). Foi retirado o sobrenadante com pipeta e sobrarão 25µl de volume + o pellet formado. Vórtex por 10s para ressuspender o pellet. Foram adicionados 300 µl de MIX em cada amostra e vortex por 10s. Foi incubado a 65ºC por 15 min e vortex a cada 5 min. As amostras foram colocadas no gelo por 5 min. Foi adicionado 150 µl de MPC (protein precipitation reagente) às amostras e vórtex 10 segundos. Foi centrifugado a 12.000 rpm a 4ºC por 10 minutos. Após centrifugar, 400 µl do sobrenadante foram colocados no tubo novo. Adiciona-se 500 µl de isopropanol ao sobrenadante e inverte-se 40x. Centrifuga-se a 10.000 rpm a 4ºC por 10 minutos. As amostras foram tiradas da centrifuga e deixadas no gelo, para não soltar o pellet. Retira-se o sobrenadante

vertendo os tubos. Lava-se 200 µl de etanol 70% cuidadosamente para não desalojar o pellet. Centrifuga-se a 10.000 rpm a 4 ºC por 3 minutos. Todo etanol residual foi removido. 200 µl de etanol 70% é lavado cuidadosamente para não desalojar o pellet. Centrifuga-se a 10.000 rpm a 4 ºC por 3 minutos. Remove-se todo etanol residual. Deixa-se 30min invertidos secando. Elui-se em 20 µl de TE. Congelamos a -20. O DNA purificado foi ressuspenso em tampão TE. Foram analisados os níveis de *P. gingivalis, T. forsythia e T. denticola*, por PCR quantitativo. A análise quantitativa foi realizada por meio de PCR em tempo real utilizando termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e os produtos detectados por fluorescência usando o Quantimix Easy SYG Kit (Biotools, Madri, Espanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a reação foram utilizados 10 µl de SYBR Green, 0,5 µl DNA molde, 200 mM de cada iniciador (*P.gingivalis* CATAGATATCACGAGGAACTCCGA TT e AAACTGTTAGCAACTACCGATGTGG; *T.forsythia* GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT e ACCCATCCGCAACCAATAAA; *T. denticola* CGTTCCTGGGCCTTGTACA e TAGCGACTTCAGGTACCCTCG; Universal para bactéria CCATGAAGTCGGAATCGCTAG e GCTTGACGGGCGGTGT) em volume total de 20 µl. Como controle negativo foi adicionada água milliQ estéril ao invés de DNA molde. As reações para 16S rRNA foram realizadas com desnaturação inicial de 95 oC por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de 94 oC por 30 segundos, 55 oC por 1 minuto e 72 oC por 2 minutos e extensão final a 72 oC por 10 minutos. A fluorescência foi detectada após cada ciclo e representada em um gráfico utilizando o software Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para garantir a especificidade dos produtos detectados por fluorescência e evitar a detecção de dímeros de iniciadores, a detecção foi realizada um grau abaixo da temperatura de dissociação dos amplicons. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e cada diluição dos plasmídeos para a curva padrão em triplicata [25]. Nas amostras coletas dos participantes, a técnica descrita por Ye et al. [26] para análise microbiológica também foi utilizada. O microbioma e as variações entre as comunidades foram analisados por meio de métodos de pirosquenciamento e metagenômica do gene 16S rRNA. O kit de DNA de solo E.Z.N.A.® (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA) foi usado para extrair DNA microbiano. Um

espectrofotômetro UV-vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) foi usado para determinar a concentração e purificação final do DNA. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

As regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA da bactéria foram amplificadas com os iniciadores 338F (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3 ′) e 806R (5 ′ GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3 ′) usando o sistema termociclador, USA 9700 (Gene). Para as reações de PCR, foram realizadas as seguintes etapas: três minutos de desnaturação a 95°C, 27 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s de anelamento a 55°C, 45 s de alongamento a 72°C e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas em triplicata utilizando uma alíquota de 20 µl da mistura, contendo 4 µl de 5 × FastPfu Buffer, 2 µl de 2,5 mM dNTPs, 0,8 µl de cada primer (5 µM), 0,4 µl de FastPfu Polimerase, e 10 ng de DNA modelo. O kit AxyPrep DNA Gel Extraction (Axygen Biosciences, Union City, CA, EUA) foi usado para extrair e purificar os produtos de PCR resultantes do gel de agarose 2%. A quantificação posterior foi realizada usando QuantiFluor™-ST (Promega, EUA). Os amplicons purificados foram agrupados em quantidades equimolares e o sequenciamento emparelhado (2 × 300) foi realizado na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, EUA), de acordo com os protocolos padrão fornecidos pela Majorbio Bio-Pharm Technology Co. Ltd. (Xangai, China). Os arquivos de processamento de dados de sequenciamento fastq brutos foram demultiplexados, filtrados para qualidade pelo Trimmomatic e mesclados usando o software FLASH. A taxonomia operacional foi agrupada com corte de similaridade de 97% usando UPARSE (versão 7.1, http://drive5.com/uparse/), e sequências quiméricas foram identificadas e removidas usando UCHIME (versão 4.1). A taxonomia de cada sequência do gene 16S rRNA foi analisada com o algoritmo RDP Classifier (http://rdp.cme.msu.edu/) contra as bases de dados Silva (SSU123) e 16S rRNA. Os dados foram então analisados na plataforma online gratuita Majorbio I-Sanger Cloud (www.i-sanger.com). Sequências representativas foram atribuídas desde o filo até o nível de espécie. O índice alfa (α) de Shannon foi usado para avaliar a riqueza e diversidade bacteriana da língua entre as amostras. Os diagramas de Venn foram implementados pelo Diagrama de Venn (versão 1.6.20). A análise de diversidade beta foi realizada utilizando as matrizes de distâncias ponderadas UniFrac e Bray-Curtis para comparar os resultados da

análise de coordenação principal (PCoA). O pacote de ecologia da comunidade R-forge (pacote Vegan 2.0) foi usado para gerar as figuras PCoA e o mapa de calor, e realizar a análise de redundância (RDA) com permutações de Monte Carlo (permu = 999). O fator de inflação de variância (VIF) foi medido para avaliar a colinearidade entre os vários fatores ambientais (valores de concentração de gás VSC). Fatores ambientais com VIF>10 foram removidos após a análise de correlação de Spearman. Este mesmo estudo [27] também mostrou que os gêneros *Prevotella, Alloprevotella, Leptotrichia, Peptostreptococcus* e *Stomatobaculum* exibiram percentuais relativos significativamente maiores em amostras de halitose, quando comparados a amostras saudáveis. Como resultado, esperamos que esses sejam os principais tipos de bactérias a serem encontrados.

5.7.3 Avaliação por PCRq

Coleta microbiológica e armazenamento

No terço posterior da língua foram coletadas amostras de saburra lingual com auxílio de swab estéril e depositadas em tubos para centrifugação de 1,5mL contendo Tris – EDTA buffer (10mM Tris – HCL, o,1mM EDTA, pH7,5) identificados e armazenados à -80 ºC. Após descongelamento, as amostras foram submetidas ao vórtex por um minuto.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit Master Pure DNA Extraction Kit (Epicentre Technologies Corp., Chicago, IL, USA) conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspenso em tampão TE.

Detecção e quantificação de bactérias por PCR em tempo real

Como controle para determinar a proporção das espécies analisadas, foram utilizadas uma curva padrão contendo como DNA molde 10 a 10^8 cópias do gene analisado (*16S rRNA*), utilizando-se clone de *Escherichia coli* albergando plasmídeos PCR 2.1 TOPO TA® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA) com o inserto dos genes 16S rRNA amplificado a partir do DNA de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* que fazem parte do acervo do laboratório de Microbiologia Oral da Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer do instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os níveis de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsytia* nas amostras de saburra lingual foram determinados por PCR quantitativo em tempo real (q-PCR) utilizando o termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e os produtos detectados por fluorescência utilizando o Power Syber Green® (Life Technologies, NY, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando pares de iniciadores espécie-específicos para cada bactéria (gene *16SrRNA*) descritos na Tabela 2 e as reações para a amplificação do gene gene *16SrRNA* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a obtenção dos *amplicons* para o preparo da curva padrão e utilização nas reações de qPCR.

Primer	Sequencias	Referência
P. gingivalis -F	5'-TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC-3	Amano et al., 1999
P. gingivalis -R	5'-ACGTCATCCCCACCTTCCTC-3'	
T. denticola -F	5' CGTTCCTGGGCCTTGTACA 3'	Teixeira et al 2009
T. denticola -R	5' TAGCGACTTCAGGTACCCTCG 3'	
T. forsythia	5' GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT 3'	Shelburne et al, 2000
T. forsythia	5'ACCCATCCGCAACCAATAAA 3'	

Tabela 3. Ciclos utilizados para a reação de qPCR por espécie analisada

Bacteria	ciclos
P. gingivalis	95ºC/10min, 40 ciclos a 95ºC/15s, 60ºC/1min, 83ºC/10s, 95ºC/15s, 70ºC/1 min e 95ºC/15s.
T. denticola	95ºC/10min, 40 ciclos a 95ºC/15s, 60ºC/1min, 83ºC/10seg, 95ºC/15s, 60ºC/1 min e 95ºC/15s
T. forsythia	95ºC/10min, 40 ciclos a 95ºC/15s, 60ºC/1min, 74ºC/10seg 95ºC/15s, 60ºC/1 min e 95ºC/15s

As amostras e cada diluição dos plasmídeos para a curva padrão foram analisadas em triplicata. O número de células de *P. gingivalis* foram calculados assumindo as 4 cópias do gene*16S rRNA* presentes em seu cromossomo [25]. Enquanto Td e Tf foram calculados assumindo 2 cópias do gene*16S rRNA* presentes em seu cromossomo.

5.7.4 Microbioma

Todo o sequenciamento, obtenção dos dados brutos e análises foram realizados pelo laboratório ByMyCell. A extração do DNA foi realizada utilizando o *Kit DNeasy PowerSoil Pro* (Qiagen®). Os fragmentos resultantes foram submetidos ao sequenciamento da região V3-V4 do gene 16SrRNA na plataforma Nanopore. Após o processamento de *reads* e remoção de chimeras restaram em média 10.500 *reads* por amostra. Após a filtragem, os *reads* foram classificadas taxonomicamente, utilizando o banco de dados SILVA 123 e obteve-se a classificação de 414 gêneros e 901 espécies.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos foram analisados quanto à sua normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilks. Como os dados apresentaram ausência de normalidade, foram tratados utilizado o teste de Kruskal-Wallis ANOVA (medidas independentes) e Friedman ANOVA (medidas dependentes) seguidos dos testes post-hoc adequados, quando necessário. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0.05$

PCRq: A análise por PCRq foi realizada em todos os pacientes analisados. Após a verificação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado o *Kruskal-Wallis rank sum test* com pós teste de *Dunn*.

