



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Carla Raquel Fontana

**Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em
bactérias periodontopatogênicas em
fase planctônica e em biofilme de
múltiplas espécies**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Orientadora:

Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio

ARARAQUARA
2007



Carla Raquel Fontana

**Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em
bactérias periodontopatogênicas em
fase planctônica e em biofilme de
múltiplas espécies**

ARARAQUARA
2007

Fontana, Carla Raquel

Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies / Carla Raquel Fontana. – Araraquara: [s.n.], 2007.

221 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio

1. Lasers 2. Fotoquimioterapia 3. Biofilmes 4. Bactérias
5. Doenças periodontais 6. Biologia Molecular I. Título.

CARLA RAQUEL FONTANA

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) EM BACTÉRIAS
PERIODONTOPATOGÊNICAS EM FASE PLANCTÔNICA E EM BIOFILME
DE MÚLTIPLAS ESPÉCIES**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

3º Examinador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

4º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

5º Examinador: Prof. Dr Carlos de Paula Eduardo

Araraquara, 09 de fevereiro de 2007

Dados Curriculares

Carla Raquel Fontana

Nascimento: 07 julho de 1976 – Araraquara SP

1996- 2000: Curso de Graduação em Odontologia
Fundação Educacional de Barretos – FEB

2001- 2002: Curso de Especialização em Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2001- 2003: Curso de Pós-Graduação, Nível Mestrado
Instituto de Física de São Carlos - USP
Área Interunidades – Laser em Odontologia

2005- 2006: Programa de Doutorado com Estágio no Exterior
(PDEE-CAPES)
Forsyth Institute – Harvard Dental School Affiliated - Boston MA

Prece Árabe

Deus, não consintas que eu seja o carrasco que sangra as ovelhas,
nem uma ovelha nas mãos dos algozes.

Ajuda-me a dizer sempre a verdade na presença dos fortes,
e jamais dizer mentiras para ganhar os aplausos dos fracos.

Meu Deus!

Se me deres a fortuna, não me tires a felicidade;
se me deres a força, não me tires a sensatez;
se me for dado prosperar,
não permita que eu perca a modéstia,
conservando apenas o orgulho da dignidade.

Ajuda-me a apreciar o outro lado das coisas,
para não enxergar a traição dos adversários,
nem acusá-los com maior severidade do que a mim
mesmo.

Não me deixes ser atingido pela ilusão da glória,
quando bem sucedido
e nem desesperado quando sentir insucesso.

Lembra-me que a experiência de um fracasso
poderá proporcionar um progresso maior.

Ó Deus!

Fazei-me sentir que o perdão é maior índice da força,
e que a vingança é prova de fraqueza.

Se me tirares a fortuna, deixe-me a esperança.
Se me faltar a beleza da saúde,
conforta-me com a graça da fé.

E quando me ferir a ingratidão e a
incompreensão dos meus semelhantes,
cria em minha alma a força da desculpa e do perdão.

E finalmente Senhor,
se eu Te esquecer,
te rogo mesmo assim,
nunca Te esqueças de mim !

(Texto traduzido do árabe por Seme Draibe)

Dedicatórias e Agradecimentos

Dedico este meu trabalho, a Deus e a todos os meus familiares

Em especial:

Ao Cleber, dedico este trabalho, pelo amor incondicional, pela compreensão, pelo carinho, por todo seu apoio, paciência, orientações, correções, explosões e incentivos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Sua inteligência invejável, sua paixão pela ciência, sua competência, determinação, responsabilidade e força de vontade são admiráveis. Mas apesar deste “geninho” ter tantas virtudes profissionais, para mim, o seu maior valor está na imensidão da sua sensibilidade, sua moral, suas atitudes, no seu caráter íntegro, seu espírito de justiça, no seu coração puro.

Agradeço a Deus, pois colocou você no meu caminho.

Hoje, bem mais do que antes, “eu” sou muito mais “nós”.

“...força do sentimento e da afetividade, aspiração do espírito e da vontade - o amor conjugal dirige-se a uma unidade profundamente pessoal, aquela que, para além da união numa só carne, não conduz senão a um só coração...” (Familiaris Consortio F.C. 13).

Meu companheiro leal nas alegrias e dificuldades. Obrigada por me dar força, por conquistar comigo cada etapa e subir degrau por degrau ao meu lado. Reconheço e agradeço toda a sua dedicação e doação.

Ao meu pai, exemplo de determinação, força de vontade e persistência, sempre pronto para tudo e a qualquer hora. Sabe como ninguém começar e recomeçar a vida com um bom humor e vontade inigualável. Esta sua disposição me faz lembrar o mito do pássaro Fênix que fabulosamente ressurgiu das cinzas. Obrigada por nos passar esta força, por acreditar que com dedicação e trabalho tudo é possível, por não desistir nunca, obrigada pelo apoio e incentivo.

À minha mãe, minha alma gêmea, minha eterna e melhor amiga. Meu exemplo de vida, meu maior orgulho ! Sempre ao meu lado, vive comigo todos os meus sonhos, minhas realizações, minhas alegrias e também meus maus momentos. Mãe você me conforta com seu otimismo. Incapaz de fazer críticas, sempre aponta o lado positivo de tudo e de todos. Sempre alegre, verdadeira e com uma psicologia e sabedoria indescritível, me ajudou a ultrapassar os obstáculos da vida. Você sabe conversar, me entender e me orientar. Reconheço e agradeço sua imensa paciência nos meus momentos de explosão, obrigada pelas nossas orações... Obrigada pelos bons exemplos morais, obrigada pelas noites em claro, por suas palavras que acalmam. Obrigada pelo incentivo constante, que minimizava meus medos nos momentos de incerteza. Posso imaginar seu coração “apertadinho” quando dizia: vá, faça, busque... sei que para você seria mais fácil dizer “fique aqui ao meu lado”. Agradeço a Deus, pois me deu uma mãe forte e sensível ao mesmo tempo; corajosa, mas prudente quando necessário. Mãe, não posso te explicar em palavras... tenho muito muito muito orgulho de ter uma mãe tão maravilhosa. Você é especial, você é o meu exemplo de vida, exemplo que pretendo passar para meus filhos.

Ao Paulo, sempre presente, “sempre na torcida”, muito preocupado com as minhas coisas, sempre ajeitando tudo com uma paciência sem igual. Paulo, sei que ter apreendido a ligar o computador e usar o skype para conversarmos, são detalhes de mais uma demonstração do seu enorme carinho. Obrigada por todo este cuidado, por todo este zelo. Obrigada por me incentivar, por acreditar em mim, por entender e me perdoar, obrigada por me ajudar tanto... A realização de mais esta etapa na minha vida, também tem muito da sua dedicação por mim.

À minha eterna “irmãzinha” minha amiga, confidente e conselheira... que me entende, me escuta, me ajuda e está sempre presente para alegrar a minha vida. Inteligentíssima, meu “xodozinho”, meu orgulho !! O assunto pode ser sério ou hilário, ela sempre tem algo genial para dizer....

Minha queridinha, amo muito você.

“Agregando” mais um, com o mesmo bom humor, você e o Dudu fizeram meus dias mais felizes e nestes últimos meses me ajudaram a enfrentar melhor a distância do “maridão” ...

Aos meus irmãos, Ueide e Caio, que apesar da distância, são muito importantes na minha vida, vou amar vocês sempre, independente dos nossos caminhos...

Aos meus avós

Stela Adélia Foschini Fontana, minha queridinha “ Vó Ester ”, admiro sua força, seu alto astral, suas palavras de incentivo, seu bom humor, sempre “mãe de todos”, por mais problemas que tenha passado, está sempre dizendo: “*tá tudo bom !*” Vó, quero chegar onde você chegou com essa força e alegria de viver... Ao meu avô Delcides Fontana, que juntinho com Deus, tenho certeza que está orgulhoso neste momento...

A minha avó Judith Jacob Abi Rached, personificação da alegria, da dança, das artes, um exemplo de mulher independente, determinada. Te agradeço também, por ser responsável pela maravilhosa mãe que tenho.

Ao meu avô José Jorge Abi Rached, que há muitos anos está com Deus, mas os melhores momentos ficam guardados na nossa memória...

À toda minha família, (tios, tias, primos, primas, “agregados”...) do lado de “**lá**” e de “**cá**” : “ **Fontana**”, “ **Abi Rached** ”, “ **lost** ”e “**Mendonça**”, que são muitos....

Ao Sr. João Mendonça, Dona Terezinha, Paula, Renato, Bruno e Bianca por todo carinho, amizade, constante colaboração, compreensão e incentivo. Agradeço a Deus pelo nosso encontro, saibam que vocês possuem um lugar muito especial no meu coração.

À Cida, que depois de tantos anos de convivência, já é “agregada” da família, obrigada por nos amar, independente dos dias de bom ou mau humor.

À Deus, que está sempre ao meu lado todos os instantes me amparando, me guiando, me fortalecendo. Agradeço por todas as infinitas maravilhas que fez e faz na minha vida.

Agradeço à Prof. Dra Rosemary Adriana C. Marcantonio por me convidar para ser sua orientada, por acreditar na minha capacidade. Agradeço ainda, pois mesmo com tantos compromissos por estar na Diretoria desta Universidade, você soube valorizar todos os esforços que fiz para que hoje juntas pudéssemos finalizar esta etapa com a maravilhosa sensação de missão cumprida.

Ao meu orientador no exterior Prof. Dr Nikos N Soukos (Forsyth Institute - Harvard Dental School) por todo incentivo e oportunidades que tem me dado.

Ao Prof. Dr Sigmund S. Socransky (Forsyth Institute), exemplo de humildade e competência. Para mim, um “gigante” na ciência, mas que em pequenos gestos nos ensina também muito sobre a vida. Agradeço pela excelente receptividade em seu laboratório.

Ao Prof Dr. Bruce J. Paster e ao Prof. Dr. Floyd E. Dewhirst, por ter me recebido tão bem em seu curso - Harvard Dental School e pela atenção especial dada durante suas aulas.

Ao Prof. Dr Constantino Costa Boussios pelas análises estatísticas.

Ao Prof Dr Toshi Kawai pela amizade e apoio dado em Boston.

Ao amigo e coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia do departamento de Diagnóstico e Cirurgia Prof.Dr CARLOS ROSSA JUNIOR, meu muito obrigada. E também a todos os outros professores, pelo convívio durante as disciplinas do mestrado e doutorado, pela amizade, pelo apoio e pela oportunidade de freqüentar os cursos: Prof. Dr RICARDO SAMIH GEORGES ABI RACHED, Prof. Dr ELCIO MARCANTONIO JÚNIOR , Prof. Dr JOSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO, Prof. Dr JONI AUGUSTO CIRELLI , Profa. Dra SILVANA REGINA PEREZ ORRICO, Prof. Dr. CARLOS DE PAULA EDUARDO, Profa. Dra ELAINE MARIA SGAVIOLI MASSUCATO, Profa.Dra MIRIAN APARECIDA ONOFRE, Profa.Dra MARISA APARECIDA CABRINI GABRIELLI, Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA, Prof. Dr. LAURIVAL ANTONIO DE LUCA JR., Prof. Dr. JOSÉ VANDERLEI MENANI, Prof. Dr. CARLOS BENATTI NETO, Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO, Prof. Dr. LUÍS CARLOS SPOLIDORIO, Prof. Dr. ARY DOS SANTOS PINTO, Prof. Dr MAURÍCIO TATSUEI SAKIMA, Profa. Dra. MÔNICA DA COSTA SERRA, Prof. Dr SERGIO LUIZ DE SOUZA SALVADOR, Profa. Dra. GLÓRIA, Prof Dr. BENEDICTO EGBERTO C. TOLEDO.

Agradeço ao Prof. Dr Vanderlei Salvador Bagnato do Instituto de Física – USP São Carlos, por ter estimulado ainda mais a minha paixão pela pesquisa. Sua dedicação e amor verdadeiro à ciência são exemplos que nos motivam a continuar buscando um ideal.

Ao Prof. Dr. Rafael Comeli Lia pela paciência, disponibilidade e contribuição dada em outros estudos desenvolvidos durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, do Departamento de Biomecânica Médica e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FM-USP-RP pela contribuição dada em outros estudos.

Ao Prof. Dr David Sotero dos Santos, pelas sugestões e discussões.

Ao Rafael Faeda, Claudinha e a Graciola pelos cortes histológicos referentes a outros estudos desenvolvidos durante o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

Ao Forsyth Institute pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do trabalho experimental.

Agradeço a todos os amigos da turma de mestrado e de doutorado, pelo convívio, pela amizade e por toda ajuda, que são indispensáveis quando se faz pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Em especial a Regina Lúcia, Claudinha, Zezé, “Tia Terê e “Tia Maria do Rosário”

A “Tia Maria do Carmo” (*in memoriam*) pela companhia, amizade e auxílio durante os experimentos no biotério.

Aos funcionários da biblioteca Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Eliane, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres pela correção detalhada, por toda ajuda e atenção.

Aos funcionários do setor de pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Em especial, à Mara pelos muitos e muitos emails trocados, muito obrigada por toda atenção, paciência e competência.

Como não quero me esquecer de ninguém, agradeço a você, que de maneira direta ou indireta colaborou para finalização desta tese.

Sumário

Lista de Figuras	10
Resumo	13
Abstract	14
1 Introdução	15
2 Revisão da Literatura	21
3 Proposição	51
4 Material e Método	52
4.1 Amostras Clínicas.....	52
4.2 Preparação das placas de agar sangue enriquecido	53
4.3 Desenvolvimento do Biofilme.....	54
4.4 Fotossensibilizador.....	55
4.5 Fonte de Luz.....	57
4.6 Grupos Estudados.....	59
4.7 Experimentos em fase planctônica (suspensão).....	60
4.8 Tempo de incubação ou pré-irradiação.....	62
4.9 Experimentos em Biofilme.....	64
4.10 Análise Molecular - <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	65
4.10.1 Preparo das Amostras	65
4.10.2 Pré-hibridização e Hibridização das Membranas.....	68
4.10.3 Detecção dos sinais fluorescentes.....	72
5 Resultado	77
5.1 Cultura Microbiana.....	77
5.1.1 Experimentos em fase planctônica (suspensão).....	77
a. Toxicidade do fotossensibilizador no escuro L-D+.....	80
b. Efeitos da irradiação laser L+D-.....	80
c. Terapia fotodinâmica L+D+.....	81
5.1.2 Experimentos em Biofilme.....	82
a. Toxicidade do fotossensibilizador no escuro L-D+.....	85
b. Efeitos da irradiação laser L+D-.....	85
c. Terapia fotodinâmica L+D+	86
5.2 Análise Molecular - <i>Checkerboard DNA DNA hybridization</i>	90
Análise dos sinais fluorescentes	
5.2.1 Experimentos em fase planctônica - 30 J/cm ²	91
5.2.2 Experimentos em fase planctônica - 60 J/cm ²	97
5.2.3 Experimentos em Biofilme - 30 J/cm ²	105
5.2.4 Experimentos em Biofilme - 60 J/cm ²	110
6 Discussão	118
6.1 Cultura Microbiana	118
6.1.1 Grupo Droga (L-D+) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme.....	121
6.1.2 Grupo Laser (L+D-) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme.....	126
6.1.3 Grupo PDT (L+D+) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme.....	130
6.2 Análise Molecular – <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	136
6.2.1 Análise molecular fase planctônica - 30 J/cm ²	138
6.2.2 Análise molecular fase planctônica - 60 J/cm ²	140
6.2.3 Análise molecular em biofilme - 30 J/cm ²	150
6.2.4 Análise molecular biofilme - 60 J/cm ²	152
7 Conclusão	157
8 Referências	159
9 Apêndice	182

Fontana C.R. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade da de Odontologia UNESP; 2007.

Resumo

Objetivos: Analisar os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando o azul de metileno (A.M.) como fotossensibilizador em microrganismos da placa dental de humanos comparando sua ação em fase de planctônica versus biofilme. **Métodos:** Foram obtidas amostras de placa bacteriana subgengivais de pacientes com periodontite crônica. Suspensões de microrganismos destas amostras foram sensibilizadas com A.M. (12.5 µg/mL) durante 5 minutos seguidos por exposição a luz vermelha de 665 nm com fluência de 30 e 60 J/cm². Além do estudo em suspensão, microrganismos das mesmas amostras foram cultivadas em câmara de anaerobiose para formar o biofilme. Durante 7 dias, em placas de 96 poços contendo agar sangue enriquecido desenvolvemos os biofilme in vitro. Estes biofilmes foram expostos a 25 e 50 µg/ml de A.M. nas mesmas fluências que irradiamos as fases planctônicas. Depois de aplicar a terapia fotodinâmica (PDT), frações de sobrevivência foram calculadas contando as unidades formadoras de colônia (u.f.c.) de cada grupo estudado. A seletividade e eficiência da terapia na identificação molecular dos microrganismos foram realizadas utilizando a técnica "Checkerboard DNA-DNA Hybridization". **Resultados:** Em suspensão, a terapia fotodinâmica produziu 70-80% de redução nas u.f.c. Em biofilme, o efeito da PDT resultou em mais baixas reduções de microrganismos (27-40% redução das u.f.c.) embora a concentração de azul de metileno foi quatro vezes mais alta se compararmos com a utilizada em fase de planctônica. Certos microrganismos mostraram suscetibilidade mais alta a PDT em suspensões e biofilmes. **Conclusões:** Os resultados evidenciam que microrganismos em biofilmes são mais resistentes a PDT que bactérias em fase planctônica (suspensão). O uso da terapia fotodinâmica pode ser um coadjuvante ao tratamento periodontal, mas ajustes nos parâmetros de energia e na droga empregada, devem ainda ser objetivo de outros estudos para que a redução bacteriana seja efetiva também em biofilme.

Palavras-chave: Lasers; fotoquimioterapia; biofilmes; bactérias; doenças periodontais; biologia molecular.

Fontana C.R. Phototargeting of dental plaque bacteria in planktonic phase versus biofilms [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Abstract

Objectives: To compare the photodynamic effects of methylene blue (MB) on human dental plaque microorganisms in planktonic phase versus biofilms. **Methods:** Subgingival plaque samples were obtained from human subjects with chronic periodontitis. Suspensions of plaque microorganisms were sensitized with methylene blue (12.5 µg/ml) for 5 minutes followed by exposure to red light of 665 nm with energy fluences of 30 and 60 J/cm². In addition, microorganisms from the same plaque samples were cultivated anaerobically on blood agar in 96-well plates for 7 days to develop microbial biofilms. These biofilms were exposed to 50 µg/ml MB and the same light fluencies as their planktonic counterparts. After photodynamic therapy (PDT), survival fractions were calculated by counting colony-forming units (CFU). The selectivity of light for certain microorganisms was identified using whole genomic probes in the checkerboard DNA-DNA format. **Results:** In suspension, photodynamic therapy produced 70-80% reduction of CFU. In biofilms, the effect of light resulted in lower reductions of microorganisms (27-40% reduction of CFU) although the concentration of MB was four times higher compared with that in planktonic phase. Certain microorganisms showed higher susceptibility to PDT in both suspensions and biofilms. **Conclusions:** The results show that microorganisms in biofilms are more resistant to PDT than are bacteria in planktonic culture. The use of more appropriate light and drug parameters may further eliminate biofilm bacteria.

Keywords: Lasers; phototherapy; biofilms; bacterias; periodontics; molecular biology.

1 Introdução

As doenças periodontais afetam grande parte da população, sendo uma das causas de perdas dentárias em humanos. As manifestações da doença periodontal inflamatória podem ser genericamente divididas em gengivite e periodontite, dependendo da existência ou não de envolvimento dos tecidos de sustentação dos dentes. Esta doença infecciosa é dependente do resultado da interação de bactérias com diferentes virulências, presentes no biofilme dental, com fatores modificadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro (Socransky, Haffajee¹⁵⁶, 2005). O biofilme dental constitui uma estrutura altamente organizada, na qual espécies microbianas estão unidas umas às outras, inseridas em uma matriz polimérica extracelular por elas mesmas produzida, formando portanto, um sistema altamente protetor para as espécies nele residentes (Costerton et al.³⁰, 1999). A remoção ou alteração da microbiota patogênica deste biofilme é importante para o controle da doença periodontal.

Os novos conhecimentos sobre a especificidade do biofilme dental subgengival e outros eventos etiológicos e patogênicos que têm relação com o processo saúde-doença periodontal, permitiram que a abordagem do mesmo sofresse modificações. Hoje, a doença periodontal é considerada multifatorial, de natureza episódica e sítio-dependente e, portanto, a periodontia atual está muito identificada com o controle do

processo infeccioso (Caffesse et al.²³, 1995; Socransky, Haffajee¹⁵⁵, 2002; Socransky, Haffajee¹⁵⁶, 2005; Socransky, Haffajee¹⁵⁸, 2000, Socransky et al.¹⁶¹, 2004).

Porém, quando consideramos o tratamento da doença periodontal instalada, alternativas terapêuticas podem ser associadas ao tratamento convencional de raspagem e alisamento dental, como por exemplo o uso sistêmico de antibióticos, aplicação tópica, irrigação direta das bolsas periodontais, tiras acrílicas impregnadas por antibióticos, aplicação de metronidazol gel, que são opções também citadas na literatura (Genco⁵³, 1991; Van Winkelhoff et al.¹⁸³, 1996; Hitzig et al.⁷⁶, 1994; Mossman¹²⁴, 1983; Magnusson¹⁰², 1998; Hardy et al.⁶⁹, 1982; Yeung et al.²⁰⁷, 1983; Ade et al.², 1992; Kim et al.⁸⁶, 2002; Lin et al.⁹⁴, 1992).

As avaliações clínicas de alguns destes trabalhos sugerem que se obtém graus de sucesso similares, quando a terapia sistêmica e/ou tratamento convencional são adotados. No entanto, vale ressaltar que os resultados positivos alcançados quando o uso dos antibióticos se faz necessário, ainda apresentam algumas desvantagens. Para se obter os efeitos benéficos com o uso sistêmico da droga, são necessárias altas doses ou períodos prolongados de terapia para que se alcance a concentração suficiente no fluido gengival (Pappas, Walker¹³⁵, 1987; Thomas et al.¹⁷⁵, 2000; Sakellari et al.¹⁴², 2000). Dessa forma, esses fármacos podem causar reações adversas, aumentar a resistência de

algumas bactérias, além de alterar o equilíbrio natural das bactérias existentes no organismo (Slots, Rams¹⁵¹, 1990; Liu et al.⁹⁶, 1999).

Atualmente, muita atenção tem sido dada ao tratamento clínico preventivo dessas doenças, sem contudo haver descuido para os avanços tecnológicos no tratamento clínico curativo. Considerando o crescente interesse dos pesquisadores em buscar alternativas que apresentem nenhum ou pouco efeito colateral, entre outros notamos um crescimento progressivo na utilização dos lasers em periodontia (Soukos et al.¹⁶⁷, 1998). A não indução de resistência bacteriana e a eficácia na redução de periodontopatógenos de alguns lasers de alta potência, como recurso terapêutico ou coadjuvante ao tratamento periodontal, são benefícios citados na literatura (Moritz et al.¹²², 1998, Moritz et al.¹²¹, 1997). Em especial, o efeito bactericida destes lasers na periodontia e na endodontia tem sido descrito por vários autores (Gouw Soares et al.⁵⁸, 2000; Mouhyi et al.¹²⁵, 2000; Romanos et al.¹⁴¹, 2000; Gutknecht et al.⁶⁰, 2004). Até o presente momento, os lasers que mais têm sido estudados e utilizados com benefícios como coadjuvante à terapia periodontal de raspagem e alisamento radicular, são os lasers de alta e média potência, como por exemplo, o Neodímio YAG (Nd:YAG) e mais recentemente os diodos semicondutores (Fontana et al.^{47,48,49}, 2004).

Contudo, a utilização inadequada dos lasers de alta potência pode provocar aumento de temperatura intrapulpar ou no ligamento periodontal, levando a reabsorções ósseas e/ou necrose pulpar quando

excessivos parâmetros de energia são empregados. Além disto, considerando a realidade da odontologia brasileira, o custo ainda relativamente elevado é uma desvantagem dos lasers de alta intensidade que não pode deixar de ser citada. No entanto, a evolução rápida e constante da ciência gera uma série de inovações tecnológicas que resultam em novos equipamentos, para aplicações nas mais diferentes áreas do conhecimento. Acompanhando esta evolução, pode-se encontrar na literatura diversos trabalhos utilizando, especialmente lasers de diodo de média potência, tanto in vitro quanto in vivo, que comprovam a eficácia da técnica de Terapia Fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*). A terapia fotodinâmica tem sido utilizada nas áreas da saúde para o tratamento de doenças oftálmicas, dermatológicas, oncológicas e também como auxiliar em reduções microbianas (Venezio et al.¹⁸⁵, 1985, Soukos et al.¹⁶³, 1997). A base da PDT é a ativação de uma droga (fotossensibilizador) pela luz, que resulta num efeito citotóxico. Este processo dinâmico envolve corantes específicos (fotossensibilizadores) e luz laser ou LEDs com comprimentos de onda apropriados. A vantagem desta nova terapia (PDT) é a diminuição significativa da potência ou intensidade das fontes luminosas empregadas, fato que viabiliza financeiramente o tratamento clínico. O mecanismo de ação da morte microbiana ocorre quando o corante impregnado nestas bactérias absorve a energia luminosa, gerando uma produção de substâncias altamente reativas, que causam danos ao microrganismo ou à célula-alvo. Na

presença de oxigênio, esta ativação resulta em espécies reativas capazes de induzir inviabilidade das células (Brundish et al.¹⁸, 2000; Yamamoto et al.²⁰⁶, 2003; Ahn et al.³, 2004). Na Odontologia, sua utilização é bastante indicada, visto que a terapia fotodinâmica mostra-se mais eficiente em lesões e/ou infecções localizadas de pouca profundidade. Desde que o conceito da terapia fotodinâmica foi introduzido, por volta de 1960, muito tem sido estudado para entender como ocorre esse processo e como aumentar a sua eficácia (Soukos et al.¹⁶⁵, 1996; Lambrechts et al.⁹², 2005). Atualmente, são muitas as aplicações clínicas da PDT. Dentre elas incluem-se a redução bacteriana em canais radiculares, em bolsas periodontais, lesões de cárie e sítios com peri-implantite. (Burns et al.²², 1995; Haas et al.⁶⁴, 1997) Estudos da década de 90 já mostravam que um grande número de bactérias bucais, incluindo as periodontopatogênicas, é susceptível a essa terapia (Cobb et al.²⁷, 1992; Tseng, Liew¹⁷⁶, 1992; White et al.¹⁹⁰, 1993; Bem et al.⁹, 1996; Burne¹⁹, 1998; Gutknecht et al.^{61, 62}, 1996; Gutknecht et al.⁶³, 2000; Hardee et al.⁶⁸, 1994; Moritz et al.^{119,120,121}, 1997; Kato et al.⁸⁴, 1998, Moritz et al.¹²³, 1999; Matereski et al.¹¹¹, 2003; Radvar et al.¹⁴⁰, 1996).

A técnica da PDT pode oferecer diversas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana seria rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de antibióticos e anti-sépticos. Em segundo lugar, como a

morte das bactérias não está ligada à mediação de radicais químicos, o desenvolvimento de resistência seria improvável. Finalmente considerando que o fotossensibilizador e a luz empregada não são bactericidas quando utilizados isoladamente, a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se à região irradiada, evitando a destruição da microbiota em outros locais (Haas et al.⁶⁴, 1997; Tadakuma¹⁷³, 1993; Sigusch et al.¹⁴⁹, 2005).

Assim sendo, a terapia fotodinâmica (PDT) pode ser uma alternativa interessante a antibióticos e anti-sépticos utilizados como métodos de descontaminação bacteriana do tecido dental cariado, do canal radicular e também como coadjuvantes de métodos mecânicos do controle de placa subgengival e supragengival. Acreditamos que o futuro da Periodontia seja buscar alternativas mais eficientes para o tratamento não cirúrgico, que reduzam o tempo operacional e ainda melhorem a qualidade dos resultados finais, minimizando ou eliminando os efeitos colaterais.

Neste aspecto, é grande a nossa expectativa com relação à aplicação da terapia fotodinâmica (PDT) em periodontia, uma vez que este tratamento coadjuvante não causa os efeitos colaterais dos antibióticos sistêmicos ou locais. Portanto, no presente estudo vamos avaliar e comparar o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em fase planctônica (suspensão bacteriana) e em modelo de biofilme obtido a partir de amostras de pacientes com doença periodontal crônica.

2 Revisão da literatura

As infecções bucais caracterizam-se, em sua maioria, por lesões localizadas, relativamente superficiais exacerbadas por microrganismos conhecidos. O tratamento convencional, em particular das doenças periodontais, consiste na remoção mecânica do biofilme dental e conseqüentemente numa redução bacteriana por meio de raspagem e alisamento radicular. Quando se faz necessário, associado ao tratamento mecânico pode-se indicar a administração local ou sistêmica de agentes antimicrobianos e antibióticos (Socransky et al.¹⁵⁵, 2002; Haffajee et al.⁶⁷, 2004). Esses agentes antimicrobianos, assim como as medicações sistêmicas, apresentam efeitos colaterais, toxicidade celular, não seletividade (Feres et al.⁴⁶, 2002). Além disso, o tempo de tratamento pode ser longo e há possibilidade de selecionar microrganismos resistentes. Desta forma, a terapia fotodinâmica (PDT, Photodynamic Therapy), amplamente utilizada na área médica no tratamento de lesões neoplásicas, vem sendo testada como terapia de suporte para reduções bacterianas em canais radiculares, cáries dentinárias e bolsas periodontais.

As primeiras experiências em terapia fotodinâmica, por volta de 1900, foram relatadas por Raab e Von Tappeiner, que estudavam a ação da acridina vermelha em cultura de paramécios, o protozoário causador da malária. Durante os experimentos, estes pesquisadores

verificaram reações não usuais nesta cultura e suspeitaram que as condições de luminosidade do ambiente estariam interferindo em seus resultados. Desta forma, postularam que havia um efeito causado pela transferência de energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. A partir deste fato, que Von Tappeiner denominou de Ação Fotodinâmica, outros experimentos foram realizados com novos fotossensibilizadores. Nos estudos iniciais, os corantes eram estimulados com lâmpadas convencionais, luz não coerente e policromática, para tentar destruir células neoplásicas. Contudo, a exposição à luz branca gerava um aquecimento exacerbado e, muitas vezes, esta tentativa de terapia acabava gerando danos teciduais indesejáveis por causa do efeito térmico. Calzavara-Pinton et al.²⁴ (2005) tentaram estimular a hematoporfirina por exposição ao raio X, mas constataram que não houve sucesso nesta combinação. Atualmente sabe-se que a terapia fotodinâmica (PDT) deve ser feita com uma fonte de luz que seja bem absorvida pelo fotossensibilizador.

Em linhas gerais, esta terapia (PDT) é um processo dinâmico que consiste na utilização de corantes específicos, denominados fotossensibilizadores, que são excitados ao absorver os fótons de uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante. Atualmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias, as fontes de luz que se mostram mais eficientes para a utilização na terapia fotodinâmica são os lasers e

LEDs. Por apresentarem banda espectral estreita, são mais específicos e não causam o aquecimento exacerbado, quando densidades de energia apropriadas são utilizadas. As moléculas ou células fotossensibilizadas pela impregnação do corante, absorvem esta irradiação específica na forma de fótons (processo não térmico), sendo promovidas para o estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental, transferem sua energia ao oxigênio e a outras moléculas, resultando na produção de substâncias altamente reativas e de meia-vida curta, como é o caso do o oxigênio singleto. Ao interagir com os sistemas biológicos, o oxigênio singleto causa danos aos microrganismos, via oxidação irreversível de componentes celulares. (Brundish, Love¹⁸, 2000; Greenbaum et al.⁵⁹, 2000; Yamamoto et al.²⁰⁶, 2003).

Vários autores relatam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular (Chernyak et al.²⁶, 2006; Dolgachev et al.³⁷, 2005; Harris et al.⁷⁰, 2005). Desde que o conceito da terapia fotodinâmica foi introduzido, passando pela era moderna da PDT, que iniciou na década de 60, muito tem sido estudado para entender como ocorre esse processo e como maximizar sua eficácia (Lambrechts et al.⁹², 2005).

É consenso, que os resultados entre a irradiação e as respostas celulares dependem de fatores como comprimento da luz, intensidade do laser, tipo do fotossensibilizador escolhido, tempo de exposição e modo de operação do laser (contínuo, chaveado ou pulsado).

Estes são alguns fatores que podem determinar um efeito fototérmico, fotomecânico, fotoablasivo ou fotoquímico. No entanto, quando falamos em redução bacteriana por meio de terapia fotodinâmica, devemos também considerar a natureza da bactéria (Gram-positiva, Gram-negativa, aeróbia ou anaeróbia) se está em biofilme ou em fase planctônica (cultura pura ou suspensão), sua densidade populacional, entre outros. Por último, a natureza do meio onde estas interações ocorrem é igualmente importante, pois a cor do tecido, a quantidade de sangramento ou fluidos, a condutividade térmica, o pH, a quantidade de componentes orgânicos e de água deste ambiente podem isoladamente ou em conjunto influenciar nos resultados finais.

A primeira droga fotossensibilizante aprovada em tratamento de alguns tipos de neoplasias foi o Photofrin[®], uma mistura de oligômeros de porfirinas (Woods et al.²⁰⁴, 2004). Esta droga, muito utilizada por administração endovenosa, percorre todo o corpo e é absorvida por todas as células. As células saudáveis eliminam esta droga num período de 24 a 36 horas, diminuindo consideravelmente a sua concentração. Já nas células neoplásicas, há uma retenção do fotossensibilizador por períodos mais prolongados. Apesar desta preferência por células neoplásicas não ser ainda muito bem compreendida, alguns fatores são descritos como responsáveis. A permeabilidade da membrana das células que se encontram alteradas, as fibras colágenas imaturas (semelhantes às observadas em tecidos embrionários) e processos recentes de

cicatrização, possivelmente favorecem a ligação destas estruturas com a porfirina, causando uma maior concentração do fotossensibilizador nestes locais (Jori⁸⁰, 1996; Ahn et al.³, 2004; Chabrier-Rosello et al.²⁵, 2005).

A terapia fotodinâmica, principalmente a antimicrobiana, mostrou um grande avanço na última década. A constante busca por novos fotossensibilizadores e novas fontes de luz tende a ampliar ainda mais sua eficiência e suas aplicações clínicas (Ackroyd et al.¹, 2001). Atualmente, estudos comprovam que os efeitos da terapia fotodinâmica podem ser obtidos em células fotossensibilizadas por corantes, que podem ser endógenos ou exógenos (Van Der Meulen et al.¹⁸², 1997; Pervaiz¹³⁶, 2001).

Novas gerações de drogas exógenas estão sendo estudadas para o tratamento oncológico, oftalmológico, dermatológico bem como em aplicações nas áreas da cardiologia, odontologia, imunologia e hematologia (Neff et al.¹²⁶, 2000; Maisch et al.¹⁰⁰, 2004; Vol'pin et al.¹⁸⁶, 1997; Bertoloni et al.¹⁰, 1984; Meisel et al.¹¹⁵, 2005; Lagneaux et al.⁹¹, 2002).

Estudos recentes com o azul de metileno, um corante orgânico pertencente à família da fenotiazina, mostraram que este tem propriedades fotossensibilizantes com aplicações para terapia fotodinâmica em odontologia (Wood et al.²⁰², 2006; Soukos et al.¹⁶⁶, 2000; Harris et al.⁷⁰, 2005). Pesquisas demonstram que os fotossensibilizadores derivados da fenotiazina atuam em DNA e na membrana externa das

espécies Gram-negativas, fotossensibilizando tanto estas bactérias quanto as Gram-positivas. Nas bactérias Gram-negativas, por ter um baixo peso molecular, o azul de metileno se difunde através das porinas. Nas Gram-positivas, a difusão é favorecida pela carga positiva do azul de metileno, que predominantemente interage com macromoléculas aniônicas de lipopolissacarídeo presentes na parede celular bacteriana (Usacheva et al.^{179,180}, 2003; Tegos, Hamblin¹⁷⁴, 2006).

Especificamente em periodontia, esta terapia fotodinâmica pode oferecer algumas vantagens, como por exemplo, a rápida aplicação da droga fotossensibilizadora na bolsa periodontal e redução de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas depois de um curto período de tempo de exposição da luz específica para a droga utilizada. Além disso, a morte bacteriana pode ser restrita aos sítios doentes irradiados, preservando intacta a microbiota de sítios saudáveis, pois a luz é entregue localmente, de maneira rápida e não invasiva (Jori⁸², 2006). Desta forma, alguns efeitos colaterais indesejáveis dos antibióticos estariam sendo evitados.

Estudos sobre o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em periodontopatógenos como, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, demonstram que é possível obter ação bactericida após irradiação destes microrganismos sensibilizados apenas pelos seus próprios pigmentos endógenos (Soukos et al.¹⁶⁹, 2005; Henry et al.⁷⁵, 1995).

Wilson¹⁹³ (1993), em um artigo de revisão a respeito do uso da fotólise em bactérias orais, citou que compostos endógenos, presentes em algumas bactérias, poderiam absorver luz de comprimento de onda visível. Esta absorção poderia causar excitação das moléculas do pigmento endógeno. Desta forma, estas moléculas excitadas, iriam interagir com o oxigênio molecular e proporcionar a formação de oxigênio singleto reativo, resultando em morte celular (Spikes, Straight¹⁷⁰, 1987; Milanesi et al.¹¹⁶, 1987; Pervaiz, Olivo¹³⁷, 2006). Alguns exemplos de bactérias que possuem porfirinas endógenas são *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Propionibacterium acnes*, que após irradiadas com luz azul apropriada, em geral laser de argônio, podem sofrer os efeitos da terapia fotodinâmica (Kjeldstad, Johnsson⁸⁷, 1986; Henry et al.⁷⁴, 1996; König et al.⁹⁰, 2000). Entretanto, considerando apenas a penetração da luz, esta pode ser melhor obtida com outros comprimentos de onda, como por exemplo lasers vermelho ou infravermelho. No entanto, algumas espécies bacterianas encontradas na cavidade oral humana possuem compostos que absorvem melhor luz azul do que luz vermelha. Para tentar compensar esta melhor absorção pelo azul e melhor penetração para comprimentos de onda maiores, a fonte de luz de escolha é o laser vermelho.

Desta forma, a habilidade de um componente celular absorver a luz incidente não quer necessariamente dizer que ocorre a ação fotodinâmica. Um fator importante para que haja interação do

corante com a luz absorvida é o tempo de vida do composto no estado tripleto (alguns microsegundos). Este tempo é necessário para permitir uma interação com moléculas vizinhas, e assim gerar espécies citotóxicas (Mc Ilroy et al.¹⁰⁰, 1998; Dudkowiak⁴¹, 2004).

Alguns estudos mostram que bactérias não pigmentadas, quando expostas aos lasers de baixa intensidade não manifestam efeitos adversos (McGuff, Bell⁹⁹, 1966). Porém, de acordo com Dobson, Wilson³⁶ (1992), este comportamento também foi observado em *P. gingivalis*, *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, pois neste estudo, na ausência do fotossensibilizador externo, não foi observado redução alguma. Burns et al.²⁰ (1993) testaram microrganismos cariogênicos (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*) utilizando laser de He-Ne com densidade de energia de 33.6 J/cm². Na ausência do fotossensibilizador, também não constataram redução bacteriana apenas com a irradiação laser.

Entretanto, considerando que as bactérias pigmentadas de negro como, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia*, contêm compostos endógenos similares as porfirinas usadas em tratamento de lesões neoplásicas, acredita-se que estas substâncias endógenas podem fazer o papel dos fotossensibilizadores quando doses apropriadas são utilizadas (Konig et al.⁹⁰, 2000).

Henry et al.⁷⁵ (1995) relataram que certas bactérias periodontopatogênicas podem ser mortas através do processo de terapia

fotodinâmica, quando os seus fotossensibilizadores endógenos são irradiados. *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola* e *Prevotella intermedia*, todas bactérias que acumulam porfirina celular, foram irradiadas com laser de argônio com fluências entre 20 e 200 J/cm². *Prevotella intermedia* (ATCC 15033) foi sensível à irradiação, porém a cepa ATCC 49046 da mesma espécie foi resistente. Quando o meio de cultura foi enriquecido com hemina, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) também se tornou resistente.

Henry et al.⁷⁴ (1996) também estudaram a ação do laser de argônio (488-514 nm), em baixa intensidade como tratamento único sobre diferentes biofilmes. Fluências de 35 a 80 J/cm² inibiram o crescimento do biofilme de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*. Porém, fluências de 70 J /cm² não afetaram o biofilme formado pelas espécies de *Bacillus*, *Candida*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O efeito de redução bacteriana (fototoxicidade) foi modificado pela idade do biofilme mostrando também dependência com a presença de oxigênio atmosférico. A redução de *Prevotella sp.* e *Porphyromonas sp.* foi maior do que a obtida com as outras espécies testadas. A alta absorção no comprimento de onda azul, pelas porfirinas endógenas das bactérias *P. gingivalis* e *P. intermédia*, explica os resultados obtidos.

Arakane et al.⁵ (1996) mediram in vitro a emissão de radiação infravermelha do oxigênio singlete, formado por excitação laser

em porfirinas endógenas de bactéria cutânea (*Propionibacterium acnes*). Os resultados sugerem que após a irradiação, o oxigênio singlete pode ser formado na superfície da pele e produzir danos a este tecido.

No caso de fotossensibilização exógena, corantes como azul de metileno, azul de toluidina, rose bengal, eosina, ftalocianinas, clorinas, hematoporfirinas, crystal Violet, entre outros foram usados para a realização da terapia fotodinâmica. Mathews¹¹² (1963) demonstrou que o azul de toluidina fotossensibilizava *Sarcina lútea*, e que esta poderia ser eliminada com irradiação por luz policromática. Bertoloni et al.¹⁰, (1984) constataram que bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*), mas não espécies Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), poderiam ser eliminadas pela luz na presença de hematoporfirina. Um dos poucos estudos que relatam redução bacteriana, utilizando luz policromática foi de Venezio¹⁸⁵ 1985, que eliminou *S. mutans* com a sensibilização por hematoporfirina e posterior exposição de 20 minutos a uma lâmpada de projeção de 300 W. No entanto, a utilização clínica da luz policromática possui alguns inconvenientes, pois são necessários longos tempos de exposição, os que em geral causa um aquecimento exacerbado e indesejado em aplicações biológicas.