Microbioma: Para a análise estatística foram considerados os grupos da Tabela 4. Para estudar abundância foi utilizado o Teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn* (Software *Rstudio* 2022.07.0 Build 548© 2009-2022 *RStudio*, PBC. Os pacotes utilizados foram dbplyr, rstatix, ggplot2.

Grupo_microbioma	Amostra	Grupo_pesquisa
Halitose	1A	1
RASP_D	1D	1
RASP_7	1_(7)	1
Halitose	28A	2
PDT_D	28D	2
PDT_7	28_(7)	2
Halitose	35A	3
PROB_7	35_(7)	3
PROB_14	35_(14)	3
Halitose	39A	3
PROB_7	39_(7)	3
PROB_14	39_(14)	3
Halitose	6A	4
PDT_D	6D	4
PDT+PROB_7	6_(7)	4
PDT+PROB_14	6_(14)	4
Halitose	18A	4

PDT_D	18D	4
PDT+PROB_7	18_(7)	4
PDT+PROB_14	18_(14)	4

6. RESULTADOS

6.1 Estudo 1/ A1 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247096

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

Motta, P. D. B., Motta, L. J., Costa da Mota, A. C., Leal Goncalves, M. L., Silva, T., Momolli, M.,... & Bussadori, S. K. (2021). Comparative study between photodynamic therapy with urucum+ Led and probiotics in halitosis reduction–protocol for a controlled clinical trial. *Plos one*, *16*(5), e0247096.

6.2 Estudo 2/A2 **https://doi.org/10.3390/s22020469**

O estudo 2 trata-se de uma revisão sistemática de ensaios clínicos publicados, conforme a referência abaixo:

Motta, P. D. B., Motta, L. J., Campos, T. M., Goncalves, M. L. L., Santos, E. M., Martimbianco, A. L. C., ... & Bussadori, S. K. (2022). Effect of photodynamic therapy on halitosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Sensors*, *22*(2), 469.

6.3 Estudo 3/A1 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297351

O estudo 3 trata-se de um ensaio clínico controlado publicado, conforme a referência abaixo:

Motta, P. D. B., Gonçalves, M. L. L., Gallo, J. M. A. S., Sobral, A. P. T., Motta, L. J., Mayer, M. P. A., ... & Kalil Bussadori, S. (2024). Short term effect of antimicrobial photodynamic therapy and probiotic L. salivarius WB21 on halitosis: A controlled and randomized clinical trial. *Plos one*, *19*(7), e0297351.

6.3.1 Resultados clínicos

A Tabela 5 mostra os dados de gênero, idade e Índice de Saburra Lingual dos sujeitos da pesquisa.

Tabela 5: dados demográficos dos sujeitos da pesquisa.

	Raspador (n=13)	aPDT (n=13)	Probióticos (n=13)	aPDT + Probiótico (n=13)
Homens	1 (8%)	3(23%)	3 (15%)	3 (23%)
Mulheres	12 (92%)	10 (77%)	11 (85%)	10 (77%)
Idade (anos ±DP)	21,0 ± 1,1	21,3 ± 1,9	21.3 ± 1,9	21.3 ± 1.7
Saburra ±DP	25 % ± 14%	32% ± 17%	48% ± 19%	42% ± 19%

A análise entre-grupos foi feita para cada tempo estudado individualmente. No tempo inicial, foi observada ausência de diferença significante entre os grupos estudados (p = 0.0706, Kruskal-Wallis ANOVA), indicando que os grupos estavam bem balanceados em relação à condição inicial. A análise dos demais tempos após os tratamentos, tão pouco foi observada diferença significante entre os grupos estudados (p = 0.9581, p = 0.6187 e p = 0.9635 para os tempos “imediatamente”, “7 dias” e “30 dias”, respectivamente. Kruskal-Wallis ANOVA).

A análise do grupo “Raspador” mostrou que o tempo “imediatamente após” difere

significantemente de todos os demais tempos (p = 0.0006, Friedman), conforme pode ser observado na Figura 4.

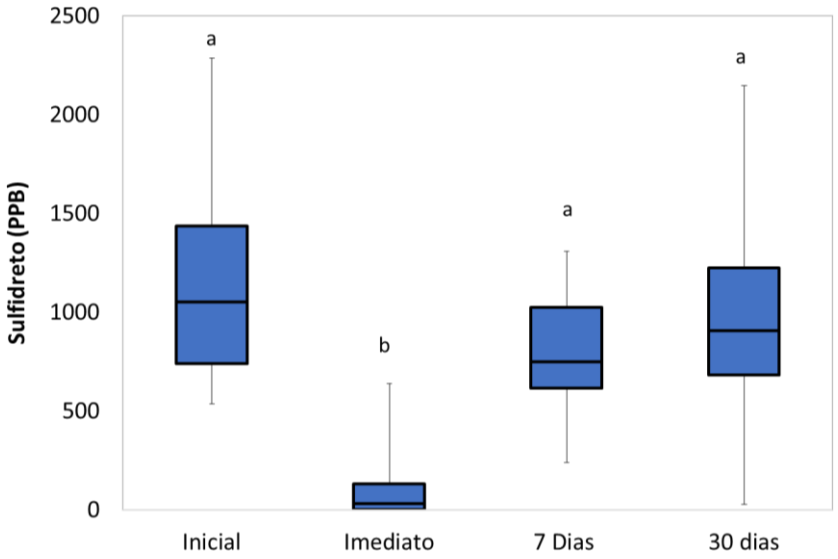


Figura 4: Análise de sulfidreto para o grupo “Raspador”. Letras diferentes significam diferença significante.

A análise do grupo “aPDT” mostrou que o tempo “imediatamente após” difere significantemente de todos os demais tempos (p = 0.0008, Friedman), conforme pode ser observado na Figura 5..

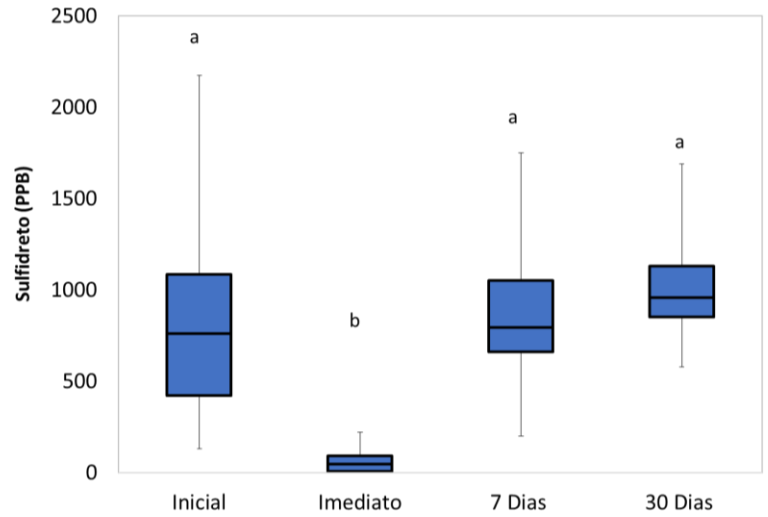


Figura 5: Análise de sulfidreto para o grupo “aPDT”. Letras diferentes significam

diferença significante.

A análise do grupo “Probiótico” mostrou ausência de diferença significante nos tempos estudados (p = 0.7530, Friedman), conforme pode ser observado na Figura 6.

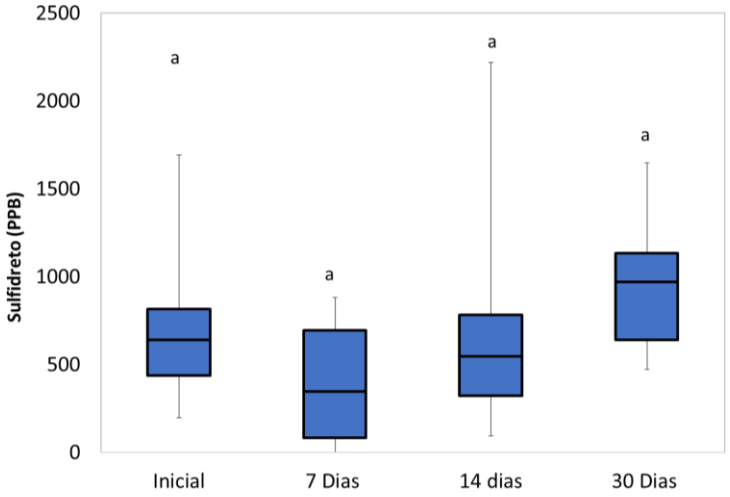


Figura 6: Análise de sulfidreto para o grupo “Probiótico”. Letras diferentes significam diferença significante.

A análise do grupo “PDT + Probiótico” mostrou que o tempo “imediatamente após” difere significantemente do tempo “30 dias” (p = 0.0008, Friedman), conforme pode ser observado na Figura 7.

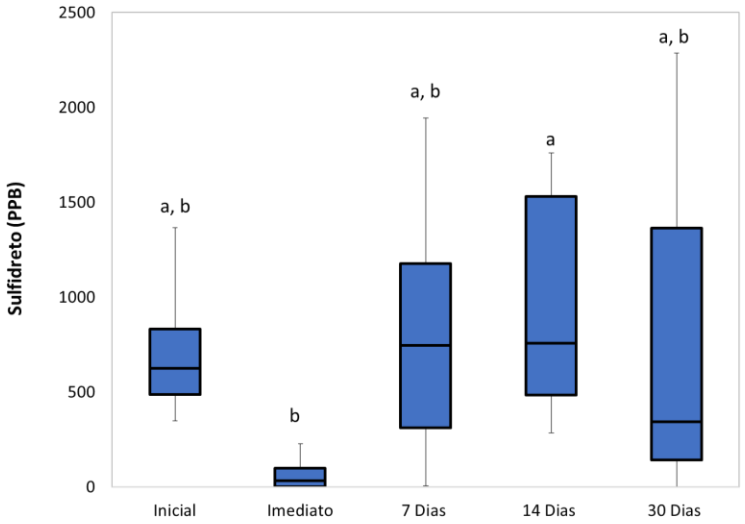


Figura 7: análise de sulfidreto para o grupo “aPDT + Probiótico”. Letras

diferentes significam diferença significante.

6.4 Estudo 4/A2 https://doi.org/10.3390/healthcare12111123

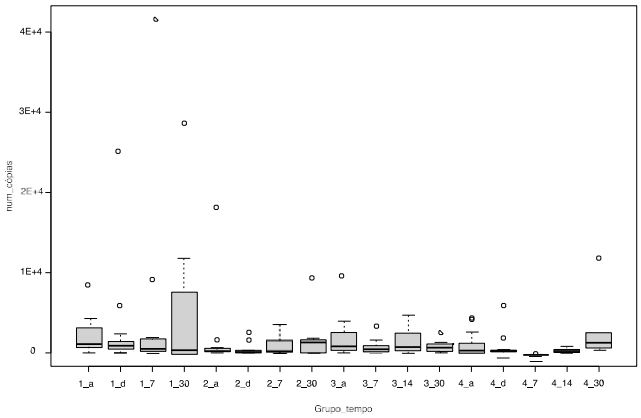
O estudo 4 trata-se de um estudo piloto, conforme a referência abaixo:

de Barros Motta, P., Gonçalves, M. L. L., Gallo, J. M. A. S., Sobral, A. P. T., Motta, L. J., Santos, E. M., ... & Bussadori, S. K. (2024, May). Evaluation of the Oral Microbiome before and after Treatments for Halitosis with Photodynamic Therapy and Probiotics—Pilot Study. In *Healthcare* (Vol. 12, No. 11, p. 1123). MDPI.