Dobson, Wilson³⁶ (1992) e Wilson¹⁹² (1998) analisaram a redução bacteriana in vitro, causada pela impregnação de corantes em biofilme formado em superfície de agar por *Streptococcus sanguis*,

Porphyromonas gingivalis, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tais biofilmes foram posteriormente fotossensibilizados pela irradiação por 30 segundos com o laser de He-Ne operando em 7,3 mW de potência. Os autores concluíram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes na eliminação das quatro bactérias. Porém os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina HCl e hematoporfirina éster, nos parâmetros utilizados, somente foram efetivos em alguns microorganismos. Os autores relatam que a literatura (Malik et al.^{104,106}, 1990; Jori, Spikes⁸², 1990) embasa estes resultados, uma vez que as hematoporfirina e ftalocianinas, muito utilizadas em lesões neoplásicas, possuem pouco efeito sobre bactérias Gram-negativas.

Wilson et al.¹⁹⁷ (1992) testaram in vitro vinte e sete compostos para verificar suas capacidades de sensibilizar e, a partir da irradiação com laser de He-Ne, eliminar as bactérias: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados demonstram que os corantes azul de toluidina, azul de metileno e cloreto azul B nas concentrações de 0,005% foram efetivos contra todas estas bactérias, quando irradiados por 30 segundos.

Em 1993, Wilson, Dobson¹⁹⁵ fizeram um estudo em bactérias anaeróbias, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, utilizando azul de toluidina, diematoporfirina éster e

ftalocianina dissulfonada de alumínio, usando irradiação com laser He-Ne (7,3 mW). Encontraram substancial redução quando utilizaram o azul de toluidina, sugerindo que a terapia fotodinâmica poderá ser usada como alternativa ao uso de antibióticos em tratamentos de periodontite crônica. Porém, muitos estudos clínicos ainda são necessários pois alguns corantes apresentam resultados distintos.

Wilson et al.¹⁹⁵ (1993) avaliaram a redução bacteriana *in vitro* de culturas de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* impregnadas por azul de toluidina (25 µg/ml) e azul de metileno (25 µg/ml) e irradiadas com He-Ne 7,5 mW por 80 segundos. Constataram que a utilização destes dois corantes, seguidos da irradiação laser, foi letal para as três culturas. Já, quando a PDT foi realizada com os corantes diamatoporfirina éster e ftalocianina dissulfonada de alumínio, o tratamento foi letal apenas para *P. gingivalis*. Na ausência de qualquer corante, a exposição ao laser não se mostrou eficaz em reduzir bactérias. No entanto, apenas a aplicação do corante azul de toluidina, sem qualquer irradiação laser, causou alta toxicidade e conseqüentemente uma redução estatisticamente significativa de *A. actinomycetemcomitans*.

Wilson et al.¹⁹⁸ (1993) testaram, em cultura de *S. sanguis*, diferentes tempos de irradiação com laser de He-Ne em diferentes corantes. De acordo com a contagem das unidades formadoras de colônia, o azul de toluidina, hematoporfirina éster, tionina e o azul de

metileno foram eficazes na redução bacteriana. Entretanto, verificou-se também que os corantes hematoporfirina éster e o azul de metileno foram tóxicos aos microrganismos mesmo na ausência da irradiação com o laser. Os corantes, ftalocianina dissulfonada de alumínio e cristal violeta (violeta de genciana) foram ineficazes para redução bacteriana nas condições deste estudo.

Sarkar, Wilson¹⁴³ em 1993, estudaram a ação da terapia fotodinâmica *in vitro* em amostras de placa de pacientes com periodontite crônica. Utilizando o corante azul de toluidina (50 µg/ml) e laser de He-Ne operando em 7.3 mW, a PDT causou uma redução de 91,1% nas bactérias aeróbias, 96,6 % nas anaeróbias, 100% nas pigmentadas anaeróbias e 94,2 % em *Streptococcus*. A utilização do corante, sem a irradiação laser, foi tóxica apenas numa minoria de amostras.

Burns et al.²¹ (1994) estudaram *in vitro* a ação da ftalocianina dissulfonada de alumínio (50 µg/ml) em suspensão de bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus*) após irradiação por 30 -90 segundos com laser de diodo, 660 nm com potência de 11 mW e diâmetro do feixe de 9 mm. Os resultados mostraram redução bacteriana para todas as espécies. Só a aplicação do corante com concentração de até 100µg/ml não causou redução estatisticamente significativa. Na ausência da ftalocianina, a irradiação também não causou redução bacteriana.

Wilson¹⁹⁴ (1994) a respeito do potencial da terapia fotodinâmica em tratamentos relacionados com a redução de bactérias presentes na placa (biofilme), conclui que a PDT possui algumas vantagens por ser uma terapia tópica. A terapia fotodinâmica não causa distúrbios gastro-intestinais, não provoca resistência bacteriana, não necessita de períodos prolongados para que o produto (fotossensibilizador) chegue ao alvo e ainda se limita ao sítio de interesse. Embora os estudos in vitro têm demonstrado bons resultados na redução bacteriana, o autor cita que ainda nenhuma investigação in vivo foi publicada. Portanto, sugere que estudos sejam realizados para que se possa concluir se a fotoativação de bactérias, cariogênicas ou periodontopatogênicas, impregnadas por corantes, possam também ser eliminadas in vivo.

Wilson, Pratten¹⁹⁶ (1995) estudaram in vitro a ação da ftalocianina como fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica em *Streptococcus aureus*. O estudo analisou o efeito da PDT nas diferentes fases de crescimento bacteriano e nos diferentes períodos de pré-irradiação (incubação do corante). Os resultados mostram que a morte bacteriana foi eficiente nos dois tempos de pré-irradiação e que não foi influenciada pelas diferentes fases de crescimento bacteriano, sendo efetiva mesmo na presença de soro sanguíneo.

Wilson et al.²⁰⁰ (1995) estudaram a ação da terapia fotodinâmica em amostras de placa (biofilme) supragengivais de dez

pacientes voluntários. As amostras que receberam o corante azul de toluidina (100µg/ml) foram irradiadas com laser de He-Ne, e as que receberam a ftalocianina dissulfonada de alumínio foram irradiadas com laser de diodo. Houve redução substancial de bactérias anaeróbias, assim como de espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces*.

Vol'pin et al.¹⁸⁶ (1997) estudando as propriedades químicas dos fotossensibilizadores, sugeriram que a ftalocianina e seus análogos (porphyrazines, naphthalocyanines, tetrabenzoporphines) associados ao ácido ascórbico poderiam aumentar a eficiência da fototerapia, se compararmos o efeito da ftalocianina isolada.

Soukos et al.¹⁶⁵ (1996) objetivando verificar se a terapia fotodinâmica poderia ser usada em bolsas periodontais sem causar danos aos tecidos adjacentes, avaliaram in vitro os efeitos fotodinâmicos da irradiação com laser vermelho sobre queratinócitos orais humanos por 5 minutos e fibroblastos por 2 minutos, ambos sensibilizados com o corante azul de toluidina na concentração de 2 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente. A bactéria testada neste estudo foi *Streptococcus sanguis*. O estudo concluiu que baixas concentrações dos corantes e do laser utilizado causam redução bacteriana, sem provocar dano aos tecidos.

Van der Meulen et al.¹⁸² (1997) investigou a eficiência do efeito bactericida da PDT em *Haemophilus parainfluenzae*, que produz porfirina endógena sintetizada com δ-ALA (δ-aminolaevulinic acid). A irradiação foi realizada com laser de corante (630 e 617 nm), observou-se

progressiva perda da viabilidade de microrganismos com o aumento da densidade de energia. As irradiações em 617 nm (dose de 200 J/cm²) reduziu 99,9% de *Haemophilus parainfluenzae*. Porém, quando o laser operou em 630 nm houve uma redução de 96%. Na ausência do δ -ALA, não houve sinais de fluorescência de *H. parainfluenzae*, indicando que a porfirina não é produzida na ausência de δ -ALA.

Haas et al.⁷¹ (1997) avaliaram os efeitos da PDT na redução bacteriana em superfícies de implantes. Este estudo foi realizado in vitro e os implantes foram incubados em culturas puras de *P. gingivalis*, *P. intermedia* ou *A. actinomycetemcomitans*. O laser utilizado foi o diodo 690 nm, associado ao corante azul de toluidina (100µg/ml). Os resultados mostraram que não houve redução bacteriana quando o corante ou o laser foram aplicados isoladamente. Quando a associação corante e irradiação laser por um minuto foi testada, houve significativa redução bacteriana. As análises em microscopia eletrônica de varredura mostraram que houve destruição celular no grupo laser e corante, sem contudo causar alterações nas superfícies dos implantes.

McCaughan⁹⁸, 1999 e Boyle, Dolphin¹⁷, 1996 revisando a literatura, descreveram os processos fotofísicos e fotobiológicos da terapia fotodinâmica em neoplasias, lesões pré-cancerosas, lesões vasculares e também em infecções virais e bacterianas. O mecanismo de ação comum entre os fotossensibilizantes, como por exemplo as porfirinas, pode ser explicado pela excitação inicial causada por uma fonte

de luz, que faz a porfirina passar para estágios singleto e tripleto excitados. Esta porfirina tripleto excitado transfere sua energia ao oxigênio tripleto (não reativo), processo denominado aniquilação tripleto-tripletto, gerando uma espécie reativa de oxigênio singleto que acaba por produzir danos biológicos. Atualmente, os principais alvos biológicos das formas reativas do oxigênio singleto e radicais livres são: os ácidos nucleicos, enzimas e membranas celulares. Estes alvos biológicos podem também gerar a liberação de outros produtos com alta patogenicidade, como por exemplo as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Ocorre a ativação do sistema complemento, infiltração de células sanguíneas imunológicas, por exemplo na região da neoplasia, aumentando o efeito destrutivo aos tecidos, que estão sendo submetidos a terapia fotodinâmica.

Walsh¹⁸⁹ (1997) revisando a literatura sobre o uso dos lasers de baixa intensidade em tecidos duros, descreveu a fotossensibilização de bactérias com corantes apropriados para absorver o comprimento de onda específico do laser utilizado. O autor sugere que esta técnica pode ter aplicação para a redução bacteriana no interior de canais radiculares e bolsas periodontais, como coadjuvantes aos tratamentos convencionais.

Bhatti et al.¹³ (1998) estudaram os possíveis mecanismos envolvidos na fotossensibilização letal de bactérias com o uso do corante azul de toluidina. Os efeitos da fotossensibilização foram avaliados pela medida da fluorescência e eletroforese de proteínas. Os resultados

sugerem que a morte de *Porphyromonas gingivalis* após a terapia fotodinâmica envolve mudanças nas membranas de suas proteínas e defeitos no DNA mediados pela ação do oxigênio singleto.

Wainwright¹⁸⁷ (1998) revisando a literatura, apresentou os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica em microrganismos, os diversos corantes em uso e perspectivas futuras da técnica. Neste artigo, sugeriu a utilização da PACT (Photodynamic Antimicrobial Chemoteraphy), afirmando possuir baixo custo e boa eficiência, utilizando corantes que absorvem a luz visível ou ultravioleta, para gerar efeito fototóxico.

Golding et al.⁵⁶ (1999) avaliaram a inativação de espécies bacterianas via fotossensibilização. O objetivo do estudo foi comparar o comportamento de uma bactéria anaeróbia Gram-negativa pigmentada de negro (*Prevotella nigrescens*), com uma espécie facultativa Gram-positiva e não pigmentada (*Staphylococcus aureus*). A terceira bactéria (*Escherichia coli*) que é facultativa, Gram-negativa e não pigmentada foi testada e comparada com *Staphylococcus aureus*. O corante utilizado nas culturas foi o isotiocianato trifenilmetano verde de malaquita (MGITC). A irradiação foi feita com um laser de corante (bombeado pelo laser de argônio) de forma contínua e pulsada, com comprimentos de onda de aproximadamente 630 nm. *Prevotella nigrescens* foi irradiada por 30 segundos, 1 minuto e 5 minutos, em 620 nm e potência de 150 a 170 mW (doses respectivas de 636 J/cm², 1273 J/cm² e 6364 J/cm²). Mesmo na

ausência do corante houve efetiva e proporcional inativação desta bactéria nas densidades de energia aplicadas. Quando o *Staphylococcus aureus* foi sensibilizado com verde de malaquita, também houve inativação dose dependente. Neste caso, a fonte de luz pulsada demonstrou mesma eficiência da contínua, provavelmente devido ao grande número de transições eletrônicas para o estado excitado que se consegue com o corante verde de malaquita num curto período (6 nanosegundos) quando comparado aos outros corantes. O corante MGITC foi ineficiente na redução de *Escherichia coli*. O autor sugere que as bactérias Gram-negativas parecem ser resistentes a esta terapia, devido as suas diferenças estruturais. Desta forma, o estudo conclui que a bactéria com pigmento endógeno (*Prevotella nigrescens*) pode ser inativada apenas com a irradiação. Já a bactéria Gram-positiva não pigmentada (*Staphylococcus aureus*) deve receber corante exógeno. Contudo a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* se mostrou resistente a este tratamento.

Wood et al.²⁰³ (1999) estudaram a ação do Pyridinium Zn (II) phthalocyanine (PPC) em biofilme formado in vivo, de oito pacientes voluntários, que receberam uma camada de resina nos primeiros e segundos molares superiores. Após sete dias, estas amostras foram removidas cuidadosamente e incubadas com ftalocianina catiônica durante 1 hora. Estudos de microscopia mostraram que o corante penetrou na biomassa do biofilme. As irradiações destas amostras foram

realizadas com luz branca (na faixa de 600 a 700 nm e intensidade média de 22,5 mW/cm²). Análises por microscopia eletrônica de transmissão demonstram que houve morte não seletiva de bactérias, sugerindo que a terapia fotodinâmica pode ser eficiente para anaeróbios e aeróbios.

Jackson et al.⁷⁸ (1999) investigaram in vitro a morte do fungo *Candida albicans* nas suas formas de levedura e hifa. Foi utilizado o corante azul de toluidina e irradiação com laser de He-Ne (632,8 nm operando em 35 mW de potência). Avaliou-se neste trabalho a concentração do corante, a dose de aplicação do laser e o tempo que o corante leva para ser absorvido pelas bactérias (tempo de pré-irradiação). Os autores concluíram que a associação entre o laser e o corante resultou em morte microbiana de ambas as formas, hifa e leveduras. Este resultado se mostrou dose dependente, sendo que a melhor dose foi 42 Joules com um tempo de pré-irradiação de 5 minutos para a forma de levedura. No entanto, a forma de hifa não foi influenciada pelo tempo de pré-irradiação (incubação).

Ivanov et al.⁷⁷ (2000) estudaram, in vitro, o efeito de diferentes concentrações de azul de metileno (1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%) associadas a irradiação com o laser de He-Ne (intensidade de 100 mW/cm²), em cultura bacteriana de *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus* não hemolítico e bactérias totais de amostras de bolsas periodontais. O tempo de pré-irradiação também foi analisado e verificou-se que a concentração de 1% se mostrou tóxica no período de 30 segundos de

incubação. Desta forma, o corante a 1% foi descartado do estudo. A irradiação isolada do corante não causou redução, mesmo com densidade de potência de 600 mW/cm^2 . Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica, utilizando concentrações de 0.1% e 0.01%, com tempo de incubação por 3 minutos e tempo de irradiação de 1 a 2 minutos apresentou melhor efeito antimicrobiano.

Packer et al.¹³⁴ (2000) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica na inativação da atividade de enzimas proteolíticas da bactéria *Porphyromonas gingivalis* após a utilização de azul de toluidina (6,25; 12,5 e 25 g/mL) e ativação com o laser vermelho (633 nm) com doses de até 189 Joules. Os resultados mostraram que na ausência do corante, apenas as doses de 126 Joules e 189 Joules reduziram a atividade proteolítica em 14% e 27%, respectivamente. A exposição da bactéria ao corante na ausência de irradiação laser, causou um decréscimo de 19% na atividade proteolítica. No entanto, esta inativação foi total quando o tratamento associou o corante e a irradiação laser operando com 126 Joules ($111,4 \text{ J/cm}^2$). Utilizando 21 Joules na presença do corante, houve redução bacteriana de 99,99%.

Kawamoto et al.⁸⁵ (2000) estudaram in vivo o efeito antibacteriano do laser de He-Ne amarelo associado ao corante violeta cristal em subcutâneo de ratos. Abscessos subcutâneos foram induzidos pela colocação de cones de papel contaminados com *Porphyromonas gingivalis*. Após uma semana da inoculação destes cones nos

subcutâneos dos ratos, amostras destes locais foram removidas e analisadas histologicamente. Foi observada menor reação inflamatória no grupo onde foi empregada apenas solução salina, seguida do grupo que recebeu a irradiação laser.

König et al.⁹⁰ (2000) avaliaram a ação do laser de He-Ne (60 mW de potência), sem a associação a corantes externos. Testaram *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus mutans* (como controle, pois não produz porfirina endógena). Os resultados mostraram redução de bactérias produtoras de endoporfirinas, pronunciado efeito sobre bactérias pigmentadas e nenhum efeito sobre *Streptococcus mutans*.

Usacheva et al.¹⁷⁸ (2001) avaliaram a eficiência do azul de metileno e do azul de toluidina na redução bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na presença e na ausência de luz. As fontes de luz empregadas foram um laser de argônio e um laser de diodo. Os autores relatam que os dois fotossensibilizadores testados foram eficientes na redução de todas as espécies quando associados a presença da luz. Na ausência da luz, o efeito tóxico do corante azul de toluidina foi maior do que o azul de metileno.

Dörtbudak et al.³⁹ (2001) avaliaram os efeitos da PDT na redução bacteriana em superfícies de implantes. Este estudo foi realizado

com 15 pacientes com sinais clínicos e radiográficos de periimplantite, e três espécies bacterianas foram investigadas *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans*. O laser utilizado foi o diodo 690 nm associado ao corante azul de toluidina (0,1%). Os resultados mostraram redução bacteriana estatisticamente significativa com apenas a aplicação do azul de toluidina para as bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*. O tratamento que associa o corante e a irradiação laser causou redução de 92% em média para as três bactérias, sendo que *P. intermedia* teve uma redução de 97,6%, após 1 minuto de irradiação.

Dörtbudak et al.⁴⁰ (2001) examinou a redução bacteriana proporcionada em bolsas periodontais após a utilização da terapia fotodinâmica. Trinta pacientes, que não haviam recebido qualquer terapia periodontal ou antibioticoterapia há pelo menos três meses, foram incluídos no estudo. As bolsas mais profundas foram sensibilizadas com azul de toluidina (100 µg/ml) e posteriormente lavadas com soro fisiológico por um minuto, para receber a irradiação com o laser de diodo 690 nm (75 mW de potência e 60 segundos). A primeira amostra (valor inicial) foi coletada antes da sensibilização e irradiação utilizando pontas de papel estéril. A segunda amostra (valor teste) foi coletada 5 minutos após a PDT. As bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* foram evidenciadas nas amostras iniciais nos valores de 176.57 106.21, 163.49 x10⁴ u.f.c./mL, respectivamente. Após a terapia

fotodinâmica, os valores encontrados foram 4.07, 0.27 e 0.43 x10⁴ u.f.c./ml, aproximadamente 99% de redução bacteriana.

Yilmaz et al.²⁰⁸ (2002) testou quatro diferentes tipos de tratamento em 10 pacientes com doença periodontal. Cada paciente recebeu, de forma aleatória em cada quadrante, um tipo de tratamento: 1. raspagem, 2. apenas laser e corante, 3. raspagem mais laser e corante e 4. apenas instrução de higiene oral. O laser utilizado foi o laser de diodo 685 nm, (30 mW, 5 Hz, 1.6J/cm²) aplicado 3 vezes por semana. O corante foi o azul de metileno, que foi aplicado previamente às irradiações laser. Apenas os grupos 1 e 3 causaram redução estatisticamente significativa de microrganismos anaeróbios após 32 dias do exame inicial.

Garcez et al.⁵² (2002) utilizando como corante uma pasta à base de azuleno e o laser de diodo (685 nm), obteve num experimento in vitro 100% de redução do *E. faecalis*. Em outro estudo, num relato de caso clínico, mostram remissão de sinais de infecção, como supuração, edema e ulcerações na gengiva, em um período de 48 horas após a raspagem periodontal, aplicação do corante e irradiação com laser, sem qualquer associação com antibióticos locais ou sistêmicos.

Nussbaum et al.¹³¹ (2002) examinaram o efeito do laser de baixa intensidade no crescimento bacteriano in vitro, sem a adição de qualquer corante. Testaram os comprimentos de onda 630, 660, 810 e 905 nm, com densidades de energia de 1 a 50 J/cm². Constataram, para o laser em 630 nm, que as densidades de energia de 1 J/cm², 5 J/cm² e 20

J/cm² causaram inibição no crescimento das três bactérias testadas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*), e que doses de 2, 10 e 50 J/cm², causaram aumento no crescimento de *P. aeruginosa*. Para o laser operando em 660 nm houve inibição das três bactérias nas densidades de energia de 1 e 5 J/cm². Porém, doses de 2, 20 e 50 J/cm² causaram um aumento, em especial à *S. aureus*. O laser de 810 nm causou um crescimento nas três espécies com doses de 1 e 2 J/cm². Doses de 5, 10, 20 e 50 causaram uma inibição do crescimento especialmente de *P. aeruginosa*. O comprimento de onda de 905 nm promoveu um crescimento na maioria das densidades de energia nas três bactérias, ficando apenas o *S. aureus*, na densidade de 5 J/cm², com uma inibição de crescimento considerável. Os autores concluem que o laser operando em 630 nm foi mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano do que os lasers operando no infra vermelho próximo.

O'Neill et al.¹³² (2002) avaliaram por meio de microscopia confocal, as alterações causadas em biofilme após a aplicação de azul de toluidina (25 µg/ml) e irradiação com laser He-Ne (31,5 Joules). O biofilme, formado por 32,8 % de estreptococos, 6,5 % de *Veillonella* spp, 0,1% *Actinomyces* spp e 0,1% de anaeróbios Gram-negativos, sofreu uma redução de 97,4% das bactérias após a sensibilização com azul de toluidina e irradiação laser. A aplicação apenas do corante ou a irradiação laser como procedimento único não causaram redução bacteriana significativa.

Soukos et al.¹⁶⁵ (2003), testaram o efeito da terapia fotodinâmica associada à ação de ondas fotomecânicas tanto em amostras planctônicas de pacientes periodontais, quanto em biofilmes de *A. naeslundii* criados em superfícies de esmalte bovino. A combinação da luz e do fotossensibilizador eliminou em fase planctônica 90 % das espécies. Em biofilme, a aplicação da onda fotomecânica promoveu um aumento de 50 % da penetração do corante (pL-c(e6)). Este aumento na penetração permitiu uma redução de 99% da bactéria em biofilme após a terapia fotodinâmica. Os autores concluem que, para uma melhor efetividade de redução bacteriana em biofilme, melhor penetração da droga deve ser obtida. Neste estudo, a onda fotomecânica favoreceu a desagregação da massa do biofilme e, conseqüentemente, a penetração do fotossensibilizador, potencializando o efeito da terapia fotodinâmica.

Pitzner et al.¹³⁸ (2004) investigaram a ação da terapia fotodinâmica utilizando os fotossensibilizadores chlorin e6, BLC 1010 e BLC 1014. Demonstraram que *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Capnocytophaga gingivalis* foram totalmente inativadas após iluminação, quando precedida de incubação por 10 m μ M chlorin e6 e 10 m μ M BLC 1010. Porém, empregando o fotossensibilizador BCL 1014, apenas um pequeno efeito na redução bacteriana foi observado.

Demidova, Hamblin³⁴ (2004), em um artigo de revisão, evidencia a importância da seletividade do fotossensibilizador e da dosimetria aplicada. No entanto, sabe-se que bactérias Gram-positivas

são mais susceptíveis à terapia do que Gram-negativas, o que motivou estudos de novos corantes. Atualmente, fotossensibilizadores carregados positivamente, estão sendo utilizados para facilitar a permeabilidade destes na membrana das bactérias Gram-negativas. Contudo, poucos estudos clínicos foram realizados até o momento e as doses para a PDT devem ser ajustadas para que a terapia possa ser amplamente utilizada.

A terapia fotodinâmica para eliminar periodontopatógenos pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos sistêmicos para o tratamento das doenças periodontais. Mesmo que o método ainda esteja em estágio experimental, segundo Meisel, Kocher¹¹⁵ (2005), o aumento dos problemas com a crescente resistência bacteriana poderá promover mais rapidamente a introdução desta terapia na prática periodontal. Este artigo de revisão revela estudos encorajadores para que a terapia fotodinâmica seja aplicada em periodontites e peri-implantites. Entretanto, os autores ressaltam que apesar de excelentes resultados, a eficácia da terapia deve ser confirmada em estudos clínicos.

Áreas subgengivais de cães Beagles foram infectadas com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. A terapia fotodinâmica foi aplicada usando laser em 662 nm com 0.5 W de potência e dois fotossensibilizadores (clorina e6 e BLC1010). Análises microbiológicas, usando PCR, revelaram que a terapia suprimiu significativamente *P. gingivalis* quando clorina e6 foi usada para a terapia. Por outro lado, *Fusobacterium nucleatum* foi muito pouco inibido pela

clorina e, apresentando resultados melhores quando BLC1010 foi aplicado. Sinais de inflamação e sangramento a sondagem foram reduzidos no grupo PDT. Os autores concluem que esta terapia foi significativamente efetiva na supressão de *P. gingivalis* (Sigusch et al.¹⁴⁹, 2005).

Hayek et al.⁷² (2005) estudaram comparativamente, em peri-implantites induzida em cães, o efeito da terapia fotodinâmica e da irrigação com clorexidina após procedimentos convencionais de raspagem. Os resultados mostraram redução de *Prevotella sp.*, *Fusobacterium sp.*, e *S. beta-haemolyticus* em ambos os grupos testados. Desta forma, concluem que a terapia fotodinâmica é uma técnica não invasiva que pode ser utilizada com sucesso para redução microbiana em peri-implantite.

Jori et al.⁸³ (2006) acreditam que com o aumento e difusão de resistência antibiótica por diversas cepas microbianas, a terapia fotodinâmica é uma opção que apresenta algumas vantagens. Atualmente, os corantes utilizados são efetivos na inativação de fungos e bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Em geral, os fotossensibilizadores possuem ação rápida e não exigem longos períodos pré-irradiação. Como a morte bacteriana não está relacionada à mediação de radicais químicos, e sim à foto-destruição da membrana, que ocorre através de processos múltiplos, o risco de processos mutagenicos ou desenvolvimento de foto-resistência é muito pouco provável. Além disso,

com a aplicação local dos fotossensibilizadores a morte das bactérias é controlada, restringindo-se a região sensibilizada e irradiada, evitando a destruição da microbiota em outros locais. De acordo com Jori et al.⁸³ (2006), um exemplo típico é a ação bactericida da terapia fotodinâmica utilizando ftalocianinas como sensibilizador em cepas de *Staphylococcus aureus*, que se mostraram resistentes ao antibiótico Meticilina. O autor afirma que a PDT é uma terapia conveniente para infecções localizadas, como candidíase oral, periodontite e feridas crônicas.

Komic, MacRobert⁸⁹ (2006), em um artigo de revisão relata que muitos microrganismos que causam infecções na cavidade bucal têm se mostrado susceptíveis à terapia fotodinâmica. Por este motivo, pesquisas estão direcionadas para encontrar fotossensibilizadores apropriados, bem como a dosimetria ideal para atingir melhores efeitos bactericidas. Os autores concluem que a PDT tem potencial para se tornar uma reconhecida alternativa à terapia antimicrobiana aplicada a infecções orais, e merece a continuidade dos estudos nesta área.

Um estudo de Wood et al.²⁰² (2006) compararam a eficácia da morte bacteriana quando utilizaram azul de metileno, Photofrin[®] e eritrosina como fotossensibilizadores para a PDT. Os resultados deste estudo mostraram que a eritrosina foi mais efetiva na redução bacteriana do que o Photofrin[®], e que este foi mais efetivo que o azul de metileno quando utilizados em biofilme de *Streptococcus mutans*. Os autores ainda

sugerem que a susceptibilidade à terapia fotodinâmica cresce conforme a idade do biofilme aumenta.

3 Proposição

Neste estudo nos propomos investigar o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em amostras de placa bacteriana de pacientes com doença periodontal crônica, comparando sua ação quando aplicada em fase planctônica e em biofilme.

4 Material e método

4.1 Amostras Clínicas

Neste estudo coletamos 120 amostras de placa de 12 pacientes selecionados entre 36 pacientes analisados (10 sítios por paciente) com doença periodontal crônica. A permissão para a coleta deste biofilme dental foi autorizada pelo comitê de ética do *Forsyth Institute – Institutional Review Board* (em Anexo). Todos os pacientes receberam informações detalhadas a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios. A adesão do paciente à pesquisa foi espontânea, não se promovendo obrigatoriedade ou constrangimento ao paciente. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo comitê de ética do *Forsyth Institute – Boston MA*. Os requisitos básicos para a inclusão no estudo foram: apresentar boas condições de saúde geral, sem quaisquer alterações sistêmicas evidentes ao exame clínico, ou detectada pela anamnese. Não apresentar história positiva de uso de antibióticos ou qualquer tipo de tratamento periodontal no período de ao menos 3 meses que antecederam este estudo. Não ser fumante e ter ao menos 10 sítios com sangramento e profundidade de sondagem maior que 5 mm. Depois de realizado exame clínico, os pacientes diagnosticados com doença periodontal crônica, apresentando ao menos 10 sítios com mais de 5 mm de profundidade à sondagem foram incluídos no estudo. As amostras de placa, supra e

subgingival foram removidas com cureta periodontal específica (Cureta de Gracey) estéril. Imediatamente após a remoção da placa, colocamos as amostras em um tubo com solução anaeróbia pré-reduzida (PRAS) (Anaerobe system Morgan Hill, CA – Liquid Dental Transport Medium). A amostra obtida foi agitada num equipamento específico (*vortex*) para causar a desagregação da placa. Em seguida, pipetamos a amostra repetidas vezes para evitar partículas aglutinadas no meio líquido. Alíquotas de 1 mL foram colocadas em tubos Eppendorfs, e centrifugadas a 7000 rpm por 4 minutos para separar a amostra da solução anaeróbia pré-reduzida (PRAS). Para conhecer a densidade do inóculo, após centrifugação, aspiramos o sobrenadante (PRAS) e ressuspendemos a amostra em caldo de BHI (Brain Heart Infusion). O número de células foi estimado de acordo com a densidade óptica de 1 mL desta amostra. Utilizando um espectrofotômetro operando em comprimento de onda de 600 nm, medimos a densidade óptica (DO) utilizando cubetas descartáveis. Cada unidade no valor da DO corresponde a aproximadamente 10^9 células/mL. As amostras de placa de cada paciente foram divididas para serem utilizadas em duas diferentes fases experimentais: planctônica (suspensão) e biofilme.

4.2 Preparação das placas de agar sangue enriquecido

O meio agar sangue enriquecido foi preparado utilizando 20 g/L de trypticase soy Agar (BBL, Cockeysville, MD), 26 g/L de agar BHI

(Difco Laboratories, Detroit, MI), 10 g/L extrato de levedura (BBL) e 5 mg/L hemina (Sigma Chemical Co., St Louis, MD). O meio foi autoclavado e deixado resfriar em banho com temperatura constante de 50°C. Após o meio resfriar até 50°C, adicionamos assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Northeast Labs, Waterville, Maine), 5 µg/mL de menadiona (Sigma Chemical Co., St Louis, MD) e 0.3 µg/mL de ácido N-acetylmuramic (Sigma). Este agar enriquecido foi utilizado para preparar placas de cultura convencionais e para preencher os poços das placas de 96 poços com o volume de 150 µL de meio por poço. Após a geleificação do agar, as placas foram devidamente embaladas e mantidas em sala fria.

4.3 Desenvolvimento do Biofilme

Placas com 96 poços, previamente preparadas com agar sangue enriquecido, foram utilizadas para o desenvolvimento do biofilme dental in vitro (Som et al.¹⁶², 2004). Para iniciar o crescimento do biofilme pipetamos 150 µL da amostra clínica, coletada conforme descrito anteriormente. Cuidadosamente preenchemos cada poço da placa com 150 µL e incubamos em câmara de anaerobiose a 35°C por sete dias. Nas primeiras 48 horas de incubação, não realizamos nenhuma troca de meio. Somente a partir do terceiro dia, aspiramos o meio antigo e renovamos diariamente os nutrientes de cada poço colocando 150 µL de caldo fresco de BHI, conforme ilustra a Figura 1.

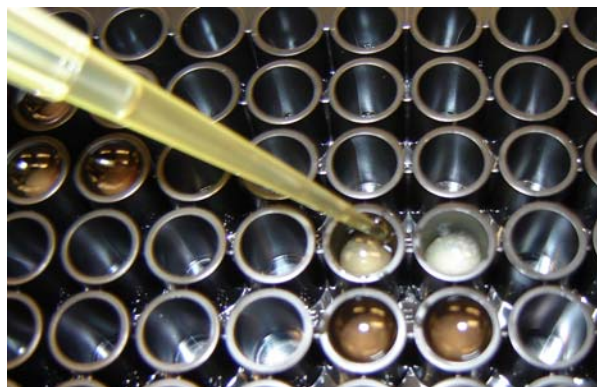


FIGURA 1 – Aspiração do meio antigo para a colocação de caldo fresco de BHI.

4.4 Fotossensibilizador

Neste estudo, utilizamos o azul de metileno (Methylene Blue Sigma, St Louis, MO), um corante orgânico com propriedades fluorescentes e fotossensibilizadora (Jockusch et al.⁷⁹, 1996; Phoenix, Harris¹³⁹, 2003). Este fotossensibilizante tem se mostrado efetivo em inativar vírus e espécies bacterianas após exposição à luz (Tuite, Kelly¹⁷⁷, 1993; Millson et al.¹¹⁷, 1996). A carga positiva presente na molécula deste corante e seu baixo peso molecular (Figura 2) promove sua melhor interação com as bactérias (Soukos et al.¹⁶⁸, 2006). Nas bactérias Gram-negativas, o azul de metileno é difundido através das porinas que são pequenos canais na membrana externa que permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular. Nas bactérias Gram-positivas, desprovidas da membrana externa, a passagem das moléculas se dá pela espessa parede celular. Apesar de espessa, esta membrana permite a difusão de muitas moléculas. Além disso, uma ampla variedade de

diferentes polímeros (ácidos teicóicos) confere carga negativa à superfície exterior, facilitando ainda mais o transporte de íons positivos para dentro da célula.

Em ambiente protegido da luz, dissolvemos o azul de metileno em caldo BHI para permitir concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluções de azul de metileno em diferentes concentrações foram preparadas imediatamente antes do uso. Os tubos contendo as soluções foram envolvidos em papel alumínio para manter o fotossensibilizador sem exposição à luz durante a realização dos experimentos.

O espectro de absorção do azul de metileno foi medido com cubetas de quartzo de 1 cm, do ultravioleta ao infravermelho próximo (200 a 800 nm) usando um espectrofotômetro (Model 8541A, Hewlett-Packard, Palo Alto CA). Conforme mostramos na Figura 3, o azul de metileno apresenta duas bandas de absorção. Uma das bandas está localizada em torno de 290 nm (banda Soret), enquanto a outra apresenta um pico máximo ao redor de 665 nm. Esta segunda banda será excitada para a PDT.

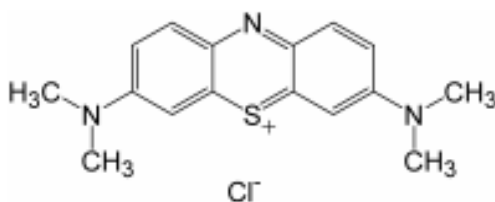


FIGURA 2- Estrutura química do azul de metileno. A carga positiva presente na molécula e seu baixo peso molecular facilitam sua interação com as bactérias.

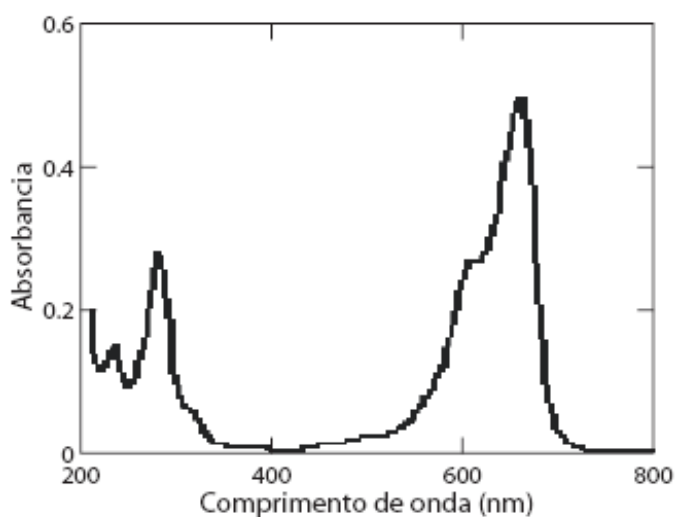


FIGURA 3 - Espectro de absorção do azul de metileno.

4.5 Fonte de Luz

Neste estudo utilizamos um laser de diodo (BWTEK Inc., Newark, DE), com potência de saída de 1 Watt e comprimento de onda de 665 nm. A luz foi entregue por uma fibra óptica. Na ponta desta fibra, para

permitir a expansão do feixe, foi acoplada uma lente específica. O formato de feixe gerado por este sistema permitiu uma irradiação pontual formada pelo *spot* uniformemente circular conforme ilustra a Figura 4. A potência do laser e a distância da saída do feixe à placa foi ajustada de acordo com as dimensões do campo de irradiação e as fluências (densidades de energia) estabelecidas. Esta condição permitiu exato ajuste da luz ao poço das placas. Cada placa recebeu apenas uma amostra para não haver qualquer interferência durante a irradiação conforme ilustra a Figura 5.

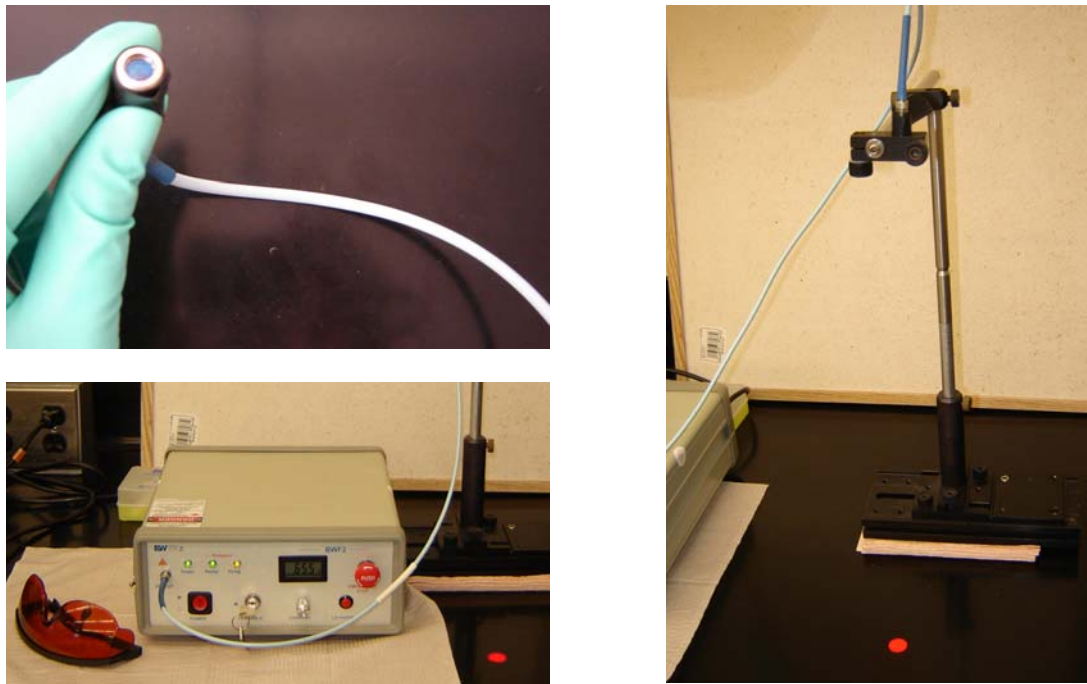


FIGURA 4 – Sistema laser utilizado (fibra, lentes e poste para ajuste da distância).

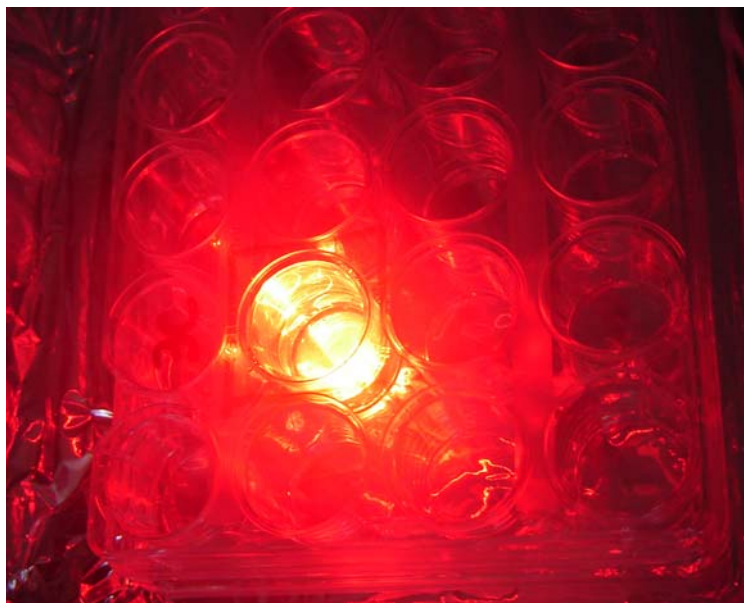


FIGURA 5 – Irradiação fixa, modo contínuo gerada pelas lentes da fibra óptica com diâmetro exato do poço da placa.

4.6 Grupos Estudados

Os experimentos realizados tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme, foram submetidos a fluências (densidades de energia) de 30 J/cm^2 e 60 J/cm^2 , na mesma irradiância (densidade de potência) de 100 mW/cm^2 (Tabela 1). A área iluminada possuía um diâmetro de 2 cm e o tempo de irradiação foi de 5 e 10 minutos, dependendo da fluência aplicada, 30 J/cm^2 e 60 J/cm^2 respectivamente. Na Tabela 1 também descrevemos as diferentes concentrações de azul de metileno utilizadas.