6.4.1 Resultados microbiológicos

Primeiramente, apresentaremos os dados das análises por PCRq para as bactérias *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Figuras 8, 9, 10). Os resultados da análise quantitativa de cada uma das bactérias foram representados por suas médias e erros padrão.

Figura 8 - Na figura abaixo foram representados os grupos em cada período proposto para *Porphyromonas gingivalis.*

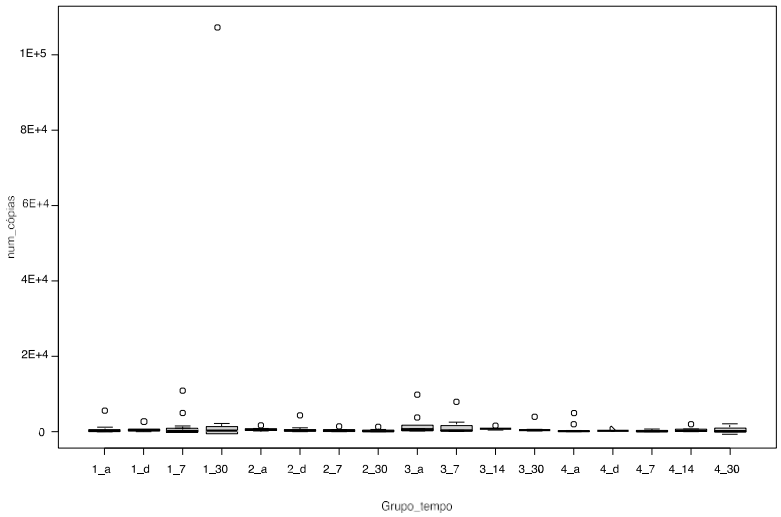


Grupo 1 - Raspador (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 2 - aPDT (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 3 - probióticos (a-inicial, 7 e 30 dias após), Grupo 4 - aPDT + probióticos (a-inicial,

d- imediatamente após, 7, 14 e 30 dias após).

No domínio do tempo observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa (p>0.05) para nenhum dos grupos estudados para a bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Logo, as diferenças observadas são devidas às flutuações aleatórias inerentes ao experimento (p > 0.05*, Kruskal-Wallis*).

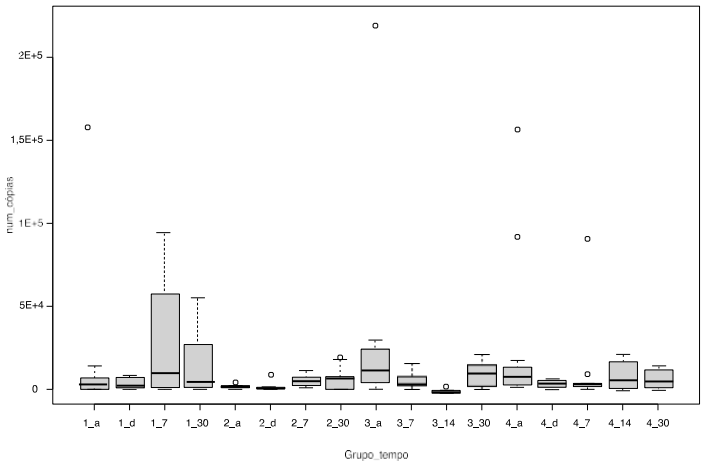
Figura 9 - Na figura abaixo foram representados os grupos em cada período proposto para *Tannerella forsythia.*



Grupo 1 - Raspador (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 2 - aPDT (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 3 - probióticos (a-inicial, 7 e 30 dias após), Grupo 4 - aPDT + probióticos (a-inicial, d- imediatamente após, 7, 14 e 30 dias após).

Para a bactéria *Tannerella forsythia*, também não foi observada diferença entre os grupos nos tempos analisados (p > 0.05, *Kruskal-Wallis*). No domínio do tempo também se observou que não houve diferença estatisticamente significativa (p > 0.05, *Kruskal-Wallis*) para nenhum dos grupos estudados.

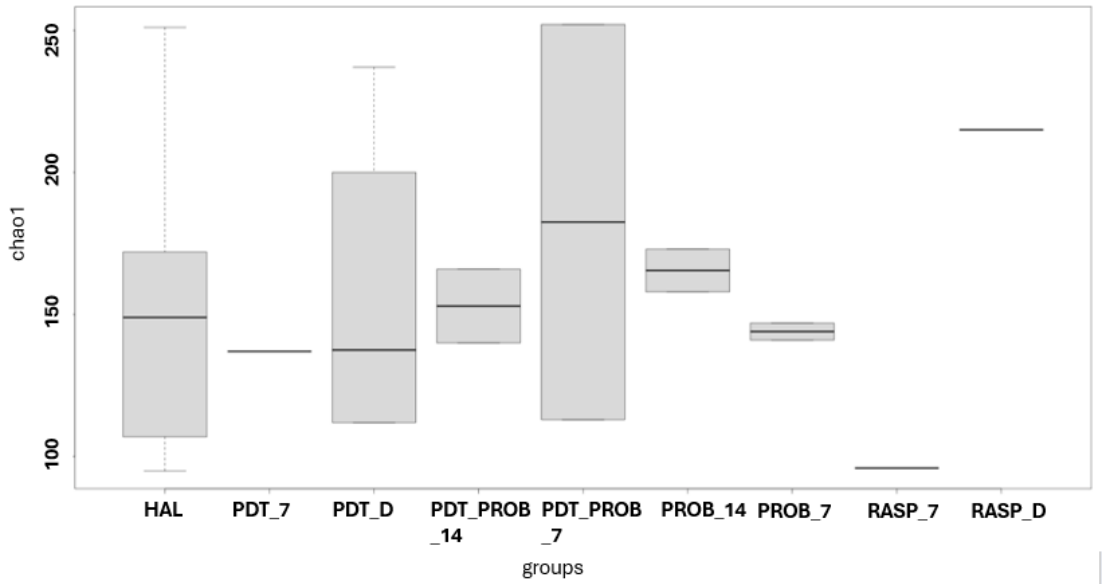
Figura 10 - Na figura abaixo foram representados os grupos em cada período proposto para *Treponema denticola.*



Grupo 1 - Raspador (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 2 - aPDT (a-inicial, d- imediatamente após, 7 e 30 dias após), Grupo 3 - probióticos (a-inicial, 7 e 30 dias após), Grupo 4 - aPDT + probióticos (a-inicial, d- imediatamente após, 7, 14 e 30 dias após).

Quanto à análise do microbioma da saburra lingual, foi realizada a análise de alfa diversidade. Pode-se observar que não houve diferença entre os grupos pela análise de *Chao1, Shannon e Simpson.*

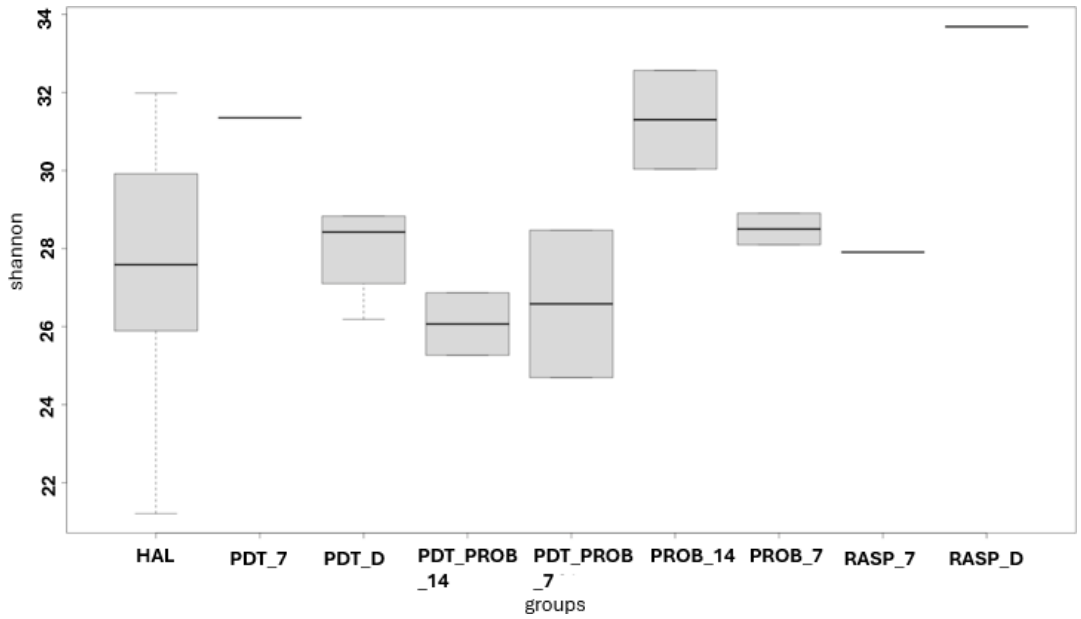
Figura 11: Comparação entre tempos dos grupos analisados para verificação da alfa diversidade.



RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT, PROB - Grupo probióticos,

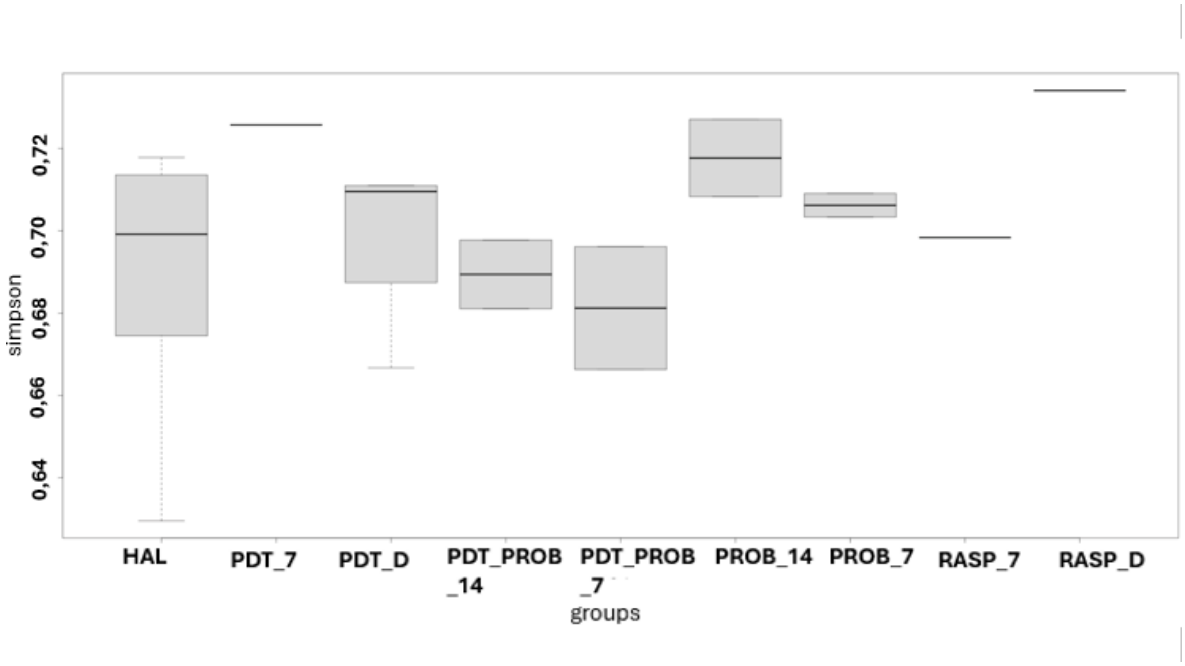
PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

Figura 12: Comparação entre tempos dos grupos analisados para verificação da alfa diversidade.



RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT, PROB - Grupo probióticos, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

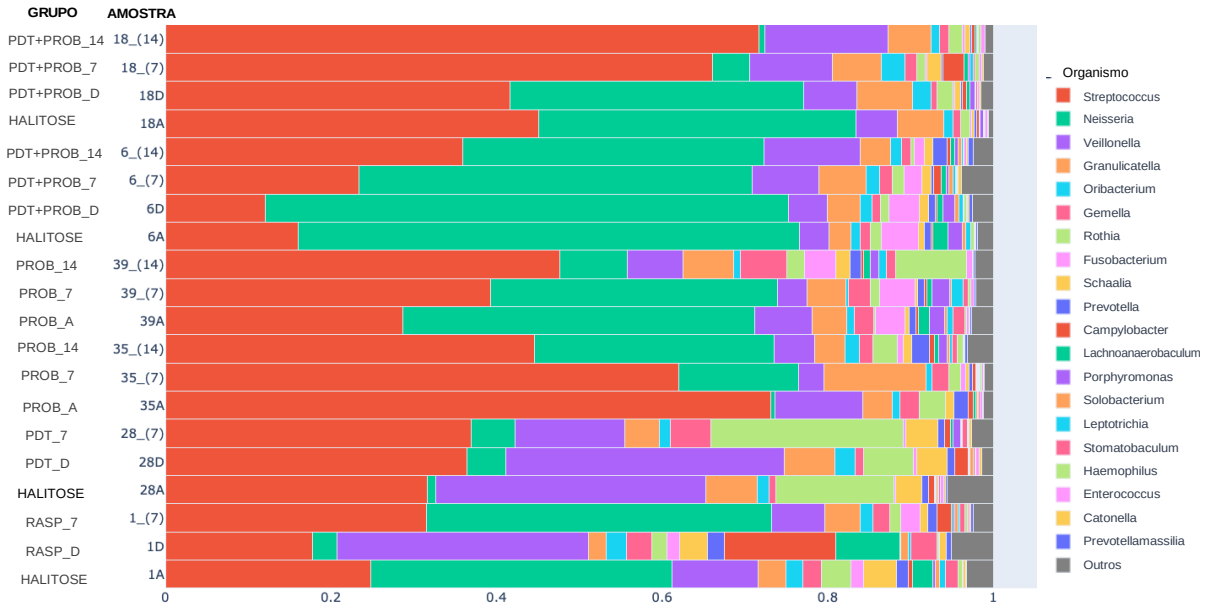
Figura 13: Comparação entre tempos dos grupos analisados para verificação da alfa diversidade.



RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT, PROB - Grupo probióticos, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

Quanto à análise de abundância relativa quanto aos gêneros encontrados foi observada diferença somente para o gênero *Pseudarthrobacter* ($p<0.05$) entre o Grupo 2 e o Grupo 3 aos 14 dias. Na Figura 7 podemos verificar os 20 gêneros mais abundantes presentes nas amostras analisadas.

Figura 14 - Diagrama mostrando a abundância relativa dos 20 gêneros mais abundantes presentes nas amostras analisadas.



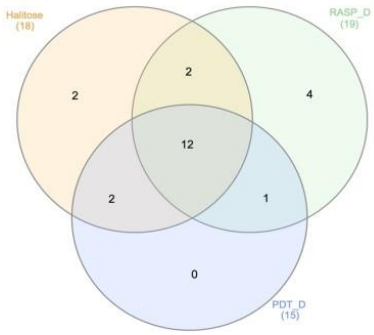
Abundância Relativa

RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT, PROB - Grupo probióticos, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: A - antes de iniciar o tratamento, D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que 12 gêneros foram comuns entre os grupos Halitose, Raspagem e aPDT

Figura 15 - Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% nos grupos controles.

RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT

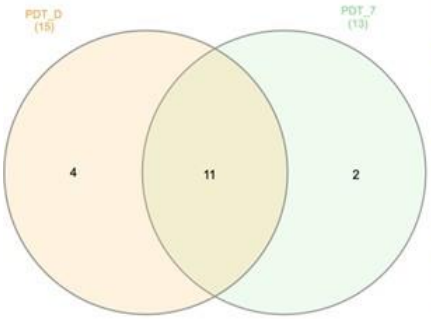


[Halitose]:	[Halitose]+[Rasp_D]:	[[Halitose]+[Rasp_D]+[PDT_D]:	[Rasp_D]:	[Rasp_D]+[PDT_D]:	[Halitose]+[PDT_D]:	[PDT_D]:
Haemophilus	Stomatobaculum	Streptococcus	Catonella	Solobacterium	Porphyromonas	
Enterococcus	Actinomyces	Neisseria			Leptotrichia	
		Veillonella				
		Granulicatella	Prevotella massalia			
		Oribacterium				
		Gemella	Megasphaera			
		Rothia				
		Fusobacterium				
		Schaalia				
		Prevotella				
		Campylobacter				
		Lachnoanaerobaculum				

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve diminuição da quantidade de gêneros encontrados na comparação dos tempos imediatamente

após o tratamento e 7 dias.

Figura 16 - Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% nos grupos em que foi realizada a aPDT.

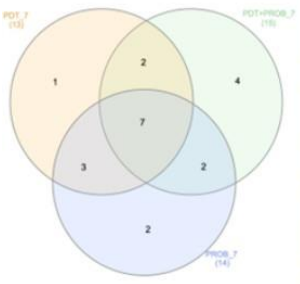


[PDT_D]:	[PDT_D]+[PDT_7]:	[PDT_7]:
Fusobacterium	Streptococcus	Stomatobaculum
Lachnoanaerbaculum	Neisseria Veillonella	Actinomyces
Solobacterium	Granulicatella	
Leptotrichia	Oribacterium	
	Gemella	
	Rothia	
	Schaalia	
	Prevotella	
	Campylobacter	
	Porphyromonas	

PDT -Grupo aPDT, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: A - antes de iniciar o tratamento, D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve similaridade de 7 gêneros encontrados aos 7 dias

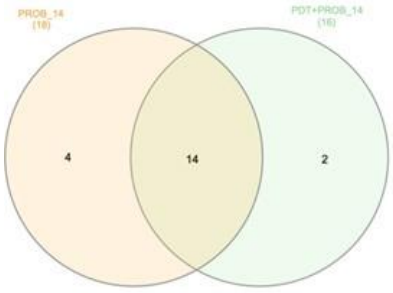
Figura 17 - Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% aos 7 dias.



[PDT_7]:	[PDT_7]+[PDT+Prob_7]:	[PDT_7]+[Prob_7]:	[PDT_7]+[PDT+Prob_7]+[Prob_7]:	[PDT+Prob_7]:	[PDT+Prob_7]+[Prob_7]:	[Prob_7]:
Actinomyces	Schaalia	Prevotella	Streptococcus	Solobacterium	Fusobacterium	Leptotrichia
	Campylobacter	Porphyromonas		Haemophilus	Lachnoanaerbaculum	Capnocytophaga
		Stomatobaculum				
			Neisseria	Peptostreptococcus		
			Veillonella	Eubacterium		
			Granulicatella			
			Oribacterium			
			Gemella			
			Rothia			

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve similaridade de 14 gêneros encontrados aos 14 dias

Figura 18 - Diagrama de Venn para os gêneros mais abundantes que 1% aos 14 dias.



[Prob_14]:	[Prob_14]+[PDT+Prob_14]:	[PDT+Prob_14]:
Porphyromonas	Streptococcus	Prevotella massilia
Leptotrichia	Neisseria Veillonella	Peptostreptococcus
Stomatobaculum	Granulicatella	
Haemophilus	Oribacterium	
	Gemella	
	Rothia	
	Schaalia	
	Prevotella	
	Campylobacter	
	Lachnoanaerbaculum	
	Enterococcus	
	Megasphaera	

Abundância relativa (espécies)

Com relação a abundância relativa entre as espécies presentes nas amostras, de um modo geral, podemos dizer que não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$, Teste *Kruskal-Wallis*). A figura abaixo mostra a abundância relativa das 20 espécies mais abundantes presente nas amostras analisadas.

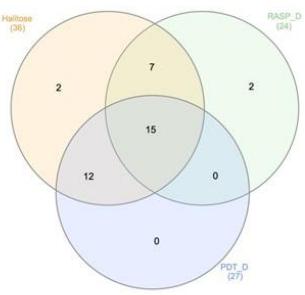
Figura 19 - Diagrama mostrando a abundância relativa das 20 espécies mais abundantes presentes nas amostras analisadas.



RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT, PROB - Grupo probióticos, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: A - antes de iniciar o tratamento, D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

Figura 20 - Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% nos grupos controles.

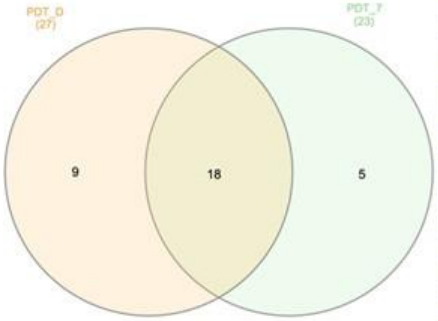
Control_venn_esp						
[Hal]:	[Rasp_D]:	[PDT_D]:	[Hal]+[PDT_D]	[Hal]+[Rasp_D]	[Rasp_D]+[PDT_D]	[Hal]+[Rasp_D]+[PDT_D]
Prevotella_ aurantiaca	Gemella_ haemolysans		S. australis	Veillonella_ dispar		Neisseria_perflava
			S. koreensis			S. salviarius
Clostridium_ saccharolyticum	Megasphaera_ micronuciformis		S. vestibularis	Stomatobaculum longum		S. oralis
			S. rubneri			Veillonella_parvula
			Neisseria_subflava	Veillonella infantium		Granulicatella_adiacens
			Neisseria_cinera			S. mitis
			Prophyromonas_pasteri	Lachnoanaerobaculum saburreum		Granulicatella_elegans
			Fusobacterium_ nucleatum			Rothia_mucilaginosa
				Veillonella rogosae		Gemella_sanguinis
			Neisseria_mucosa			Schaalia_odontolytica
			Neisseria_sicca	Lachnoanaerobaculum orale		Oribacterium asaccharolyticum
			Prevotella_histicola			Veillonella_tobetsuensis
			S. infantis			Fusobacterium_periodont
						Campylobacter_concisus
						Oribacterium_sinus



RASP - Grupo Raspador, PDT -Grupo aPDT

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve diminuição da quantidade de espécies encontradas na comparação dos tempos imediatamente após o tratamento com aPDT e 7 dias.