Tabela 1 – Diferentes concentrações utilizadas nos experimentos em fase planctônica (suspensão) e em biofilme e mesmos parâmetros de irradiação

	Concentração Fotossensibilizador	Concentração Fotossensibilizador	Fluência	Irradiância
Fase Planctônica (Suspensão)	12.5 µg/mL	25 µg/mL	30J/cm² e 60J/cm²	100 mW/cm²
Biofilme	50 µg/mL	25 µg/mL	30J/cm² e 60J/cm²	100 mW/cm²

A potência do laser na saída da fibra foi verificada antes de cada irradiação, utilizando o power meter Coherent (FM-LM 10). A potência aplicada foi de 314 mW. Durante o procedimento da aplicação do laser, óculos de proteção foram usados pelos operadores.

4.7 Experimentos em Fase Planctônica (Suspensão)

Como descrito anteriormente, as amostras de placa bacteriana colhidas de pacientes com doença periodontal foram separadas da solução anaeróbia pré-reduzida (PRAS) e, após homogenizada em caldo de BHI, a densidade óptica foi obtida em espectrofotômetro (600 nm).

Para a realização do experimento, alíquotas de 1 mL foram colocadas em tubos *Eppendorfs*, devidamente identificados de acordo com os grupos estudados. Para permitir a adição do fotossensibilizador, estes tubos *Eppendorfs* foram novamente centrifugados para separar o caldo de BHI da placa decantada. Aspiramos e descartamos o BHI e adicionamos 1mL da solução de azul de metileno na concentração apropriada para cada fase testada (planctônica e biofilme). No grupo controle (L-D-) e no grupo que recebeu apenas a irradiação laser (L+D-) 1 mL do caldo de BHI sem adição de corantes foi utilizado para ressuspender a placa decantada. Na sequência, levamos estas amostras para placas de 24 poços e aguardamos o tempo de incubação (pré-irradiação) adequado para cada um dos grupos analisados. As amostras foram irradiadas uma a uma em temperatura ambiente, de acordo com as fluências previamente estabelecidas. Para cada grupo estudado, fizemos 4 repetições. Para simular as mesmas condições, o grupo controle (L-D-), que não foi exposto ao fotossensibilizador ou ao laser, também foi colocado nos poços da placa em temperatura ambiente pelo mesmo tempo utilizado para a incubação e irradiação dos outros grupos.

Após a incubação e ou irradiação, aspiramos a amostra (1mL) da placa de 24 poços e levamos para *Eppendorfs* devidamente identificados. Centrifugamos novamente estes tubos para retirar o fotossensibilizador aplicado, ou o caldo de BHI para os grupos controle e apenas laser (L+D-). Esta etapa é de extrema importância, especialmente

para os grupos onde o fotossensibilizador foi empregado, uma vez que o tempo de incubação não deve ser infinitamente prolongado. Após a centrifugação, aspiramos e descartamos o sobrenadante, fazendo com que todas as amostras tivessem o mesmo tratamento. Ressuspendemos todos os grupos em caldo de BHI e fizemos as diluições seriadas.

4.8 Tempo de incubação ou pré-irradiação

Nas Tabelas 2 e 3 mostramos um resumo das drogas utilizadas durante a incubação ou pré-irradiação e o tempo necessário para este procedimento de acordo com cada grupo avaliado. Chamamos “tempo de incubação” nos grupos onde a irradiação laser não foi aplicada. Nos grupos L+D- e L+D+ chamamos de “tempo de pré-irradiação”.

Tabela 2 – Parâmetros para o experimento no qual a fluência utilizada foi de 30 J/cm²

Grupos	Droga	Tempo de Incubação	Tempo de Incubação Pré Irradiação	Tempo de Irradiação 30J/cm ²
Controle L-D-	BHI	10 minutos	-	-
L-D+	Azul de Metileno	10 minutos	-	-
L+D-	BHI	-	5 minutos	5 minutos
L+D+	Azul de Metileno	-	5 minutos	5 minutos

Tabela 3 – Parâmetros para o experimento no qual a fluência utilizada foi de 60 J/cm²

Grupos	Droga	Tempo de Incubação	Tempo de Incubação Pré - irradiação	Tempo de Irradiação 60J/cm ²
Controle L-D-	BHI	15 minutos	-	-
L-D+	Azul de Metileno	15 minutos	-	-
L+D-	BHI	-	5 minutos	10 minutos
L+D+	Azul de Metileno	-	5 minutos	10 minutos

Para todos os poços que utilizamos o azul de metileno, durante o tempo de incubação ou pré-irradiação, as placas foram embrulhadas em papel alumino para proteger o fotossensibilizador da exposição à luz.

Conforme mencionado anteriormente, depois da terapia apropriada para cada grupo, diluições seriadas do conteúdo de cada poço foi individualmente realizada com caldo de BHI. Após as diluições seriadas, 100 µl das diluições 10² e 10³ foram plaqueadas em agar sangue enriquecido (experimento realizado em quadruplicata). As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose na presença de 80% N₂, 10% CO₂ e 10 % de H₂ na temperatura de 35°C por 7 dias.

A fração de microrganismos sobreviventes para cada poço teste foi calculada dividindo o número de unidades formadoras de colônia (u.f.c.) no grupo teste pelo número obtido no grupo controle (Apêndice 3 à 6) . Além da contagem bacteriana por meio de cultura em placas de agar, foi realizada a análise molecular para a identificação de 40 diferentes microrganismos por meio da técnica “Checkerboard DNA-DNA hybridization” que será detalhada posteriormente.

4.9 Experimentos em Biofilme

O biofilme foi desenvolvido in vitro em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. O biofilme desenvolvido e não submetido a nenhuma forma de terapia, chamamos de grupo controle. Diferentes concentrações de azul de metileno: 50 µg/mL e 25 µg/mL foram testadas em biofilme. Além da aplicação da droga como tratamento único, o efeito da irradiação com o laser de diodo operando em 665 nm em biofilme também foi investigada. As fluências (densidades de energia) testadas foram 30 J/cm² e 60 J/cm² ambas com irradiância de 100 mW/cm². Para os experimentos em biofilme, uma vez que a toxicidade no escuro do azul de metileno não foi alta, para o grupo PDT (L+D+) testamos diferentes concentrações deste fotossensibilizador: 50 µg/mL e 25 µg/mL.

Para o grupo controle (L-D-), 150 µL de BHI foi aplicado sobre o biofilme e incubado por 10 ou 15 minutos, simulando os mesmos

procedimentos realizados para os grupos teste. Após o período de incubação, aspiramos e descartamos este BHI. Raspamos cada um dos poços e colocamos a amostra deste biofilme em *Eppendorfs* devidamente identificados para posteriormente serem submetidos a diluições seriadas. Da mesma forma, este procedimento foi repetido para os outros grupos. Aplicamos a droga ou o caldo fresco de BHI, realizamos as devidas irradiações, raspamos o biofilme e colocamos as amostras em tubos *Eppendorf* específicos.

Depois de realizar o tratamento indicado para cada poço, diluições seriadas foram realizadas. Da mesma maneira que o experimento em suspensão, além da contagem bacteriana por meio de cultura em placas de agar, realizamos o checkerboard DNA-DNA hybridization para a identificação dos microrganismos presentes no biofilme.

4.10 Análise Molecular - *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

4.10.1 Preparo das Amostras

O processamento para a identificação dos microrganismos presentes tanto nos grupos controles quanto nos grupos tratados foi realizado através da técnica do “Checkerboard DNA-DNA hybridization” (Socransky et al.¹⁶⁰, 1994).

Após os experimentos e 7 dias de incubação, adicionamos 1ml de tampão tris-EDTA (TE buffer) em cada placa e raspamos as colônias da superfície utilizando alça de vidro estéril. Esta suspensão de colônias, removida das placas foram colocadas em tubos *Eppendorfs* individuais e submetidas ao ultra-som por 10 segundos para romper a célula bacteriana. Cada suspensão foi ajustada a uma densidade óptica final de 1 (um) (DO = 1.0), o que corresponde a aproximadamente 10^9 células. Dez microlitros ($10\ \mu\text{L}$) da suspensão (10^9 células) foram aspirados e colocados em um outro Eppendorf contendo $140\ \mu\text{L}$ de tampão tris-EDTA e $150\ \mu\text{L}$ de 0.5 M de hidróxido de sódio (NaOH).

Estas suspensões foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e em seguida neutralizadas com a adição de $900\ \mu\text{L}$ de acetato de amônia (5 M), que permitiu a lise e suspensão do DNA na solução. As amostras contendo o DNA aberto foram depositadas na membrana de nylon carregada positivamente (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), previamente acomodada numa placa metálica contendo 30 canaletas, aparato denominado Minislot 30 (Immunetics, Cambrige, Mass). O conjunto, membrana e Minislot 30 foi aparafusado sobre uma base de acrílico, conforme ilustra a Figura 6. Cada membrana de nylon medindo $15 \times 15\ \text{cm}$ permitiu depositar até 28 diferentes amostras, além das últimas canaletas que utilizamos para a colocação das amostras padrão. Estas duas amostras são consideradas controles, uma vez que

contém o DNA dos 40 microrganismos investigados, nas concentrações de 1 ng (10^5 bactéria) e 10 ng (10^6 bactéria) de cada espécie bacteriana.

Para a fixação do DNA das amostras na membrana, abrimos o Minislot e retiramos a membrana cuidadosamente sem tocar na superfície. Colocamos esta membrana no aparelho UV Stratalinker por aproximadamente 3 minutos e posteriormente em estufa a 120 °C por 15 minutos (Figura 7).

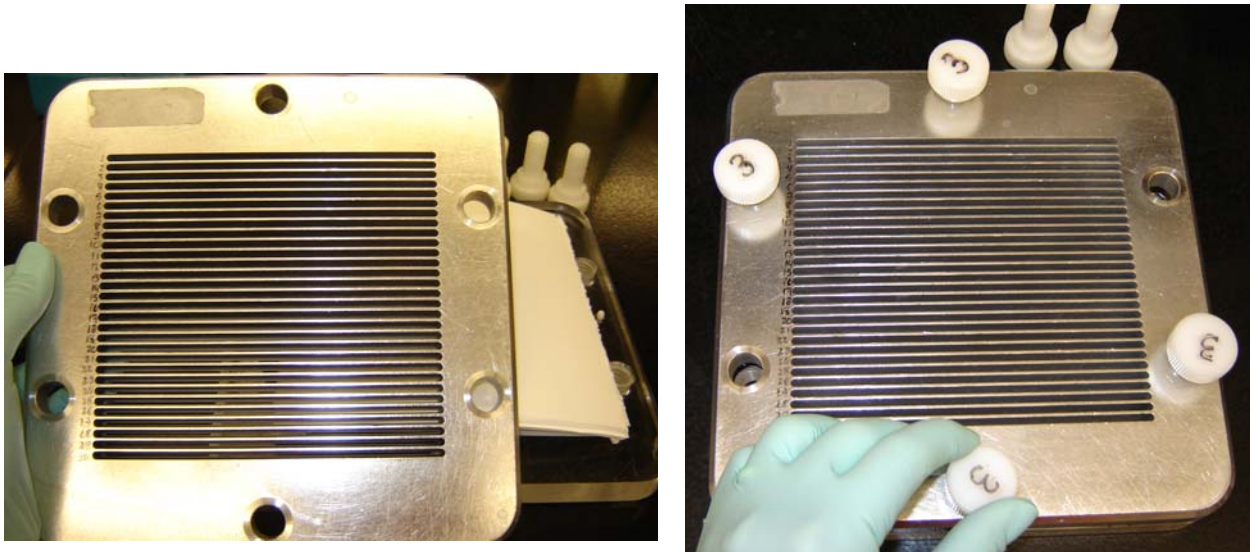


FIGURA 6 - Conjunto, membrana e Minislot 30, aparafusado sobre uma base de acrílico.



FIGURA 7 - UV Stratalinker[®]: fixação do DNA das amostras na membrana.

4.10.2 Pré hibridização e Hibridização das Membranas

A pré hibridização bloqueia as áreas não específicas da membrana e a hibridização irá permitir o anelamento do DNA complementar.

Pré hibridização

Após a fixação do DNA, passamos as membranas duas vezes na solução SSC (NaCl, NaCitrato, NaH₂PO₄ e água) e em seguida colocamos em sacolas com solução de pré-hibridização (50% de formamida, 1% de caseína, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura). Selamos e levamos para a estufa a 42°C por ao menos uma hora.

Para realizar a análise molecular - *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, empregamos 40 sondas de DNA (Tabela 4). Estas sondas

foram confeccionadas usando o “Random primer digoxigenin labeling kit” (Roche Diagnostics, Germany). Antes de utilizar as sondas, realizamos o “probe test”. Cada sonda é individualmente ajustada para permitir a detecção de sinais de cada espécie de acordo com a concentração de cada sonda de DNA. Este procedimento foi realizado para promover a mesma sensibilidade de detecção para as diferentes espécies.

Tabela 4 - Cepas obtidas da ATCC (American Type Culture Collection), Forsyth Institute e Complexos microbianos descritos por Socransky et al.¹⁵⁹ (1998)

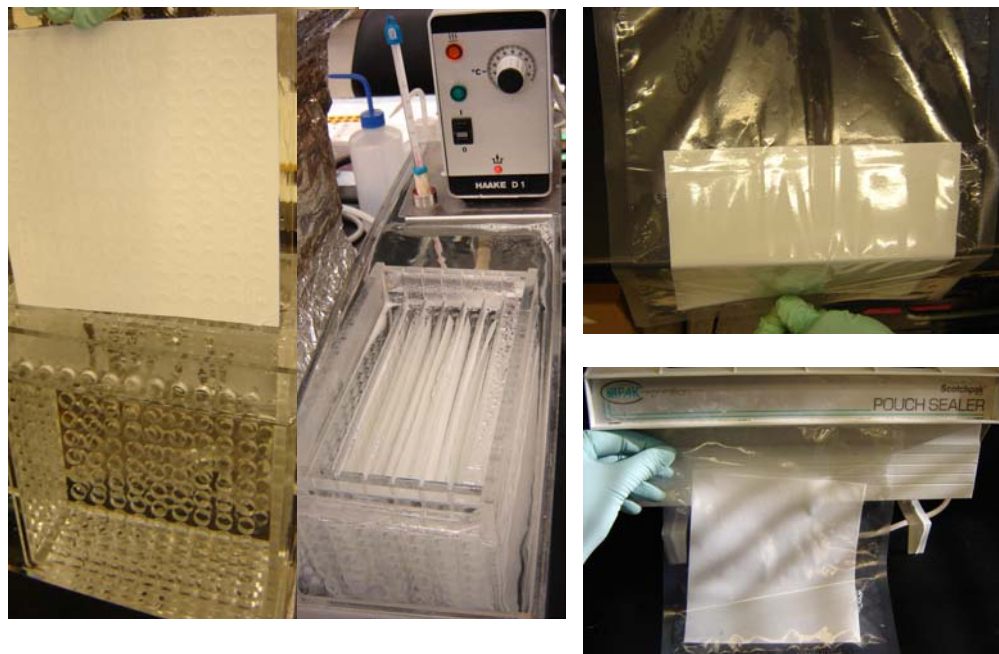
ATCC #	Cepas – Sondas	Complexos microbianos
12104	<i>Actinomyces naeslundii I</i>	Complexo Vermelho
27823(M32b)	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>
33099	<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
33277	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema denticola</i>
43718	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (a)</i>	
29523	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (b)</i>	Complexo Laranja
49256	<i>Fusobacterium nucleatum sp. Vincentii</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
33238 (371)	<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
D40DR2	<i>Treponema socranskii</i>	<i>Campylobacter showae</i>
33271	<i>Eubacterium saburreum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i>
33270	<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>
		<i>Fusobacterium nucleatum sp. vincentii</i>
10790	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
43146	<i>Actinomyces viscosus (naeslundii genospecies 2)</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
33397	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
10556	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
23860	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
35037	<i>Streptococcus oralis</i>	
33596 (25)	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Complexo Amarelo
12102	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
27335	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
B1	<i>Treponema denticola</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
		<i>Streptococcus oralis</i>
33563	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
17929	<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	
10953	<i>Fusobacterium nucleatum sp. Polymorphum</i>	Complexo Verde
51146	<i>Campylobacter showae</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (a)</i>
33693	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
19696	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
25586	<i>Fusobacterium nucleatum sp. Nucleatum</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
33624 (27)	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
10558	<i>Streptococcus gordonii</i>	
43037 (338)	<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (b)*</i>
43541	<i>Selenomonas noxia</i>	Complexo Roxo
11827	<i>Propionibacterium acnes I</i>	<i>Actinomyces odontolyticus I</i>
11828	<i>Propionibacterium acnes II</i>	<i>Veillonella parvula</i>
25845	<i>Prevotella melaninogenica</i>	
49456	<i>Streptococcus mitis</i>	Complexo Azul
23834	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Actinomyces gerencseriae</i>
27824	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
33612 (4)	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Actinomyces naeslundii I</i>
14201	<i>Leptotrichia buccalis</i>	<i>Actinomyces viscosus (naeslundii genospecies 2)</i>
33236 (1084)	<i>Campylobacter gracilis</i>	
25611	<i>Prevotella intermedia</i>	

Hibridização

Após ao menos uma hora em estufa, cada membrana foi retirada das sacolas com solução de pré-hibridização e colocada no aparato de acrílico Miniblotter 45 (Immunetics). Este Miniblotter possui 45 canaletas, nas quais colocamos uma a uma as 40 sondas de DNA marcadas com digoxigenina. As sondas foram preparadas com solução de hibridização (45% de formamida, 2xSSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 15 de caseína e 20 ng/ml de sonda de DNA). As sondas foram dispostas perpendicularmente às amostras previamente fixadas na membrana, propiciando um xadrez formado pelo cruzamento das amostras com as sondas de DNA. A cada 10 sondas, uma canaleta foi deixada em branco sendo preenchida apenas com a solução de hibridização. O aparato Miniblotter 45 foi devidamente fechado em uma embalagem plástica com água destilada para evitar desidratação, e mantido por 24 horas à 42°C para ocorrer a hibridização das amostras fixadas na membrana com as sondas.

Após a hibridização, removemos as membranas do Miniblotter e lavamos por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, fizemos mais duas lavagens de 20 minutos à 68 °C no “disc wisk” (Figura 8A), numa solução de fosfato (PO₄) (0,1 XSSC, 0,1% SDS) a fim de remover o excesso das sondas que não hibridizaram completamente. Posteriormente, colocamos as membranas por uma hora numa solução contendo 0,1 M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2 M de

NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% caseína (pH 8,0) e por 30 minutos na mesma solução contendo 3,3 μ L por membrana do anticorpo Anti-digoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina (Anti-Dig –AP Fab Fragments Roche Diagnostics - Mannheim Germany) numa diluição de 1:10.000. Selamos as sacolas removendo todas as bolhas (Figura 8B) para permitir pleno contato da solução com a membrana enquanto esta estiver na máquina giratória. Na sequência, lavamos as membranas em ácido maleico por um minuto para remover a solução conjugada (Anti-digoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina). Repetimos a lavagem com ácido maleico por 3 vezes por 15 minutos cada. No próximo passo, ainda para remover possíveis excessos de solução conjugada, lavamos as membranas por 5 minutos com solução tampão. Após esta lavagem de 5 minutos, diluímos 1 mL de Atto-Phos (ECF Substrate) em 4 mL de solução tampão (por membrana) e mergulhamos cada membrana nesta solução, de forma a cobrir toda sua extensão. Finalmente, colocamos as membranas em um plástico apropriado para a leitura no scanner. Envoltas em papel alumínio, armazenamos estas membranas em temperatura ambiente e protegida da luz por 24 horas.



A- Removendo o excesso das sondas que não hibridizaram completamente.

B- Membrana sendo selada com anticorpo (Anti-digoxigenina) conjugado com a fosfatase alcalina.

FIGURAS 8A e 8B – Hibridizando a membrana

4.10.3 Detecção dos sinais fluorescentes

As sondas de DNA foram detectadas com Anti-dig (anticorpo para digoxigenina), o qual conjugado a fosfatase alcalina produz quimiofluorescência. Os sinais da fluorescência foram detectados com a adição do substrato AttoPhos (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill) e scaneados com o Storm Fluorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.), conforme mostrado na Figura 9.

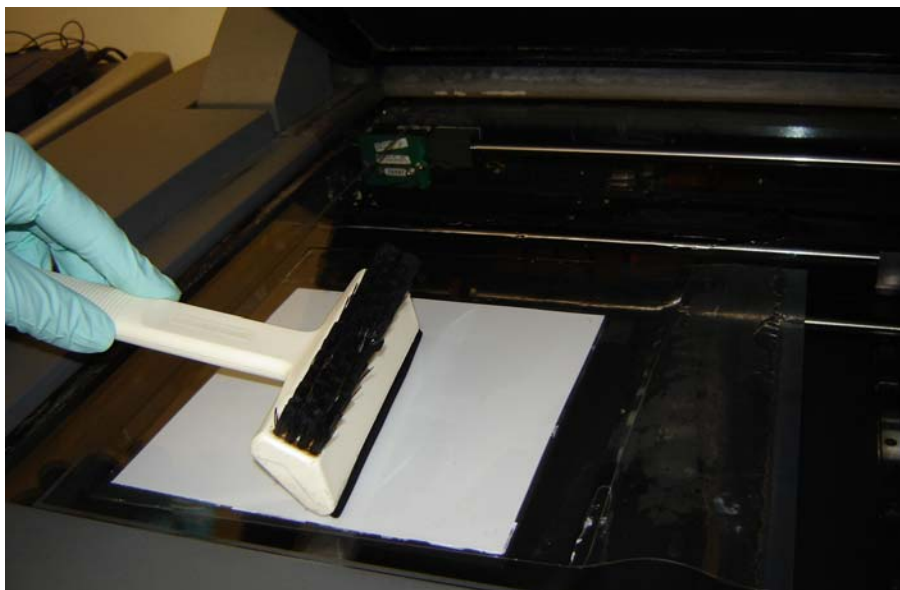


FIGURA 9 - Remoção de bolhas entre a membrana e o plástico para realizar a leitura dos sinais da fluorescência no scanner (Storm Fluorimager).

As imagens dos sinais fluorescentes emitidos pelas membranas foram capturadas durante o “scaneamento” e transferidas para um computador especial (*Sun, work station*), o qual converte cada sinal desta fluorescência em número de bactérias. Esta tradução da fluorescência é realizada de acordo com a intensidade das amostras padrão (10^5 e 10^6). Para a leitura destes sinais de fluorescência, cada membrana foi alinhada em uma grade utilizando um programa computacional especialmente elaborado (Figura10).

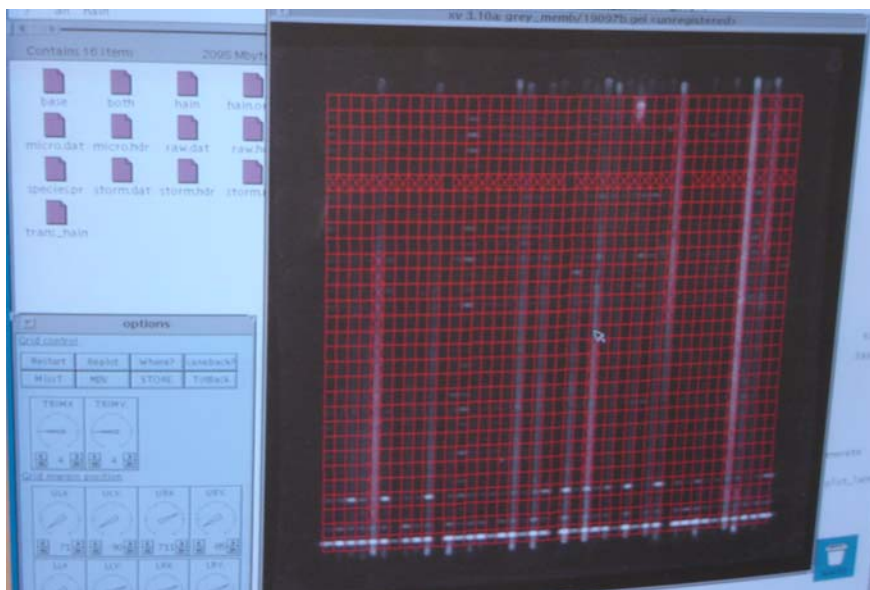


FIGURA 10 - Programa para alinhar os sinais de fluorescência de cada membrana.

Como dito anteriormente, a leitura dos resultados foi feita através da comparação dos sinais das amostras com os padrões feitos a partir do DNA de todas as bactérias que estão sendo pesquisadas. Nas últimas canaletas do Minislot 30, colocamos os controles (padrões) equivalentes a 10^5 e 10^6 células. Desta forma, obtivemos um número de células bacterianas para cada amostra. As medidas da intensidade de fluorescência foram convertidas em números absolutos por comparação com os padrões da mesma membrana (números mostrados no Apêndice 2). Onde não encontramos sinal, o número zero foi estabelecido.

As duas últimas colunas à direita são os padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada espécie analisada. Na horizontal, estão as sondas de DNA diluídas em solução de hibridização. Os sinais observados na interseção das canaletas verticais com as canaletas

horizontais indicam a presença de certa espécie (Figura 11). A intensidade do sinal é relacionada com o número de microrganismos daquela espécie em cada amostra dos diferentes grupos de tratamento.

A partir destes números, a inibição do crescimento bacteriano foi definido pela taxa da contagem de sonda de DNA do grupo controle (L-D-) em relação aos grupos L-D+ (apenas droga), L+ D- (apenas laser), L+D+ (laser e droga) . As diferenças entre as médias das taxas ou porcentagens de redução foram analisadas pelo teste estatístico *T de student* ($P<0,05$).

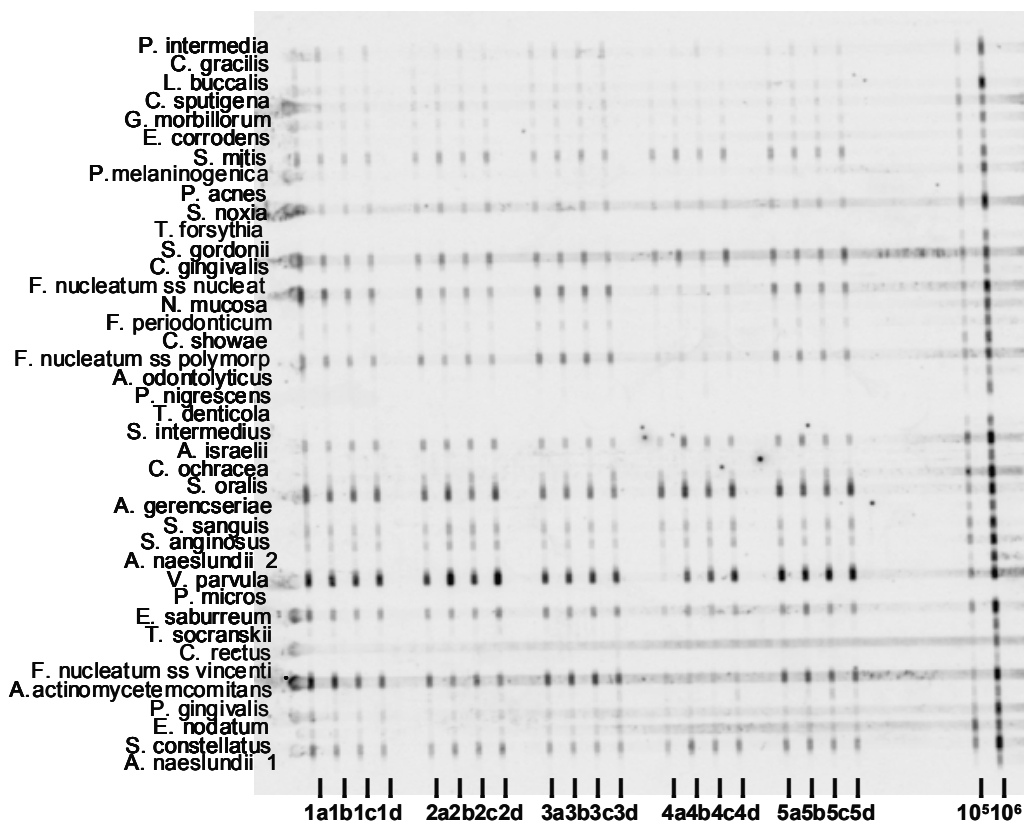


FIGURA 11 - Exemplo da imagem da membrana do checkerboard DNA-DNA hybridization usada para detectar 40 espécies bacterianas. Cada quatro colunas representam um diferente grupo de tratamento testados em amostras de um mesmo paciente. Números de 1a - 1d representam o grupo controle L -D -, 2a - 2d L-D+ (12.5 $\mu\text{g/mL}$), 3a - 3d grupo L+D- (100mW/cm²), 4a - 4d grupo PDT (L+D+) usando 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5a - 5d apenas droga com concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

5 Resultado

5.1 Cultura Microbiana

5.1.1 Experimentos em fase planctônica (suspensão)

Os grupos analisados em fase planctônica ou suspensão foram: L-D-, L-D+, L+D- e L+D+. Para o grupo controle (L-D-) nenhuma droga ou luz foi aplicada. Para analisar a toxicidade da droga no escuro (L-D+) utilizamos o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL. No grupo L+D-, nenhuma droga foi utilizada e aplicamos a irradiação laser nas fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm² ambas com intensidade de 100mW/cm². Finalmente, para o grupo PDT (L+D+) utilizamos o fotossensibilizador na concentração de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL associados a irradiações de 30 J/cm² e 60 J/cm².

Na Tabela 5 e no Gráfico 1 apresentamos, em porcentagem de sobrevivência, a média dos resultados obtidos nos experimentos planctônicos utilizando o fotossensibilizador na concentração de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL e fluência de 30 J/cm².

A porcentagem de sobrevivência bacteriana foi definida como sendo a média da contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c) presentes nos grupos teste dividida pela média de u.f.c. contadas no grupo controle. Os dados que geraram estas médias assim como as análises estatísticas serão apresentadas no Apêndice. As diferenças entre

as médias das porcentagens foram analisadas pelo teste estatístico

Anova e Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 5 – Dados expressos em porcentagem de sobrevivência referentes ao experimento realizado em fase planctônica (suspensão), utilizando duas diferentes concentrações de azul de metileno e fluência de 30 J/cm²

L-D- Controle	L-D+ 12,5 µg/ mL	L+D- 30 J/cm ²	L+D+ 12,5 µg/ mL 30 J/cm ²	L-D+ 25µg/mL
100 %	91,89 %	98,72 %	29,48 %	41,18 %
Erro Padrão	14,95	16,02	12,29	6,40

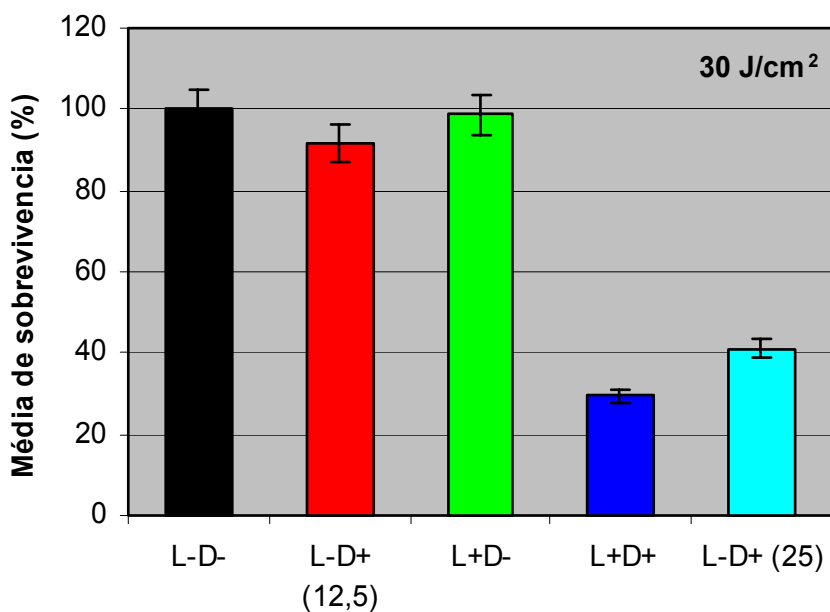


GRÁFICO 1 - Média da sobrevivência expressa em porcentagem (%) para cada um dos grupos testados: controle (L-D-), apenas droga na concentração de 12,5 µg/mL (L-D+), apenas irradiação com laser de diodo na fluência de 30 J/cm² (L+D-), PDT (L+D+) utilizando a droga na concentração de 12,5 µg/ mL associada à irradiação laser na fluência de 30 J/cm² e o grupo apenas da droga (L-D+) na concentração de 25 µg/mL.

Na Tabela 6 e no Gráfico 2 apresentamos os dados obtidos no experimento planctônico, utilizando o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 12,5 µg e 25 µg/mL, com parâmetro de irradiação de 60 J/cm².

Tabela 6 -Dados expressos em porcentagem de sobrevivência referentes ao experimento realizado em fase planctônica (suspensão) utilizando azul de metileno na concentração de 12,5 µg/ mL e 25 µg/ mL e fluência de 60 J/cm²

L-D- Controle	L-D+ 12,5 µg/ mL	L+D- 60 J/cm ²	L+D+ 12,5 µg/ mL 60 J/cm ²	L-D+ 25µg/mL
100 %	69,36 %	75,81 %	19,78 %	30,11 %
Erro Padrão	11,79	6,25	4,49	6,35

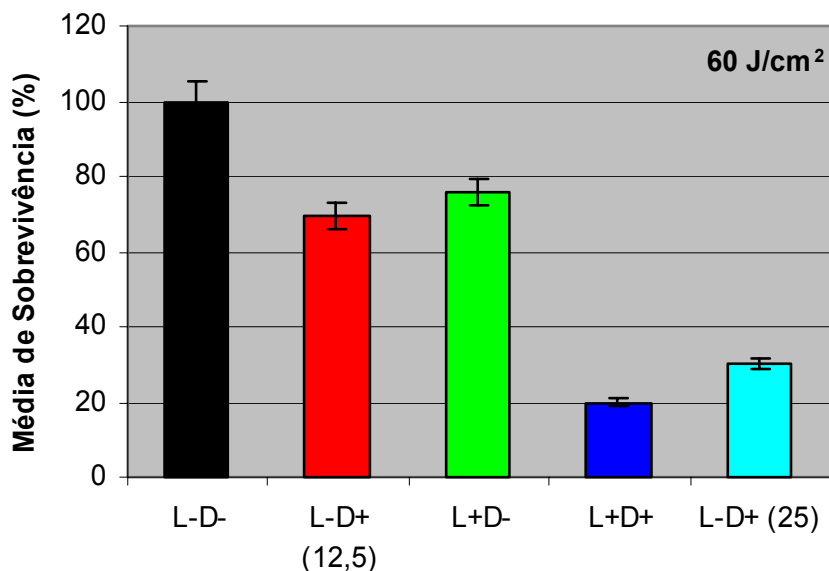


GRÁFICO 2 – Média da sobrevivência expressa em porcentagem (%) para cada um dos grupos testados: controle (L-D-), apenas droga na concentração de 12,5 µg/mL (L-D+), apenas irradiação com laser de diodo na fluência de 60 J/cm² (L+D-), PDT (L+D+) utilizando a droga na concentração de 12,5 µg/ mL associada à irradiação laser na fluência de 60 J/cm² e o grupo apenas droga (L-D+) na concentração de 25 µg/mL.

A seguir descreveremos os resultados da fase planctônica (suspensão) apresentados nos Gráficos 1 e 2 (referentes as Tabelas 5 e 6) detalhando os aspectos mais importantes.

a. Toxicidade do fotossensibilizador no escuro (L-D+)

Para os experimentos em fase planctônica (ou suspensão) descritos anteriormente, uma alta toxicidade da droga foi observada quando utilizamos o azul de metileno na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Analisando apenas o efeito do fotossensibilizador na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, após 10 minutos de incubação, encontramos uma sobrevivência de 40% (redução de 60%) e após 15 minutos de incubação, 30% de sobrevivência (redução de 70%), conforme ilustrado nos Gráficos 1 e 2. Entretanto, usando este mesmo fotossensibilizador, porém em uma concentração menor (12,5 $\mu\text{g/mL}$), obtivemos uma toxicidade muito reduzida. O grupo L-D+ (12,5 $\mu\text{g/mL}$), presente nos Gráficos 1 e 2, relata esta menor toxicidade com sobrevivência de 92% (redução de 8%) quando o tempo de incubação foi de 10 minutos e sobrevivência de 70% (30% de redução) quando a incubação foi de 15 minutos na presença de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ do azul de metileno.

b. Efeitos da irradiação laser (L+D-)

Considerando a irradiação laser como procedimento único, denominada nos Gráficos 1 e 2 de grupo L+D- nenhuma redução

bacteriana estatisticamente significativa foi observada quando as amostras receberam a irradiação com o laser de diodo operando em 665 nm com fluência de 30 J/cm². No entanto, quando a fluência utilizada foi duas vezes maior (60 J/cm²), observamos uma redução de 25% das bactérias em fase planctônica.

c. Terapia fotodinâmica (L+D+)

O efeito da terapia fotodinâmica, grupo L+D+, em bactérias na fase planctônica (ou suspensão) utilizando o azul de metileno na concentração de 12,5 µg/mL e irradiação laser nas fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm² é mostrado nos Gráficos 1 e 2 respectivamente. De acordo com os resultados apresentados nestes gráficos, observamos que para o grupo L+D+, onde a terapia fotodinâmica (PDT) foi aplicada, obtivemos uma maior redução bacteriana.

As bactérias em suspensão foram 70 % eliminadas quando, após a sensibilização com azul de metileno, irradiamos as amostras com fluência de 30 J/cm². Quando utilizamos o mesmo de tempo de incubação e a mesma concentração do fotossensibilizador (12,5 µg/mL), porém com uma fluência de 60 J/cm² obtivemos uma sobrevivência de 20% (redução de 80%) das bactérias em suspensão.

5.1.2 Experimentos em Biofilme

Os grupos analisados em biofilme foram: L-D-, L-D+, L+D- e L+D+. Para o grupo controle (L-D-) nenhuma droga ou luz foi aplicada. Para analisar a toxicidade da droga no escuro (L-D+) utilizamos o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL. No grupo L+D-, nenhuma droga foi utilizada e aplicamos a irradiação laser nas fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm². Finalmente, para o grupo PDT (L+D+) utilizamos o fotossensibilizador na concentração de 25 µg/mL e 50 µg/mL, associado a irradiações de 30 J/cm² e 60 J/cm².

Na Tabela 7 e no Gráfico 3 apresentamos os dados obtidos no experimento em biofilme utilizando o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL, com parâmetro de irradiação 30 J/cm².

Tabela 7 - Dados expressos em porcentagem de sobrevivência, referentes aos experimentos realizados em biofilme utilizando duas diferentes concentrações de azul de metileno e fluência de 30 J/cm²

Controle L-D-	L-D+ 50 µg/mL	L+D- 30 J/cm ²	L+D+ 50 µg/mL	L-D+ 25 µg/mL	L+D+ 25 µg/mL
100 %	88,22%	103,27 %	72,98 %	96,15 %	91,69 %
Erro Padrão	6,34	5,22	11,72	3,738	4,28

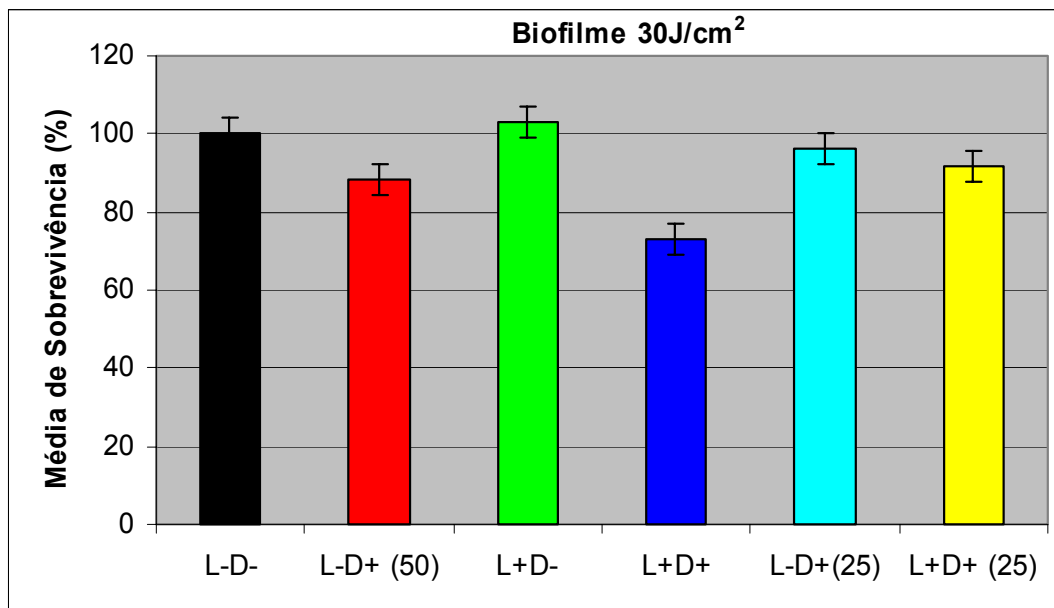


GRÁFICO 3 – Média da sobrevivência das bactérias em biofilme expressa em porcentagem para cada um dos grupos testados: controle (L-D-), apenas droga na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (L-D+), apenas irradiação com laser de diodo na fluência de 30 J/cm^2 (L+D-), PDT (L+D+) utilizando a droga na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ associada à irradiação laser na fluência de 30 J/cm^2 , o grupo apenas droga (L-D+) na concentração 25 $\mu\text{g/mL}$ e o grupo PDT onde a droga na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foi associada à irradiação também na fluência de 30 J/cm^2

Na Tabela 8 e no Gráfico 4 apresentamos os dados obtidos no experimento em biofilme utilizando o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, com parâmetro de irradiação 60 J/cm^2 .