Figura 21 - Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% nos grupos em que foi realizada a aPDT.



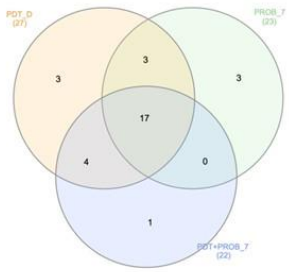
[PDT_D]:	[PDT_7]:	[PDT_D]+[PDT_7]:
Streptococcus_vestibularis	Veillonella_dispar	Neisseria_perflava
Neisseria_subflava	Stomatobaculum_longum	Streptococcus_salivarius
Fusobacterium_periodonticum	Streptococcus_cristatus	Streptococcus_oralis
Neisseria_cinerea	Streptococcus_sanguinis	Veillonella_parvula
Fusobacterium_nucleatum	Actinomyces_graevenitzii	Granulicatella_adjacens
Oribacterium_sinus		Streptococcus_mitis
Neisseria_mucosa		Granulicatela_elegans
Neisseria_sicca		Rothia_mucilaginosa
Prevotella_histicola		Gemella_sanguinis
		Streptococcus_australis
		Schaalia_odontolytica
		Oribacterium_asaccharolyticum
		Veillonella_tobetsuensis
		Streptococcus_rubneri
		Campylobacter_concisus
		Porphyromonas_pasteri
		Streptococcus_infantis

PDT -Grupo aPDT, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: A - antes de iniciar o tratamento, D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias, 14 -14 dias.

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve similaridade de 17 espécies encontrados aos 7 dias

Figura 22 - Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% aos 7 dias.

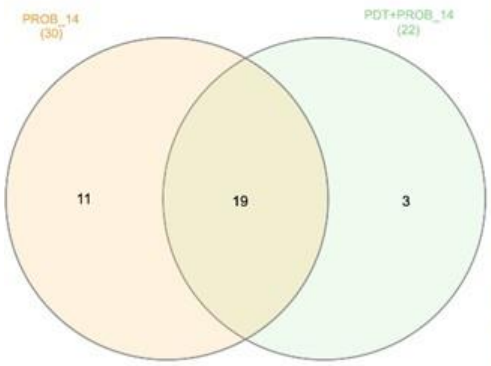
[PDT_D]:	[PDT_D]+[Prob_7]	[PDT_D]+[Prob_7] +[PDT+Prob_7]:	[Prob_7]:	[PDT+Prob_7]:	[PDT_D]+[PDT+Prob_7]:	[Prob_7]+ [PDT+Prob_7]:
Oribacterium_ sinus	Veillonella_ tobetsuensis	Neisseria_perflava	Stomatobaculum longum	Veillonella_dispar	Schaalia_ odontolytica	
Prevotella_ histicola	S. rubneri	S. salivarius			Oribacterium asaccharolyticum	
		S. oralis				
S. infantis	Porphyromonas_ pasteri	Veillonella_parvula	S. cristatus			
		Granulicatella_adiacens			Campylobacter_ concisus	
		S. mitis	S. sanguinis		Neisseria_ mucosa	
		Granulicatella_elegans				
		Rothia_mucilaginosa				
		Gemella_sanguinis				
		S. australis				
		S. koreensis				
		S. vestibularis				
		Neisseria_subflava				
		Fusobacterium_periodonticum				
		Neisseria_cinera				
		Fusobacterium_nucleatum				
		Neisseria_sicca				



PDT -Grupo aPDT, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: D- imediatamente após o tratamento, 7 -7 dias.

No diagrama de Venn abaixo podemos observar que houve similaridade de 19 espécies encontradas aos 14 dias

Figura 23 - Diagrama de Venn para as espécies mais abundantes que 1% aos 14 dias.

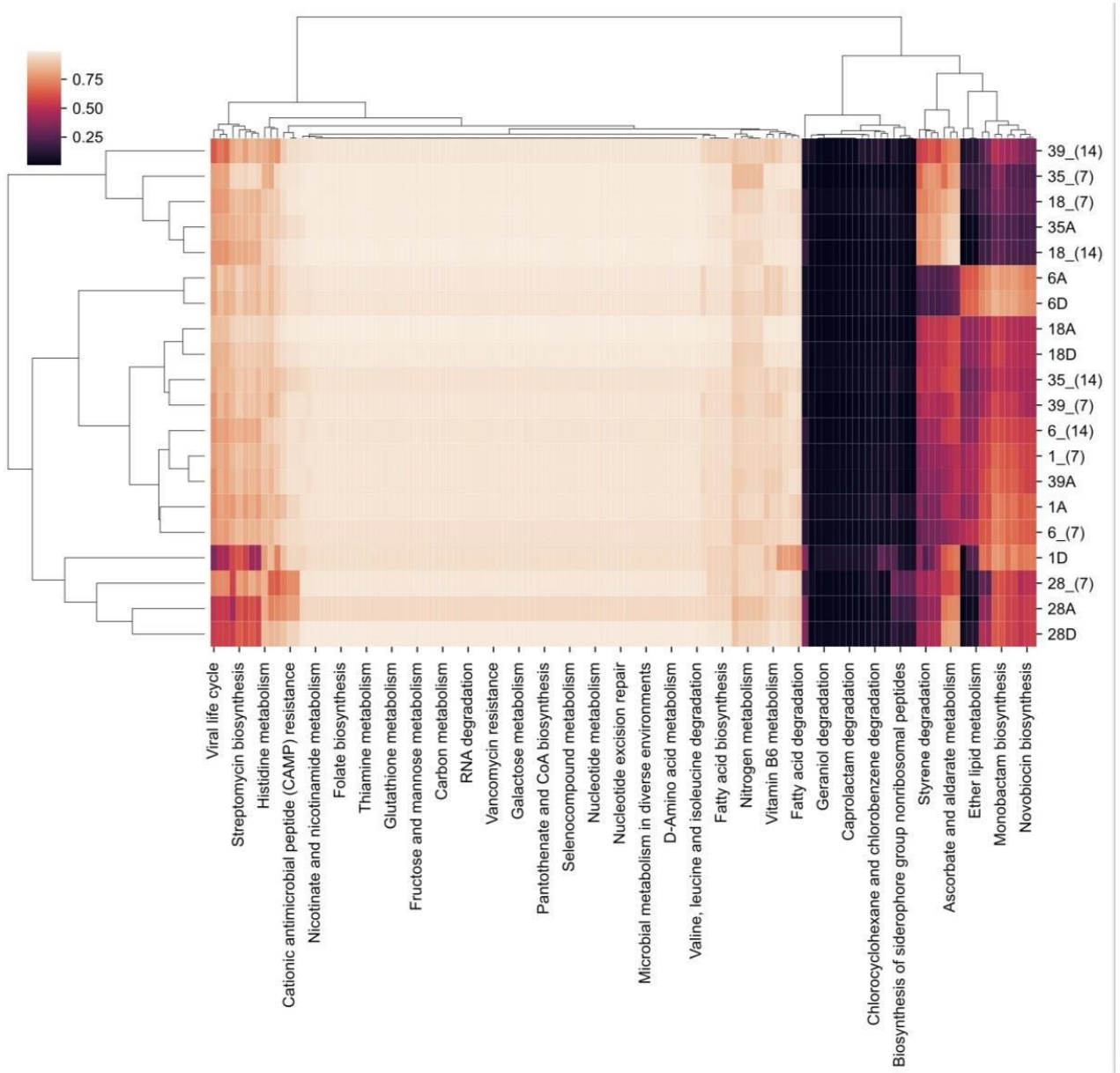


[Prob_14]:	[Prob_14]+[PDT+Prob_14]:	[PDT+Prob_14]:
Fusobacterium_periodonticum	Neisseria_perflava	Neisseria_mucosa
Porphyromonas_pasteri	Streptococcus_salivarius	Neisseria_sicca
Veillonella_dispar	Streptococcus_oralis	Streptococcus_sanguinis
Oribacterium_sinus	Veillonella_parvula	
Stomatobaculum_longum	Granulicatella_adjacens	
Streptococcus_cristatus	Streptococcus_mitis	
Veillonella_infantium	Granulicatela_elegans	
Gemella_haemolysans	Rothia_mucilaginosa	
Veillonella_rogosae	Gemella_sanguinis	
Megasphaera_micronuciformis	Streptococcus_australis	
Prevotella_histicola	Schaalia_odontolytica	
	Oribacterium_asaccharolyticum	
	Streptococcus_koreensis	
	Veillonella_tobetsuensis	
	Streptococcus_vestibularis	
	Streptococcus_rubneri	
	Neisseria_subflava	
	Neisseria_cinerea	
	Fusobacterium_nucleatum	

PDT -Grupo aPDT, PDT+PROB - Grupo aPDT + probióticos. Tempos analisados: D- imediatamente após o tratamento, 14 -14 dias

Quanto à predição do metabolismo podemos observar que não houve diferença entre os grupos analisados ($p<0,05$).

Figura 24 - O desenho esquemático mostra a predição do metabolismo entre os grupos e tempos analisados.



7. DISCUSSÃO

A halitose é considerada um importante fator social, pois interfere nas relações interpessoais. Além de gerar preocupações relacionadas à saúde física do indivíduo pode provocar alterações psicológicas, conduzindo a uma barreira social [18].

Há uma escassez de estudos que avaliem a redução da halitose por meio da terapia fotodinâmica e do uso de probióticos, apresentando o urucum como fotossensibilizador e o LED como uma fonte de luz mais acessível aos dentistas. Embora o azul de metileno combinado com o laser vermelho já tenha sido

utilizado com essa finalidade, este estudo irá 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.

O uso de probióticos na odontologia apresenta um tratamento inovador, capaz de modificar a microbiota oral, principalmente no que diz respeito à halitose, já que a microbiota oral é complexa sendo um grande desafio no desenvolvimento de protocolos de prevenção e tratamento da doença [19].