Tabela 8 – Dados expressos em porcentagem de sobrevivência referente aos experimentos realizados em biofilme utilizando duas diferentes concentrações de azul de metileno e fluência de 60 J/cm²

L-D-	L-D+ 50 µg/mL	L+D- 60 J/cm ²	L+D+ 50 µg/mL	L-D+ 25 µg/mL	L+D+ 25 µg/mL
100 %	81,84 %	89,31 %	60,89 %	92,91 %	75,15 %
Erro Padrão	5,59	16,63	7,36	6,55	7,87

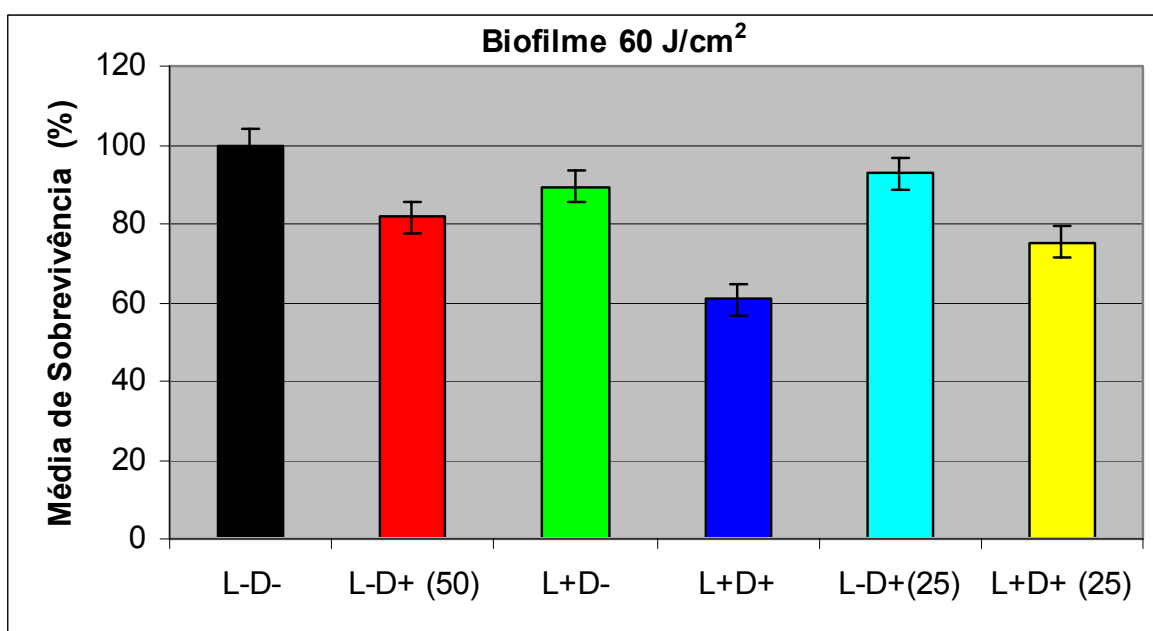


GRÁFICO 4 – Média da sobrevivência das bactérias em biofilme expressa em porcentagem para cada um dos grupos testados: controle (L-D-), apenas droga na concentração de 50 µg/mL (L-D+), apenas irradiação com laser de diodo na fluência de 60 J/cm² (L+D-), PDT (L+D+) utilizando a droga na concentração de 50 µg/ mL associada à irradiação laser na fluência de 60 J/cm², o grupo apenas droga (L-D+) na concentração 25 µg/mL e o grupo PDT (25 µg/mL e fluência 60 J/cm²).

A seguir, descreveremos os resultados em biofilme detalhando os aspectos mais importantes.

a. Toxicidade do fotossensibilizador no escuro (L-D+)

Diferente da alta toxicidade observada quando utilizamos 25 $\mu\text{g/mL}$ em fase planctônica (suspensão), para os experimentos em biofilme, mostrados nos Gráficos 3 e 4, mesmo a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ não causou toxicidade alta. Observamos uma sobrevivência de 96% e 91% (redução de 4 % e 9 %) quando usamos 25 $\mu\text{g/mL}$ de azul de metileno por, respectivamente, 10 e 15 minutos de incubação. Empregando a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, obtivemos uma sobrevivência de 88% (12 % de redução) de bactérias do biofilme quando o azul de metileno foi incubado por 10 minutos e a máxima toxicidade atingida no escuro (grupo L-D+) foi de 19 % (sobrevivência de 81%) com 15 minutos de incubação.

b. Efeitos da irradiação laser (L+D-)

Considerando a irradiação laser como procedimento único, denominada nos Gráficos 3 e 4 de grupo L+D- , nenhuma redução bacteriana estatisticamente significativa foi observada para as amostras que receberam a irradiação na fluência de 30 J/cm^2 . No entanto, quando utilizamos fluência de 60 J/cm^2 , observamos uma discreta redução de 10% das bactérias em biofilme (sobrevivência de 90%).

c. Terapia fotodinâmica (L+D+)

Para os experimentos do grupo terapia fotodinâmica em biofilme (L+D+), testamos duas diferentes concentrações do fotossensibilizador (25 µg/mL e 50 µg/mL) uma vez que a toxicidade deste corante no escuro não foi alta para bactérias em biofilme.

O efeito da terapia fotodinâmica em biofilme está mostrado nos Gráficos 3 e 4. Utilizando o azul de metileno na concentração de 25 µg/mL e irradiação com fluência de 30 J/cm² obtivemos uma taxa de sobrevivência de 91,6% (redução de 8,4 %) das bactérias em biofilme. Ainda com a mesma concentração do fotossensibilizador (25 µg/mL), porém com o dobro da fluência (60 J/cm²) observamos uma sobrevivência de 75% (redução de 25%) para as bactérias em biofilme.

Buscando alcançar melhor redução destas bactérias por meio da terapia fotodinâmica, testamos o azul de metileno na concentração de 50 µg/mL, mantendo os parâmetros de irradiação em 30 J/cm² e 60 J/cm². Com a menor fluência, obtivemos sobrevivência em torno de 73% (redução de 27%) de bactérias do biofilme. Porém, utilizando 60 J/cm² atingimos 40% de redução das bactérias em biofilme (60% de sobrevivência).

No Gráfico 5 (referente aos dados da Tabela 9) apresentamos os resultados comparativos entre os experimentos em fase planctônica e biofilme.

Tabela 9 - Resultados comparativos entre fase planctônica e biofilme.

Diferentes concentrações do fotossensibilizador (12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$) e fluências (30 J/cm^2 e 60 J/cm^2)

Grupos Concentração / Fluência	Planctônico 12,5$\mu\text{g/mL}$ 30 J/cm^2	Planctônico 12,5$\mu\text{g/mL}$ 60 J/cm^2	Biofilme 50 $\mu\text{g/mL}$ 30J/cm^2	Biofilme 50 $\mu\text{g/mL}$ 60J/cm^2
Droga (L-D+)	91,8 %	69,3 %	88,2 %	81,8 %
Erro	14,9	11,7	6,3	5,5
Laser (L+D-)	98,7 %	75,8 %	103,2 %	89,3 %
Erro	16	6,2	5,2	16,6
PDT (L+D+)	29,48 %	19,7 %	72,9 %	60,8 %
Erro	12,29	4,4	11,7	7,36

As barras amarelas correspondem aos resultados para fase planctônica. Na presença de fotossensibilizador (L-D+ e L+D+), este foi utilizado na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Para o grupo que recebeu a irradiação laser (L+D- e L+D+), a densidade de energia foi de 30 J/cm^2 . As barras vermelhas representam as mesmas descrições, exceto que a densidade de energia, quando utilizada, foi de 60 J/cm^2 .

As barras azuis e verdes correspondem aos resultados em biofilme. Na presença de fotossensibilizador, este foi utilizado na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para o grupo que recebeu a irradiação laser, a densidade de energia foi de 30 J/cm^2 (barras azuis) e de 60 J/cm^2 (barras verdes).

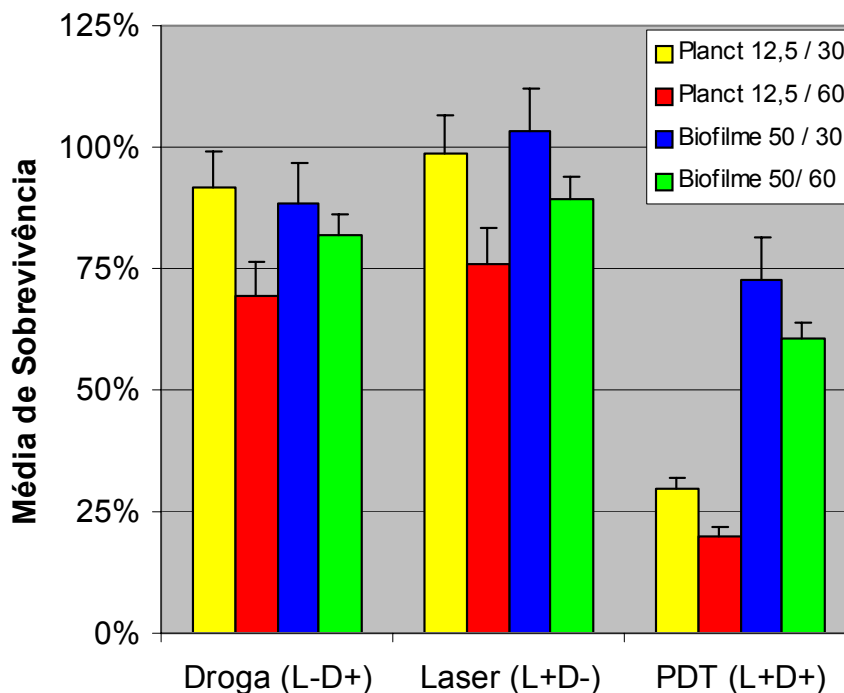


GRÁFICO 5 - Porcentagem de sobrevivência dos microrganismos em fase planctônica (ou suspensão) e em biofilme. Neste gráfico apresentamos apenas as concentrações de 12,5 µg/mL e 50 µg/mL do azul de metileno. As densidades de energia 30 J/cm² and 60 J/cm² foram utilizadas para ambas as fases: planctônica e biofilme. A porcentagem de sobrevivência foi definida de acordo com os dados do grupo controle que não recebeu nem o fotossensibilizador nem a luz. Cada valor representa a média dos valores obtidos em todos os experimentos. As barras de erro correspondem ao erro padrão das médias.

No Gráfico 6 abaixo podemos comparar isoladamente a diferença da sobrevivência encontrada nos experimentos em fase planctônica e nos experimentos em biofilme após ação da terapia fotodinâmica. Este gráfico demonstra ainda a importância de usar a dosimetria correta e a concentração ideal do fotossensibilizador para se obter melhores resultados para redução bacteriana.

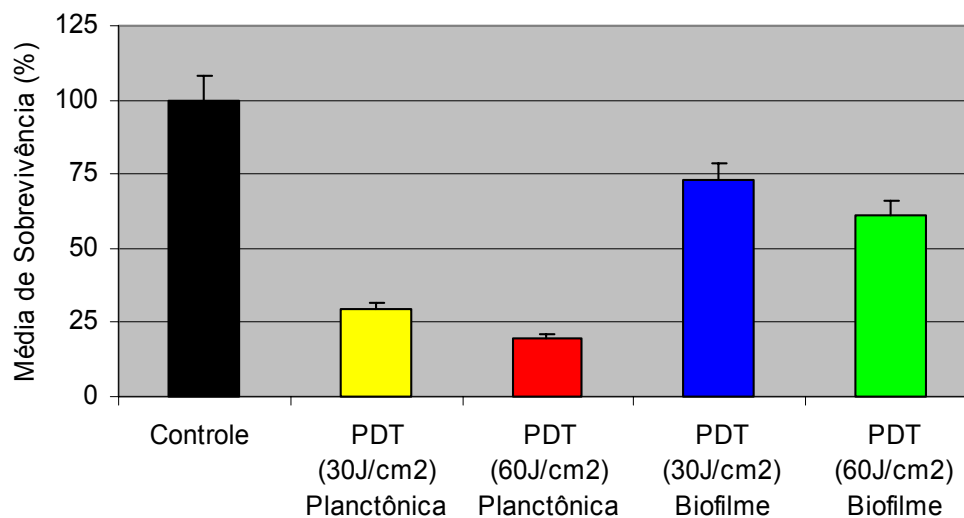


GRÁFICO 6 – Comparação do efeito da terapia (PDT) em fase planctônica (ou suspensão) utilizando 12,5 µg/mL de azul de metileno com a ação em biofilme utilizando a concentrações de 50 µg/mL.

5.2 Análise Molecular - Checkerboard DNA DNA hybridization

Análise dos sinais fluorescentes

A seguir apresentaremos os resultados obtidos a partir do estudo de 120 amostras coletadas de pacientes portadores de doença periodontal. Da mesma forma que os resultados descritos anteriormente, para a análise molecular também avaliamos a ação da terapia fotodinâmica tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme, conforme os grupos descritos abaixo.

Experimentos em fase planctônica (suspensão):

- Grupo Controle : L- D-
- Grupo Droga : L-D+ 12,5 µg/mL e L-D+ 25 µg/mL
- Grupo Laser : L+D- 30 J/cm² e L+D- 60 J/cm²
- Grupo PDT: L+D+ 12,5 µg/mL associado a 30 J/cm² e 60 J/cm²

Experimentos em biofilme:

- Grupo Controle: L- D-
- Grupo Droga: L-D+ 25 µg/mL e L-D+ 50 µg/mL
- Grupo Laser: L+D- 30 J/cm² e L+D- 60 J/cm²
- Grupo PDT : L+D+ 25 µg/mL e L+D+ 50 µg/mL associados a 30 J/cm² e 60 J/cm²

A análise molecular foi realizada por meio da técnica Checkerboard DNA -DNA hybridization. Os sinais fluorescentes gerados pelas membranas foram capturados, convertidos em números (mostrados no Apêndice 2) e analisados estatisticamente. Apresentaremos neste capítulo, em gráficos e tabelas, a média destes sinais para cada um dos experimentos realizados (planctônico e biofilme). No entanto, apesar de termos utilizado todos sinais das membranas para a confecção dos gráficos, mostraremos no início de cada sessão apenas uma membrana de cada grupo estudado apenas como ilustrações.

5.2.1 Experimentos em fase planctônica - $30 J/cm^2$

Na Figura 12 mostramos como ilustração, uma das membranas referentes ao experimento em fase planctônica. Podemos observar os sinais de fluorescência obtidos para cada bactéria nos diferentes grupos estudados.

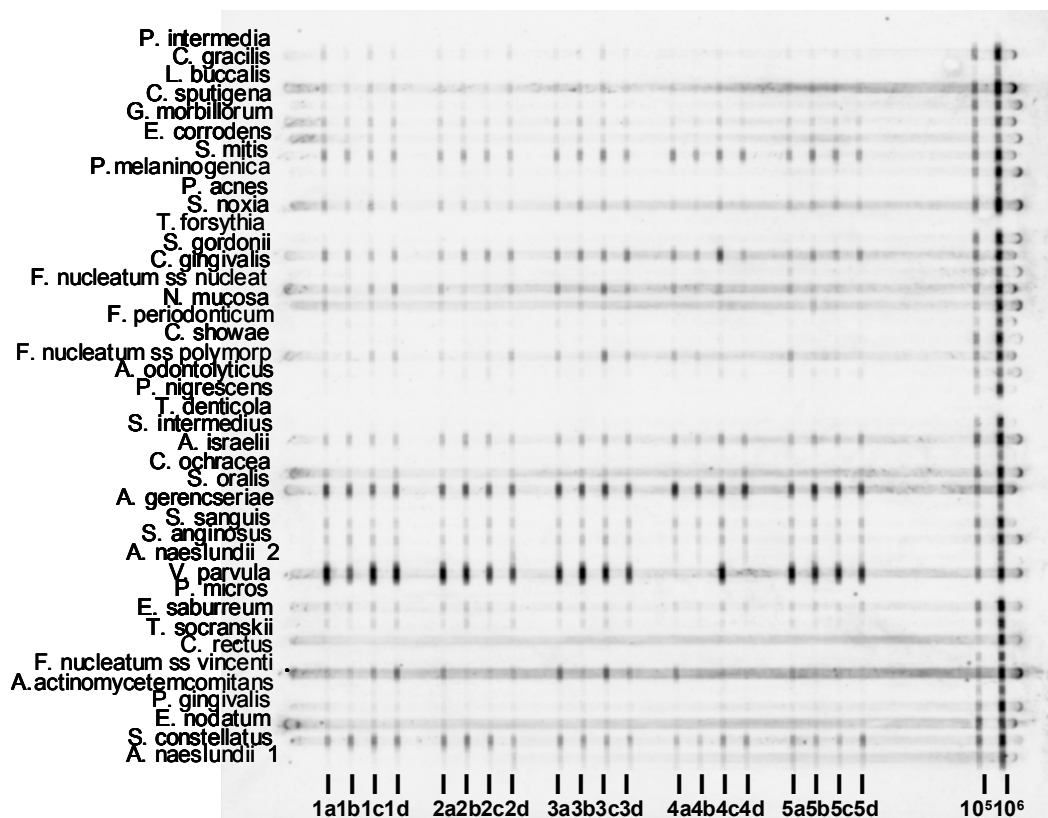


FIGURA 12 - Membrana referente ao experimento realizado em fase planctônica. Nas linhas verticais apresentamos os grupos que foram analisados: 1(L- D-), 2(L-D+)12,5 µg/mL, 3(L+D-) 30J/cm², 4 (L+D+) 12,5 µg/mL e 30J/cm², 5(L-D+) 25 µg/mL. As últimas duas canaletas representam os padrões nas concentrações de 1ng (10⁵ bactéria) e 10 ng (10⁶ bactéria) de cada espécie bacteriana. Nas linhas horizontais estão os 40 microrganismos investigados.

O Gráfico 7 mostra de maneira global a redução na contagem do DNA bacteriano encontrada após PDT em fase planctônica, aplicando a fluência de 30 J/cm².

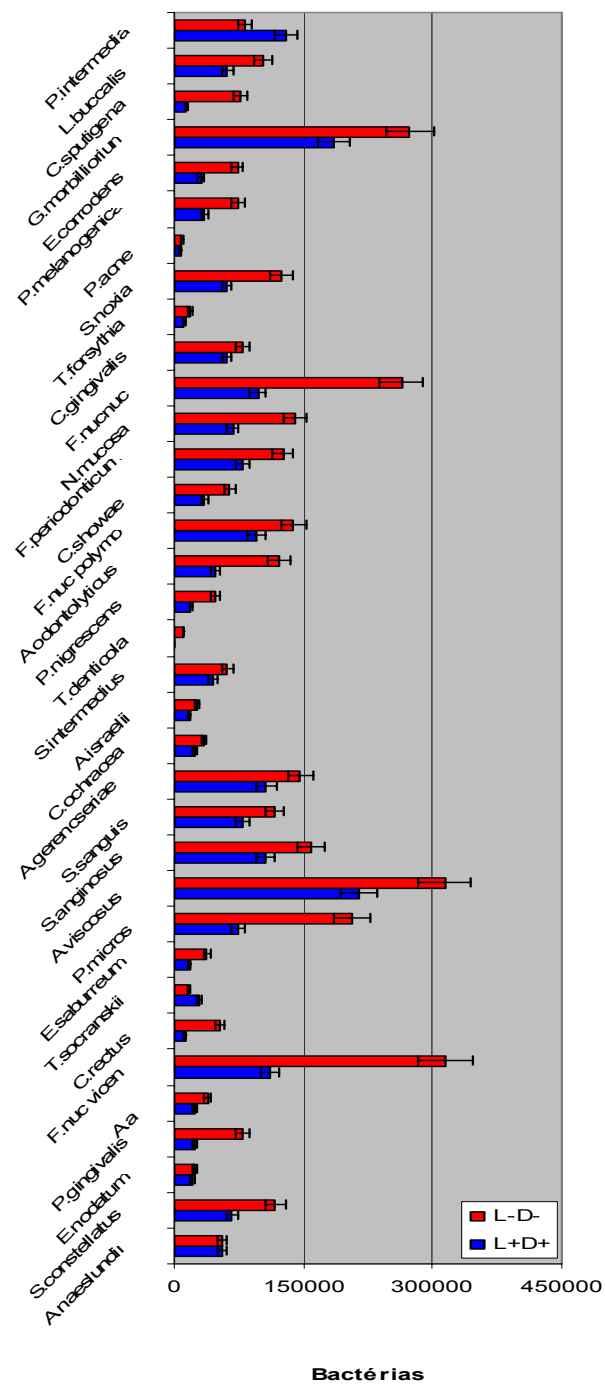


GRÁFICO 7 - Ação da terapia fotodinâmica em fase planctônica utilizando 30 J/cm².

A seguir analisaremos individualmente alguns resultados de maior relevância.

Utilizando a fluência de 30 J/cm² e 12,5 µg/mL de fotossensibilizador (azul de metileno), as bactérias em fase planctônica que sofreram redução maior que 50% foram: *E.saburreum* (54%), *A.odontolyticus* (60%), *N.mucosa* (51%), *S.noxia* (51%), *P.micros* (64%), *P.melaninogenica* (52%), *P.gingivalis* (69%), *E.corrodens* (57%), *C.sputigena* (82%), *T.denticola* (93%), *P.nigrescens* (58%), *F.nuc vicentii* (64%), *C.rectus* (75%), *F.nucnuc* (63%) e *C.gracilis* (77%), conforme mostra o Gráfico 8.