A microbiota oral consiste em 50 a 100 bilhões de bactérias (HOMD: Human Oral Microbiome Database, 2020) [32]. Em 1963, Socransky et al. [33] sugeriram que apenas 50% da microbiota da cavidade oral havia sido cultivada [33, 34]. Hoje já se sabe, que as técnicas moleculares são mais adequadas para testar e avaliar o microbioma da cavidade oral (HOMD: Human Oral Microbiome Database, 2020) [32] sendo PCRq e o sequenciamento do *amplicon 16S rRNA* as mais utilizadas [35-39].

Em um passado recente, as bactérias mais estudadas em pacientes com halitose eram as Gram negativas *Fusobacterium nucleatum, Porphryomonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* [39-45]. Por esse motivo, um dos nossos objetivos foi quantificar essas bactérias no dorso da língua. Entretanto, na análise quantitativa por PCRq, observou-se que não houve diferença ($p>0.05$) para nenhum dos grupos analisados ao longo do tempo.

Com a finalidade de se obter uma visão geral da microbiota da língua em um nível ecológico, trabalhos mais recentes têm realizado o sequenciamento do *amplicon 16S rRNA*. Estes trabalhos têm demonstrado que há prevalência de muitas outras espécies no desenvolvimento da halitose [35, 36, 46, 47]. Parece claro que uma comunidade bacteriana é responsável pela manutenção da halitose, permanecendo um desafio o seu tratamento. Em uma revisão publicada [36] os autores mostraram que os gêneros mais prevalentes na halitose intraoral foram *Aggregatibacter, Capnocytophaga, Campylobacter, Clostridiales, Dialister, Leptotrichia, Prevotella, Peptostreptococcus, Peptococcus, Parvimonas, Selenomonas, Treponema* e *Tannerella*. Outros autores encontraram

Streptococcus, Veillonella, Gemella, Granulicatella, Neisseria, Haemophilus, Selenomonas, Fusobacterium, Leptotrichia, Prevotella, Porphyromonas e Lachnoanaerobaculum [46]. Outro estudo [26] demonstrou que os gêneros *Prevotella, Alloprevotella, Leptotrichia, Peptostreptococcus e Stomatobaculum* exibiram percentuais relativos maiores em amostras de halitose, quando comparados às amostras saudáveis. Em nosso trabalho os gêneros mais abundantes foram *Streptococcus, Neisseria, Veillonella, Granulicatella, Oribacterium, Gemella, Rothia, Fusobacterium, Schaalia, Prevotella, Campylobacter, Lanchnoanaerobaculum, Porphyromonas, Solobacterium, Leptotrichia, Stomatobaculum, Haemophilus, Enterococcus e Prevotellamassilia. Portanto, esses resultados corroboram com outros autores quanto aos gêneros: Campylobacter* [36], *Leptotrichia* [26, 36], *Prevotella* [26, 36, 46] *Streptococcus, Neisseria, Veillonella, Granulicatella Fusobacterium, Lanchnoanaerobaculum, Porphyromonas Haemophilus e Gemella,* [36, 46].

Quanto às espécies, as mais prevalentes foram *Neisseria perflava, Streptococcus salivarius, Streptococcus oralis, Veillonella parvula, Granulicatella adiacens, Streptococcus mitis, Granulicatella elegans, Rothia micilaginosa, Gemella sanguis, Streptococcus australis, Schaalia odontolytica, Oribacterium, asaccharolyticum, Streptococcus koreensis, Veilonella tobetsuensis, Streptococcus vestibulares, Streptococcus sublava, Fusobacterium periodonticum, campylobacter concisus e Neisseria cirerea.* Pode-se perceber que corroboram com outros estudos quanto às espécies *Streptococcus mitis,* [48, 49] *Fusobacterium periodonticum* [39]*, Streptococcus oralis,* [49] *Streptococcus salivarius,* [49]*, Granulicatella elegans* [50]*.*

Nesse estudo foi possível observar redução imediata da halitose com os tratamentos de aPDT e raspador lingual, esses resultados corroboram com todos os estudos do grupo que realizaram aPDT para tratamento da halitose.

Uma série de casos foi publicada pelo grupo, onde avaliaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em adolescentes com halitose. Foi possível concluir que a aPDT foi eficiente na redução de compostos sulfurosos voláteis, portanto a equipe decidiu conduzir novos estudos sobre o tema. [51]

Em 2016, a equipe realizou um estudo clínico controlado e randomizado, em que selecionaram 45 adolescentes de 13 a 18 anos, diagnosticados com halitose

através de cromatografia gasosa, divididos em 3 grupos (grupo 1=aPDT, grupo 2=raspador e grupo3=aPDT e raspador). Os resultados mostraram que aPDT se mostrou como um tratamento alternativo eficaz na redução imediata da halitose. [52]

Os pesquisadores conduziram um estudo clínico controlado em 2016 para avaliar a efetividade da aPDT com e sem raspador lingual em adolescentes diagnosticados pela cromatografia gasosa e análise microbiológica por contagem de unidades formadoras de colônia. Observou-se que a administração de terapia fotodinâmica no dorso da língua teve um resultado imediato, diminuindo a halitose através de uma redução na concentração de H2S. Conclui-se que a aPDT constitui um tratamento alternativo ao uso de raspadores de língua e não agride as papilas, e reduz a carga bacteriana nos casos. Além disso, a análise microbiológica demonstrou um aumento da carga bacteriana no grupo de adolescentes submetidos apenas a raspador de língua, enquanto a carga bacteriana foi reduzida na grupo submetido apenas à aPDT [14].

Em 2017, a equipe avaliou o efeito da terapia fotodinâmica para redução de halitose em pacientes com esclerose múltipla, onde puderam observar que os pacientes com esclerose parecem ter maior prevalência de halitose do que o grupo controle. A aPDT foi eficaz na redução imediata da halitose [53].

A equipe avaliou em 2020, a redução da haliose por meio da terapia fotodinâmica utilizando LED azul e urucum como fotossensibilizador e observaram que houve redução imediata da halitose [19].

Em 2021, a equipe estudou o controle da halitose com LED vermelho e azul de metileno em 45 jovens diagnosticados com halitose e encontraram uma redução imediata da halitose [54].

Os pesquisadores conduziram uma revisão sistemática em 2022, em que avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica na redução da halitose e concluiram que esse trartamento é eficaz na redução da halitose quando utilizado isoladamente ou combinado com outro tratamento [29].

Além da aPDT, a associação dessa com os probióticos se apresenta como um tratamento promissor em longo prazo, pois após 30 dias do tratamento, apesar de não haver diferença significante, a recolonização foi menor e mais lenta.

8. CONCLUSÃO

O aumento do conhecimento da microbiota da cavidade oral e principalmente do biofilme da língua é essencial para desenvolver novas estratégias no tratamento da halitose. Portanto, levando-se e conta as limitações desse estudo, pode-se concluir que o tratamento com aPDT ou probiótico nessas condições experimentais não foram capazes de alterar a microbiota na saburra lingual de pacientes com halitose. Porém o tratamento com aPDT utilizando o urucum como fotossensibilizador e o led azul como fonte de luz, apresentou redução imediata nos níveis de sulfidreto, assim como o raspador lingual, devendo ser considerado como um tratamento eficaz na redução da halitose. Contudo, fazem-se necessários novos estudos para se estabelecer a frequência de aplicação do protocolo, bem como a associação com outras cepas de probióticos e diferentes formas de administração desses.

9. REFERÊNCIAS

1- Armstrong BL, Sensat ML, Stoltenberg JL. Halitosis: a review of current literature. American Dental Hygienists' Association. 2010;84(2):65-74.

2- Calil CM, Marcondes FK. Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds. Life Science. 2006;79(7):660–4.

3- Springfield J, et al. Spontaneous fluctuations in the concentrations of oral sulfurcontaining gases. J Dental Res. 2001;80(5):1441–4.

4- Tangerman A, Winkel EG. The portable gas chromatograph
   a. OralchromaTM: a method of choice to detect oral and extra-oral halitosis. J Breath Res. 2008;2(1)..

5- Tolentino EDS, Chinellato LEM, Tarzia O. Saliva and tongue coating pH before and after use of mouthwashes and relationship with parameters of halitosis. J Appl Oral Sci. 2011;19(2):90-4.

6- Porter SR, Scully C. Oral malodour (halitosis). Bmj. 2006;333(7569):632-35

7- Kara C, et al. Effect of Nd: YAG laser irradiation on the treatment of oral malodour associated with chronic periodontitis. Int Dent J. 2008;58:151-8.

8- Kara C, Tezel A, Orbak R. Effect of oral hygiene instruction and scaling on oral malodour in a population of Turkish children with gingival inflammation. Int J Paediatr Dent. 2006;16(6):399-404.

9- Bicak DA. A current approach to halitosis and oral malodor-A mini review. The open dentistry jornal. 2018;12:322.

10- Suzuki N et al. Induction and Inhibition of Oral Malodor. Molecular Oral Microbiology, 2019.

11- Scully C, Greenman J. Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). Oral diseases. 2012;18(4):333-45.

12- Da Giarcia ACC, et al. Action of antimicrobial photodynamic therapy with red leds in microorganisms related to halitose. Medicine. 2019;98(1).

13- Kellesarian SV, et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy and laser alone as adjunct to mechanical debridement in the management of halitosis: A systematic review. Quintessence International. 2017;48(7).

14- Costa da Motta AC, et al. Effect of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents–a controlled, microbiological, clinical trial. Journal of biophotonics. 2016;9(11-12):1337-43.

15- Yoo J, et al. The Effect of Probiotics on Halitosis: a Systematic Review and Meta-analysis. Probiotics and antimicrobial proteins. 2019;11:150-7.

16- Hope CK, Wilson M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006;57(6):1227-30.

17- Salminem S, et al. Demonstration of safety of probiotics—a review. International journal of food microbiology. 1998;44(1-2):93-106

18- Elias MS, Ferriani MGC. Aspectos históricos e sociais da halitose. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 2006;14(5).

19- Gonçalves MLL, da Mota ACC, Deana AM, de Souza Cavalcante LA, Horliana ACRT, Pavani C, ... & Bussadori SK. Antimicrobial photodynamic therapy with Bixa orellana extract and blue LED in the reduction of halitosis—A randomized, controlled clinical trial. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020;*30*:101751.

20- Mahasneh S, Mahasneh A. Probiotics: a promising role in dental health. Dentistry jornal. 2017;5(4):26.

21- Huang N, Li J, Qiao X, Wu Y, Liu Y, Wu C, Li L. Efficacy of probiotics in the management of halitosis: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 2022 Dec 20;12(12):e060753

22- Chiarelli, Marcelo et al. Avaliação da eficacia da tecnica de escovação de Bass e da técnica de escovação de fones em relação a quantidade de microorganismos na saliva, índice de placas (IPL) e índice de sangramento gengival (ISG). 1998.

23- Van Der Weijden, Fridus A.; SLOT, Dagmar E. Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. Journal of clinical periodontology. 2015;42:S77-S91.

24- Shimizu T, Ueda T, Sakurai K. New method for evaluation of tongue-coating status. Journal of oral rehabilitation. 2007;34(6):442-7.

25- Tanaka M, Yamamoto Y, Kuboniwa M, Nonaka A, Nishida N, Maeda K, Kataoka K, Nagata H, Shizukuishi S. Contribution of periodontal

pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. Microbes Infect. 2004;6:1078–83.

26- Ye W, Zhang Y, He M, Zhu C, Feng X.-P. Relationship of tongue coating microbiome on volatile sulfur compounds in healthy and halitosis adults. J. Breath Res. 2019;14:016005. doi: 10.1088/1752-7163/ab47b4.

27- Haraszthy V.I., Zambon J.J., Sreenivasan P.K., Zambon M.M., Gerber D., Rego R., Parker C. Identification of oral bacterial species associated with halitosis. J. Am. Dent. Assoc. 2007;138:1113–20. doi: 10.14219/jada.archive.2007.0325.

28- Motta PB, Motta LJ, Costa da Mota AC, Leal Goncalves ML, Silva T, Momolli M, ... & Bussadori SK. Comparative study between photodynamic therapy with urucum+ Led and probiotics in halitosis reduction–protocol for a controlled clinical trial. Plos one. 2021;16(5): e0247096.

29- Motta PB, Motta LJ, Campos TM, Goncalves MLL, Santos EM, Martimbianco ALC, ... & Bussadori, S. K. Effect of photodynamic therapy on halitosis: a systematic review of randomized controlled trials. Sensors. 2022;22(2):469.

30- Motta PB, Gonçalves MLL, Gallo JMAS, Sobral APT, Motta LJ, Mayer MPA, ... & Kalil Bussadori, S. Short term effect of antimicrobial photodynamic therapy and probiotic L. salivarius WB21 on halitosis: A controlled and randomized clinical trial. Plos one. 2024;19(7): e0297351.

31- Motta PB, Gonçalves MLL, Gallo JMAS, Sobral APT, Motta LJ, Santos EM, ... & Bussadori SK. Evaluation of the Oral Microbiome before and after Treatments for Halitosis with Photodynamic Therapy and Probiotics—Pilot Study. In Healthcare.MDPI, 2024;12(11):1123.

32- Krishnan K., Chen T., Paster B.J. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. Oral Dis. 2017;23:276–86. doi: 10.1111/odi.12509.

33- Socransky, S. S., Gibbons, R. J., Dale, A. C., Bortnick, L., Rosenthal, E., & Macdonald, J. B. The microbiota of the gingival crevice area of man—I: Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. Archives of oral biology. 1963;8(3):275-80.

34- Ingar Olsen,Dorita Preza,Jørn A. Aas &Bruce J. Paster. Cultivated and not-yet-cultivated bacteria in oral biofilms. Microbial Ecology in Health and Disease. 2009;21(2).

35- Takeshita T., Suzuki N., Nakano Y., Yasui M., Yoneda M., Shimazaki Y., Hirofuji T., Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. Sci. Rep. 2012;2:215. doi: 10.1038/srep00215.

36- Seerangaiyan K., van Winkelhoff A.J., Harmsen H.J.M., Rossen J.W.A., Winkel E.G. The tongue microbiome in healthy subjects and patients with intra-oral halitosis. J. Breath. Res. 2017;11:036010. doi: 10.1088/1752-7163/aa7c24.

37- Bernardi S., Karygianni L., Filippi A., Anderson A.C., Zürcher A., Hellwig E., Vach K., Macchiarelli G., Al-Ahmad A. Combining culture and culture-independent methods reveals new microbial composition of halitosis patients' tongue biofilm. Microbiologyopen. 2020;9:e958. doi: 10.1002/mbo3.958.

38- Yitzhaki S., Reshef L., Gophna U., Rosenberg M., Sterer N. Microbiome associated with denture malodour. J. Breath Res. 2018;12:027103. doi: 10.1088/1752-7163/aa95e0.

39- Persson S., Edlund M.B., Claesson R., Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol. Immunol. 1990;5:195–201. doi: 10.1111/j.1399-302X.1990.tb00645.x

40- Roldán S., Winkel E.G., Herrera D., Sanz M., Van Winkelhoff A.J. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: A dual-centre, double-blind placebo-controlled study. J. Clin. Periodontol. 2003;30:427–434. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.20004.x.

41- Grover H.S., Blaggana A., Jain Y., Saini N. Detection and measurement of oral malodor in chronic periodontitis patients and its correlation with levels of select oral anaerobes in subgingival plaque. Contemp. Clin. Dent. 2015;6:S181–S187. doi: 10.4103/0976-237X.166825.

42- Kamaraj D.R., Bhushan K.S., Laxman V.K., Mathew J. Detection of odoriferous subgingival and tongue microbiota in diabetic and nondiabetic

patients with oral malodor using polymerase chain reaction. Indian J. Dent. Res. 2011;22:260–265. doi: 10.4103/0970-9290.84301.

43- Awano S., Gohara K., Kurihara E., Ansai T., Takehara T. The relationship between the presence of periodontopathogenic bacteria in saliva and halitosis. Int. Dent. J. 2002;52(Suppl. S3):212–216. doi: 10.1002/j.1875-595X.2002.tb00927.x.

44- Tanaka M., Yamamoto Y., Kuboniwa M., Nonaka A., Nishida N., Maeda K., Kataoka K., Nagata H., Shizukuishi S. Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. Microbes Infect. 2004;6:1078–1083.

45- Adedapo A.H., Kolude B., Dada-Adegbola H.O., Lawoyin J.O., Adeola H.A. Targeted polymerase chain reaction-based expression of putative halitogenic bacteria and volatile sulphur compound analysis among halitosis patients at a tertiary hospital in Nigeria. Odontology. 2020;108:450–461. doi: 10.1007/s10266-019-00467-x.

46- Hampelska K, Jaworska MM, Babalska ZŁ, Karpiński TM. The Role of Oral Microbiota in Intra-Oral Halitosis. J Clin Med. 2020 Aug 2;9(8):2484. doi: 10.3390/jcm9082484. PMID: 32748883; PMCID: PMC7465478.

47- Ren W., Zhang Q., Liu X., Zheng S., Ma L., Chen F., Xu T., Xu B. Supragingival Plaque Microbial Community Analysis of Children with Halitosis. J. Microbiol. Biotechnol. 2016;26:2141–2147. doi: 10.4014/jmb.1605.05012.

48- Ademovski S.E., Persson G.R., Winkel E., Tangerman A., Lingström P., Renvert S. The short-term treatment effects on the microbiota at the dorsum of the tongue in intra-oral halitosis patients—A randomized clinical trial. Clin. Oral Investig. 2013;17:463–473. doi: 10.1007/s00784-012-0728-y.

49- Riggio M.P., Lennon A., Rolph H.J., Hodge P.J., Donaldson A., Maxwell A.J., Bagg J. Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. Oral Dis. 2008;14:251–258. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01371.x.

50- Haraszthy V.I., Zambon J.J., Sreenivasan P.K., Zambon M.M., Gerber D., Rego R., Parker C. Identification of oral bacterial species associated with

halitosis. J. Am. Dent. Assoc. 2007;138:1113–1120. doi: 10.14219/jada.archive.2007.0325.

51- Lopes RG, de Santi MESO, Franco BE, Deana AM, Prates RA., França CM, ... & Bussadori SK. Photodynamic therapy as novel treatment for halitosis in adolescents: a case series study. *Journal of lasers in medical sciences*. 2014;*5*(3):146.

52- Lopes RG, da Mota ACC, Soares C, Tarzia O, Deana AM, Prates RA, ... & Bussadori SK. Immediate results of photodynamic therapy for the treatment of halitosis in adolescents: a randomized, controlled, clinical trial. *Lasers in medical Science*. 2016;31:41-7.

53- Gonçalves MLL, Bussadori SK, Fragoso YD, Da Silva VVB, Deana AM, Da Mota ACC, ... & França CM. Effect of photodynamic therapy in the reduction of halitosis in patients with multiple sclerosis: clinical trial. *Journal of breath research*. 2017;11(4): 046006.

54- da Mota ACC, Gonçalves MLL, Horliana ACRT, Deana AM, de Souza Cavalcante LA, Gomes AO, ... & Bussadori SK. Effect of antimicrobial photodynamic therapy with red led and methylene blue on the reduction of halitosis: controlled microbiological clinical trial. *Lasers in Medical Science*.2022;*37*(2):877-86.

10. ANEXOS

10.1 Aprovação do Comitê de Ética

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED E PROBIÓTICOS NA REDUÇÃO DA HALITOSE - ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

Pesquisador: Sandra Kalil Bussadori **Área**

Temática:

Versão: 2

CAAE: 20123519.4.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.669.442

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram extraídas do documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1403207 na data de 08_10_2019.

Halitose é um termo que define qualquer odor ou mau-cheiro proveniente da cavidade oral, que pode apresentar origem local ou sistêmica. Este projeto tem como objetivo verificar se o tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e o tratamento com uso de probióticos são eficazes contra esta. Serão selecionados 52 alunos ou funcionários da UNINOVE, de 18 a 25 anos, com diagnóstico de halitose, apresentando na cromatografia gasosa o sulfidreto (SH2) 112 ppb. Os participantes serão divididos aleatoriamente em 4 grupos de 13, que receberão tratamentos distintos: Grupo 1: tratamento com escovação, fio dental e raspador de lingua; Grupo 2: escovação, fio dental e aPDT aplicada na região de dorso e terço médio da lingua; Grupo 3:escovação fio dental e probióticos; Grupo 4: escovação, fio dental, aPDT e probióticos. Serão comparados os resultados da halimetria antes, imediatamente após o tratamento, sete dias após e trinta dias após o tratamento.

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

Plataforma Brasil

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1403207.pdf	08/10/2019 16:26:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_halitose.docx	08/10/2019 16:25:54	Sandra Kalil Bussadori	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Halitose_Projeto.docx	08/10/2019 16:25:42	Sandra Kalil Bussadori	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/10/2019 16:25:21	Sandra Kalil Bussadori	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 29 de Outubro de 2019

Assinado por:
CHRISTIANE PAVANI
(Coordenador(a))

10.2 Termo de consentimento livre e esclarecido

TCLE - Termo de Consentimento livre e esclarecido para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do participante:_____
Endereço:_____
Telefone para contato:_____ Cidade:_____ CEP:_____ E-mail:_____

1. **Título do Trabalho Experimental:** ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A TERAPIA FOTODINÂMICA COM URUCUM E LED E PROBIÓTICOS NA REDUÇÃO DA HALITOSE - ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO

2. **Objetivo:** Avaliar se o tratamento com LED (uma luz) e um corante (terapia fotodinâmica, e uso de probióticos são eficazes no tratamento do mau hálito.

3. **Justificativa:** A justificativa dessa pesquisa é a busca de uma alternativa para o tratamento convencional, produzindo resultado mais duradouro e mais conforto durante o tratamento.

4. **Procedimentos da Fase Experimental:** O Sr(a) está sendo convidado a receber tratamento para mau hálito, utilizando o LED (uma luz) com um corante para eliminar as bactérias ou tomar probióticos (que são produtos alimentares que contem microrganismos vivos cuja ingestão traz benefícios à saúde), ou o método convencional (raspagem da língua), na clínica da Uninove.

O Sr(a) realizará uma avaliação da presença ou não do mau hálito e poderá participar de um dos quatro grupos dessa pesquisa conforme sorteio.

O grupo 1 fará uma raspagem lingual e receberá orientação de escovação, fio dental. O grupo 2 receberá um tratamento com um spray corante e uma luz azul e também orientação de escovação e fio dental. O grupo 3 receberá o tratamento com probióticos e orientação de escovação e fio dental. E o grupo 4 receberá o tratamento com um spray corante e luz azul e também probióticos, além da orientação de escovação e fio dental.

Antes e após o tratamento, foi realizada a avaliação do mau hálito e a raspagem lingual. O mau hálito foi avaliado novamente depois de 7 dias e 3º dias.

5. **Desconforto ou Riscos Esperados:** Os participantes podem sentir constrangimento em relação ao mau hálito. Os participantes que receberem o tratamento com corante podem apresentar sensibilidade na língua. O probiótico não apresenta risco nem efeito colateral por apresentarem microrganismos que já estão presentes no corpo.

6. **Medidas protetivas aos riscos:** A Equipe estará à disposição caso o participante apresente sensibilidade para remoção imediata do produto. Para evitar constrangimento a avaliação e o tratamento foram realizados em sala reservada com a presença apenas do participante e do pesquisador.
7. **Benefícios da Pesquisa:** Receber tratamento para mau hálito.
8. **Métodos Alternativos Existentes:** Não há.
9. **Retirada do Consentimento:** o participante tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem nenhum prejuízo. Importante ressaltar que no caso de desistir de participar do estudo o sr(a) não terá nenhum prejuízo em relação às suas atividades acadêmicas ou profissionais na universidade.
10. **Garantia do Sigilo:** Os pesquisadores asseguram a privacidade dos participantes quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.
11. **Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa:** Não haverá ressarcimento.
12. **Local da Pesquisa:** A pesquisa foi realizada na Clínica de Odontologia da Uninove, localizada na Rua Vergueiro, 235/249 – 2° subsolo - Liberdade, São Paulo - SP, 01504-001, Telefone: (11) 2633-9000.
13. **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)** é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12 e Res. CNS 510/2016). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos. Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9010 comitedeetica@uninove.br. Horário de atendimento do Comitê de

Ética: segunda-feira a sexta-feira – Das 11h30 às 13h00 e Das 15h30 às 19h00

14. **Nome Completo e telefones dos Pesquisadores para Contato:** Prof. Dra Sandra Kalil Bussadori (011) 98381-7453, e aluna Pamella de Barros Motta- (011) 97397-6458.
15. **Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.**

São Paulo, de de 20__.

16. **Consentimento Pós-Informação:**

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha

participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmo que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

_____

Assinatura do Participante

(Todas as folhas devem ser rubricadas pelo participante da pesquisa)

17. Eu, _____ (Pesquisador do responsável desta pesquisa), certifico que:

a) Considerando que a ética em pesquisa implica o respeito pela dignidade humana e a proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos;

b) Este estudo tem mérito científico e a equipe de profissionais devidamente citados neste termo é treinada, capacitada e competente para executar os procedimentos descritos neste termo;

_____Assinatura

do Pesquisador Responsável

10.3 Artigo 1 publicado

PLOS ONE

REGISTERED REPORT PROTOCOL

Comparative study between photodynamic therapy with urucum + Led and probiotics in halitosis reduction–protocol for a controlled clinical trial

Pamella de Barros Motta[1]*, Lara Jansiski Motta[1], Ana Carolina Costa da Mota[1], Marcela Letícia Leal Gonçalves[1,2], Tamiris Silva[1], Marcos Momolli[1], David Casimiro de Andrade[3], Kristianne Porta Santos Fernandes[1], Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari[1], Alessandro Melo Deana[1], Mark Wainwright[4], Renato Araujo Prates[1], Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana[1], Sandra Kalil Bussadori[1,2]

1 Post Graduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brazil, **2** Dentistry College, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos, SP, Brazil, **3** School of Dentistry, University of Porto, Porto, Portugal, **4** School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, United Kingdom

* pamellabmotta@gmail.com

Check for updates

This is a Registered Report and may have an associated publication; please check the article page on the journal site for any related articles.

OPEN ACCESS

Citation: Motta PdB, Motta LJ, Costa da Mota AC, Leal Gonçalves ML, Silva T, Momolli M, et al. (2021) Comparative study between photodynamic therapy with urucum + Led and probiotics in halitosis reduction–protocol for a controlled clinical trial. PLoS ONE 16(5): e0247096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247096

Editor: Alessandro Loguercio, State University of Ponta Grossa, BRAZIL

Received: April 27, 2020

Accepted: January 31, 2021

Abstract

Background

Halitosis is a term that defines any foul odor emanating from the oral cavity. The origin may be local or systemic. The aim of the proposed protocol is to determine whether treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and treatment with probiotics are effective at eliminating halitosis.

Materials and methods

Eighty-eight patients, from 18 to 25 years old with a diagnosis of halitosis ($H_2S \geq 112$ ppb, determined by gas chromatography) will be randomly allocated to four groups (n = 22) that

10.4 Artigo 2 publicado

sensors

MDPI

Review

Effect of Photodynamic Therapy on Halitosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials

Pamella de Barros Motta [1], Lara Jansiski Motta [1], Thalita Molinos Campos [1], Marcela Leticia Leal Gonçalves [1,2], Elaine Marcílio Santos [2], Ana Luiza Cabrera Martimbianco [2], David José Casimiro de Andrade [3], Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari [1], Kristianne Porta Santos Fernandes [1], Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana [1] and Sandra Kalil Bussadori [1,*]

[1] Postgraduation Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Sao Paulo 01504-001, SP, Brazil; pamellabmotta@gmail.com (P.d.B.M.); larajmotta@terra.com.br (L.J.M.); thalita.molinos@gmail.com (T.M.C.); marcelalleal@hotmail.com (M.L.L.G.); raquel.mesquita@gmail.com (R.A.M.-F.); kristianneporta@gmail.com (K.P.S.F.); annacrth@gmail.com (A.C.R.T.H.)

[2] Postgraduation Program in Health and Environment, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos 11045-002, SP, Brazil; elaine.marcilio@unimes.br (E.M.S.); analuizacabrera@hotmail.com (A.L.C.M.)

[3] School of Dentistry, University of Porto, 4099-002 Porto, Portugal; casimiroandrade@gmail.com

* Correspondence: sandra.skb@gmail.com; Tel.: +55-11-2633-9000

Abstract: Background: This systematic review aimed to assess the effectiveness and safety of aPDT for the treatment of halitosis. Methods: Search strategies were conducted in October 2021 without language or data restrictions, on the following databases: MEDLINE, EMBASE, CENTRAL, LILACS and BBO, as well as a manual search. Randomized clinical trials (RCTs) with parallel design were considered for inclusion, assessing individuals (adolescents and adults) with a clinical diagnosis of halitosis treated with photodynamic therapy (aPDT). Primary outcomes assessed were halitosis measurements, adverse events and quality of life. The risk of bias for each included study was

check for updates

Citation: Motta, P.d.B.; Motta, L.J.; Campos, T.M.; Gonçalves, M.L.L.; Santos, E.M.; Martimbianco, A.L.C.; de Andrade, D.J.C.; Mesquita-Ferrari,

10.5 Artigo 3 publicado

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Short term effect of antimicrobial photodynamic therapy and probiotic *L. salivarius* WB21 on halitosis: A controlled and randomized clinical trial

Pamella de Barros Motta[1], Marcela Leticia Leal Gonçalves[1,2], Juliana Maria Altavista Sagretti Gallo[3], Ana Paula Taboada Sobral[1,2], Lara Jansiski Motta[1], Marcia Pinto Alves Mayer[4], Dione Kawamoto[4], David Casimiro de Andrade[5], Elaine Marcílio Santos[2], Kristianne Porta Santos Fernandes[1], Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari[1], Alessandro Melo Deana[1], Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana[1], Sandra Kalil Bussadori[1,6]*

1 Post Graduation Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil, **2** Post Graduation Program in Health and Environment, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos, SP, Brazil, **3** Post Graduation Program in Veterinary Medicine in The Coastal Environment, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos, SP, Brazil, **4** Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Universidade Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **5** School of Dentistry, University of Porto, Porto, Portugal, **6** Dentistry College, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos, SP, Brazil

* sandra.skb@gmail.com

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Motta PdB, Gonçalves MLL, Gallo JMAS, Sobral APT, Motta LJ, Mayer MPA, et al. (2024) Short term effect of antimicrobial photodynamic

Abstract

10.6 Artigo 4 publicado

healthcare

MDPI

Article

Evaluation of the Oral Microbiome before and after Treatments for Halitosis with Photodynamic Therapy and Probiotics—Pilot Study

Pamella de Barros Motta [1], Marcela Leticia Leal Gonçalves [1,2], Juliana Maria Altavista Sagretti Gallo [3], Ana Paula Taboada Sobral [1,2], Lara Jansiski Motta [1], Elaine Marcílio Santos [2], David José Casimiro de Andrade [4], Cinthya Cosme Gutierrez Duran [1], Kristianne Porta Santos Fernandes [1], Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari [1], Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana [1] and Sandra Kalil Bussadori [1,5,*]

1 Post Graduation Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo 01525-000, SP, Brazil; pamellabmotta@gmail.com (P.d.B.M.); larajmotta@terra.com.br (L.J.M.); cinthya.cgduran@gmail.com (C.C.G.D.); kristianneporta@gmail.com (K.P.S.F.); raquel.mesquita@gmail.com (R.A.M.-F.); annacrth@gmail.com (A.C.R.T.H.)

2 Post Graduation Program in Health and Environment, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos 11045-002, SP, Brazil; marcelalleal@hotmail.com (M.L.L.G.); anapaula@taboada.com.br (A.P.T.S.); elaine.marcilio@unimes.br (E.M.S.)

3 Post Graduation Program in Veterinary Medicine in the Coastal Environment, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos 11045-002, SP, Brazil; jualtavistagallo@gmail.com

4 School of Dentistry, University of Porto, 4099-002 Porto, Portugal; casimiroandrade@gmail.com

5 Dentistry College, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos 11045-002, SP, Brazil

* Correspondence: sandra.skb@gmail.com; Tel.: +55-(11)98381-7453; Fax: +55-(11)3385-9088

check for updates

Citation: de Barros Motta, P.; Gonçalves, M.L.L.; Gallo, J.M.A.S.;

Abstract: Background: To compare photodynamic therapy and the use of probiotics in reducing halitosis assessed through gas chromatography and microbiome analysis. Methods: Participants aged from 18 to 25 years showing sulfide (SH2) ≥ 112 ppb on gas chromatography were selected.