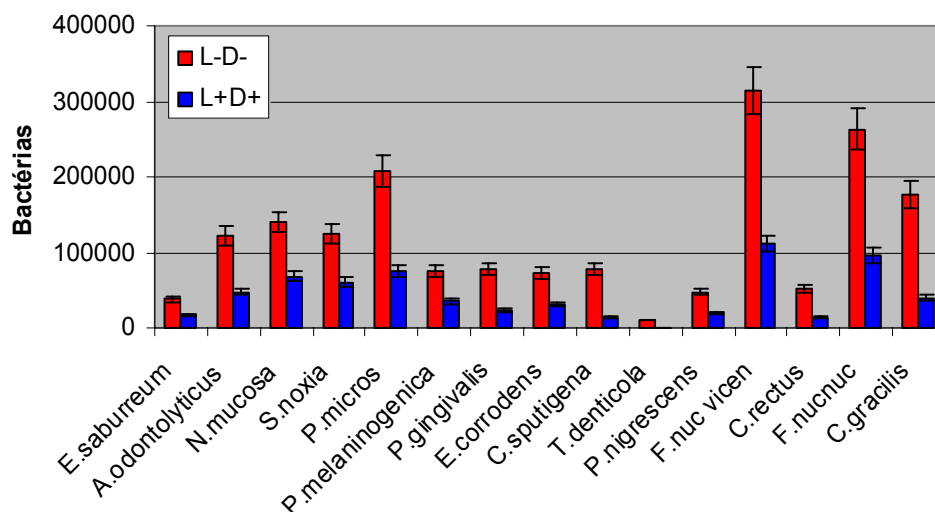


GRÁFICO 8 - Ação da terapia fotodinâmica (PDT) reduzindo mais de 50% das bactérias em fase planctônica após sensibilização com 12,5 µg/mL de azul de metileno e irradiação com laser de diodo operando com fluência de 30J/cm².

Conforme mostrado na Tabela 4 do capítulo 4, Socransky et al.¹⁵⁹ (1998) identificaram seis grupos principais associados a microbiota periodontal e chamou-os de complexos bacterianos: 1) *Actinomyces*; 2) complexo amarelo, que consiste de membros do gênero *Streptococcus*; 3) complexo verde, consistindo de espécies do gênero *Capnocytophaga*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo A, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter*; 4) complexo roxo, constituído de *Veillonella parvula* e de *Actinomyces odontolyticus*; 5) complexo laranja, consistindo de grupos bacterianos Gram-positivos; 6) complexo vermelho, consistindo pelas bactérias Gram-negativas, *Porphyromonas gingivalis*, de *Tannerella forsythia* e de *Treponema denticola*. Os quatro primeiros grupos colonizam facilmente a superfície dos dentes, mas seu crescimento geralmente precede a colonização e a multiplicação dos grupos dos complexos laranja e vermelho, predominantemente Gram-negativos (Socransky, Haffajee¹⁵⁵, 2002).

Nossos resultados mostraram em maiores níveis de DNA de algumas bactérias, como por exemplo, *Veillonella parvula* do complexo roxo, *Campylobacter gracilis* do complexo laranja e *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mitis* do complexo amarelo. Estes microrganismos encontrados em maiores quantidades sofreram reduções significativas após PDT conforme mostrado no Gráfico 9.

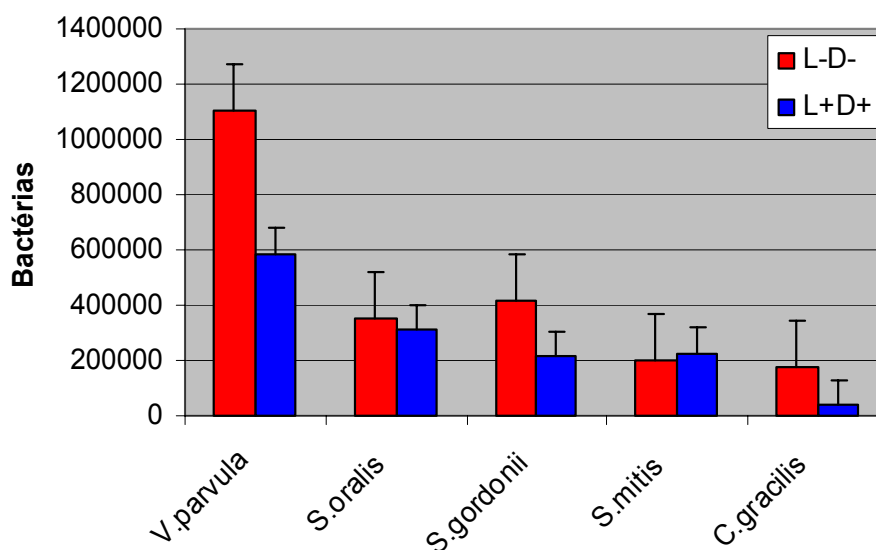


GRÁFICO 9 - Microrganismos encontrados em maiores quantidades.

A primeira barra representa o grupo controle e a segunda o grupo PDT em fase planctônica com 30 J/cm^2 . A ação da terapia fotodinâmica mais significativa mostradas neste gráfico foi 77 % de redução para *C. gracilis*.

Empregando os parâmetros de 30 J/cm^2 e $12,5 \text{ µg/mL}$ de azul de metileno, o Gráfico 10 ilustra os resultados das reduções dos microrganismos do “complexo vermelho”. Reduções de 69% para *Porphyromonas gingivalis*, 93% para *Treponema denticola* e de 36% para *Tannerella forsythia*.

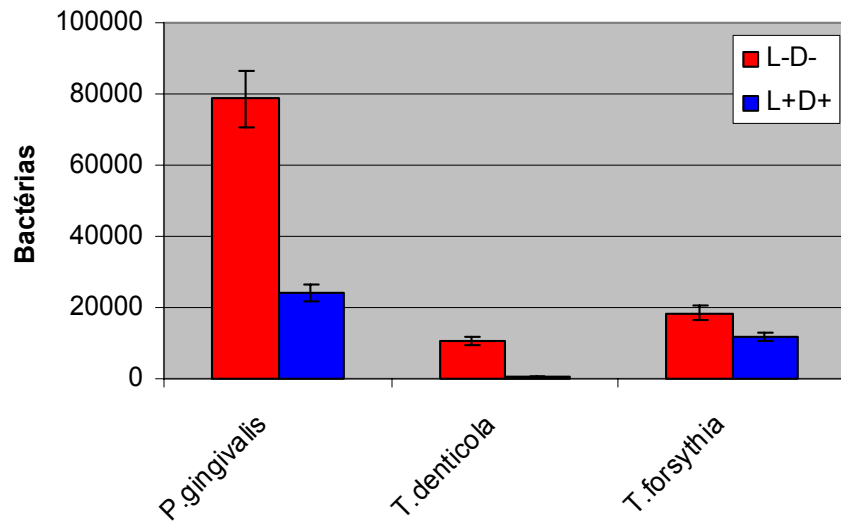


GRÁFICO 10 - Ação da terapia fotodinâmica (PDT) nas bactérias do complexo vermelho em fase planctônica após sensibilização com 12,5 µg/mL de azul de metileno e irradiação com fluência de 30 J/cm².

5.2.2 Experimentos em fase planctônica - 60 J/cm²

Como ilustração, na Figura 13 mostramos os sinais de fluorescência de uma das membranas referentes ao experimento em fase planctônica 60 J/cm².

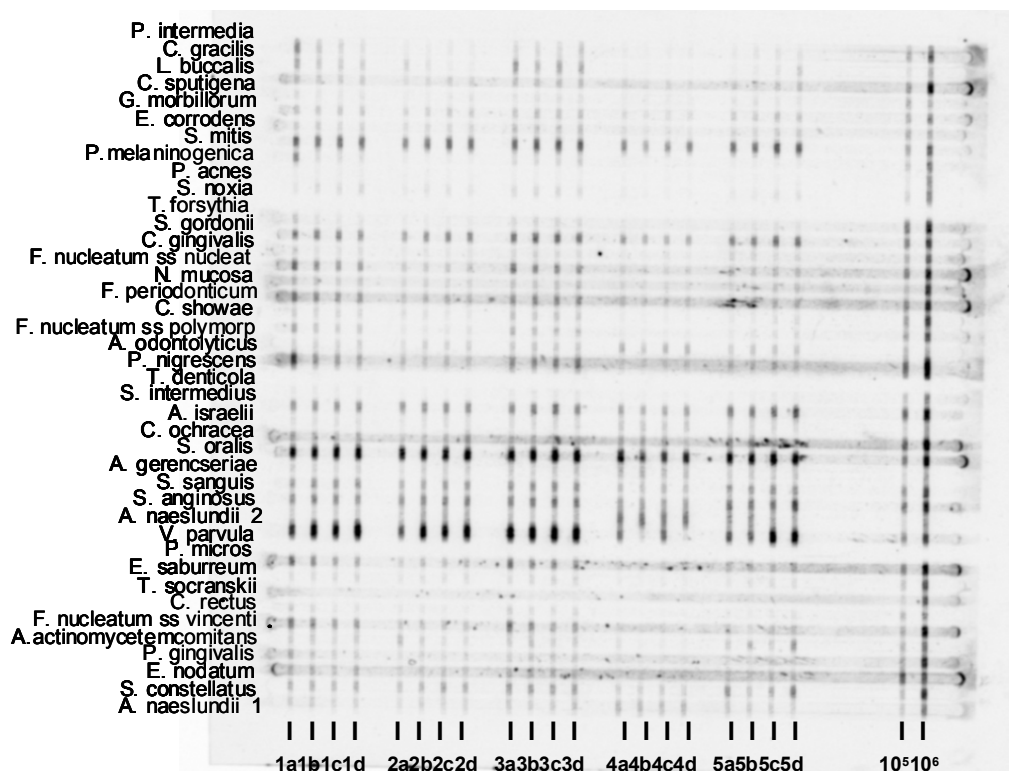


FIGURA 13 - Exemplo de uma membrana referente ao experimento realizado em fase planctônica aplicando 60J/cm². Da mesma forma descrita anteriormente, nas linhas verticais apresentamos os grupos que foram analisados: 1(L-D-), 2(L-D+), 3(L+D-), 4 (L+D+), 5(L-D+) e as últimas duas canaletas representam os padrões nas concentrações 10⁵ bactérias e 10⁶ bactérias de cada espécie. Nas 40 linhas horizontais estão os microrganismos investigados.

No Gráfico 11 apresentamos o resultado geral da redução na contagem do DNA das 40 espécies bacterianas proporcionada após a terapia fotodinâmica, em bactérias em fase planctônica utilizando o laser na fluência de 60 J/cm². Na seqüência, gráficos individuais irão mostrar os resultados mais significativos analisando um menor número de bactérias.

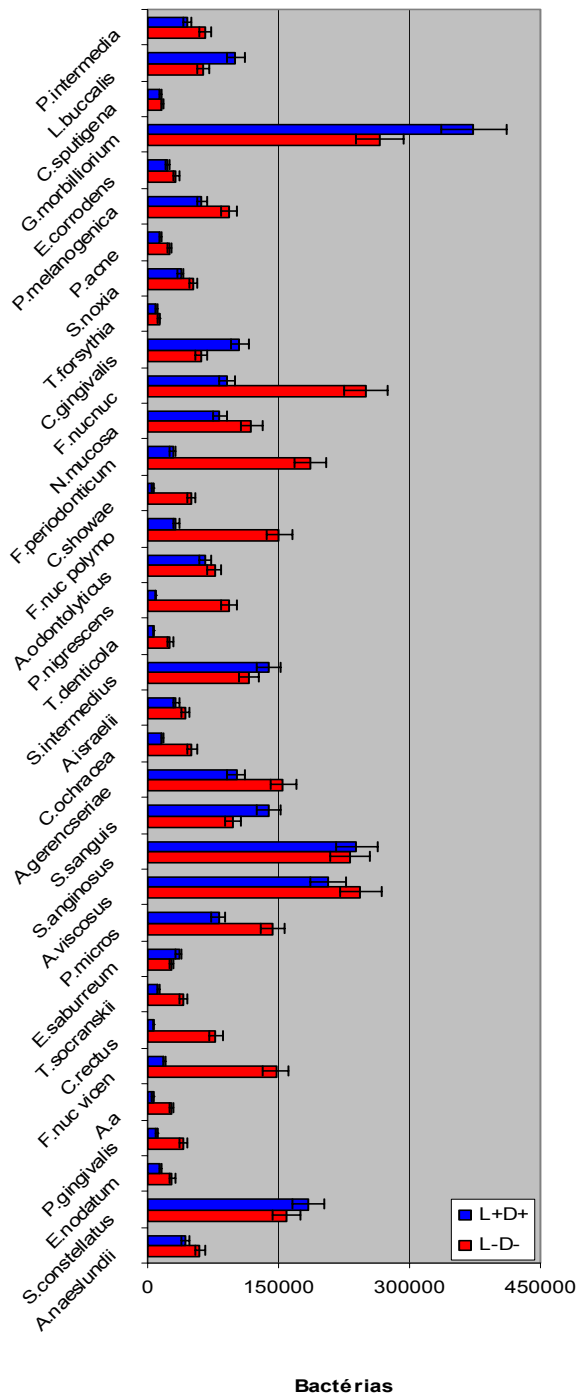


GRÁFICO 11 - Ação da terapia fotodinâmica em fase planctônica utilizando 60 J/cm².

Veillonella parvula, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mitis*, *Campylobacter gracilis*, mostrados no Gráfico 12, foram novamente os microrganismos encontrados em maiores quantidades. Reduções de 67%, 42%, 7%, 31% e 89%, respectivamente, foram observadas após PDT aplicando o parâmetro de 60 J/cm².

Ainda, para a mesma fluência (60 J/cm²) algumas bactérias sofreram reduções maiores que 50%. No total de 40 cepas, obtivemos 75% de redução de *P.gingivalis*, 78% de redução de *A. actinomycetemcomitans*, 70% de *T. socranskii*, 91% de *C. rectus*, 67% de *C. ochracea*, 78% de *F. nuc polymorphum*, 90% de *P. nigrescens*, 73% de *T. denticola*, 63% de *F. nuc nucleatum*, 87% de *F. nuc. vincentii*, 84% de *F. periodonticum* e 87% de *C. showae* (Gráfico 13).

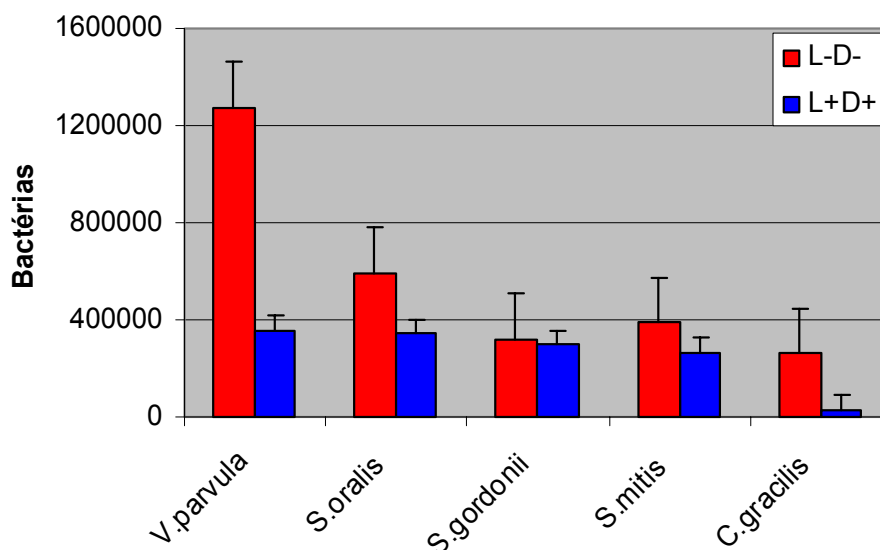


GRÁFICO 12 - Microrganismos encontrados em altos níveis.

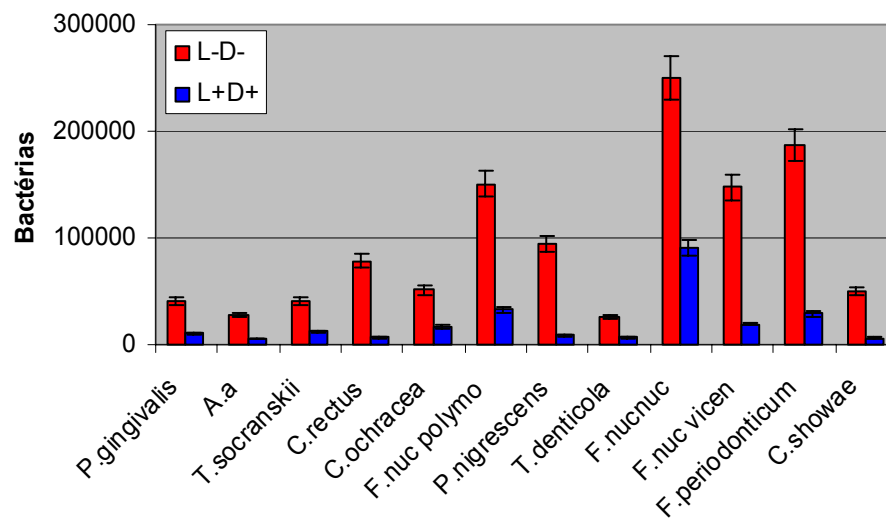


GRÁFICO 13 - Ação significativa da terapia fotodinâmica (PDT) para fluência de 60 J/cm².

Especificamente para os microrganismos do “complexo vermelho”, após a terapia fotodinâmica utilizando fluência de 60 J/cm² observamos porcentagem de redução de 75% para *Porphyromonas gingivalis*, 73% para *Treponema denticola* e 30% para *Tannerella forsythia*, como mostra o Gráfico 14.

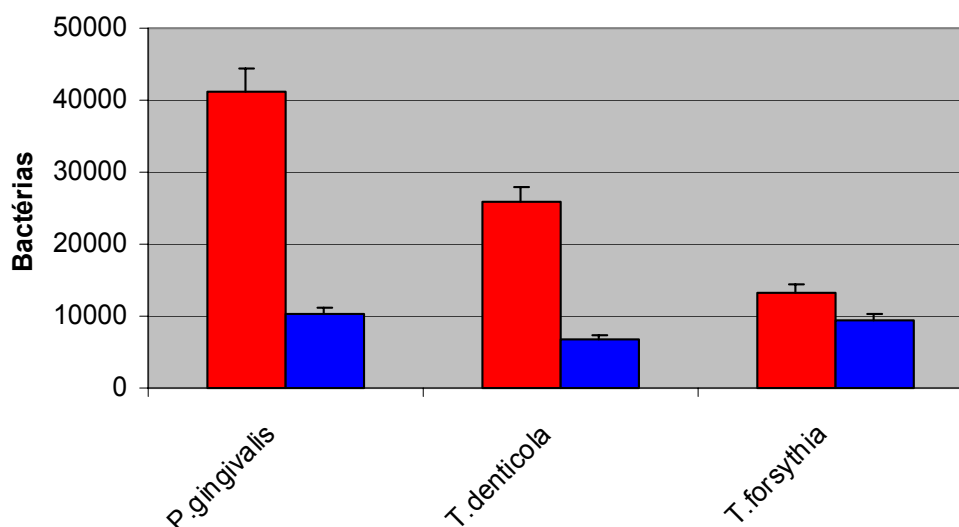


GRÁFICO 14 - Ação da terapia fotodinâmica (PDT) nas bactérias do complexo vermelho em fase planctônica após sensibilização com 12,5 µg/mL de azul de metileno e irradiação com fluência de 60 J/cm².

Para os experimentos em fase planctônica (suspensão) descritos anteriormente, uma alta redução bacteriana foi observada após a terapia fotodinâmica quando utilizamos o azul de metileno na concentração de 12,5 µg/mL nos dois parâmetros de energia utilizados. As fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm² foram efetivas na ação da PDT, conforme ilustrado na Tabela 10.

Tabela 10 - A porcentagem de redução do DNA bacteriano foi definida a partir da média dos números das amostras do grupo controle em relação à média do grupo teste (L+D+)

Fase Planctônica	Fluência 30J/cm ²	Fluência 60J/cm ²
Bactérias	Redução (%)	Redução (%)
<i>A.naeslundii</i>	0%	26%
<i>S.constellatus</i>	43%	0%
<i>E.nodatum</i>	10%	49%
<i>P.gingivalis</i>	69%	75%
<i>A.a</i>	39%	78%
<i>F.nuc vican</i>	64%	87%
<i>C.rectus</i>	75%	91%
<i>T.socranskii</i>	0%	70%
<i>E.saburreum</i>	54%	0%
<i>P.micros</i>	64%	43%
<i>V.parvula</i>	46%	72%
<i>A.viscosus</i>	32%	15%
<i>S.anginosus</i>	33%	0%
<i>S.sanguis</i>	32%	0%
<i>A.gerencseriae</i>	26%	34%
<i>S.oralis</i>	11%	42%
<i>C.ochracea</i>	32%	67%
<i>A.israelii</i>	34%	25%
<i>S.intermedius</i>	27%	0%
<i>T.denticola</i>	93%	73%
<i>P.nigrescens</i>	58%	90%
<i>A.odontolyticus</i>	60%	13%
<i>F.nuc polymo</i>	31%	78%
<i>C.showae</i>	45%	87%
<i>F.periodonticum</i>	37%	84%
<i>N.mucosa</i>	51%	30%
<i>F.nucnuc</i>	63%	63%
<i>C.gingivalis</i>	23%	0%
<i>S.gordonii</i>	47%	7%
<i>T.forsythia</i>	36%	30%
<i>S.noxia</i>	51%	28%
<i>P.acne</i>	24%	43%
<i>P.melaninogenica</i>	52%	33%
<i>S.mitis</i>	0%	31%
<i>E.corrodens</i>	57%	27%
<i>G.morbilliorium</i>	31%	0%
<i>C.sputigena</i>	82%	13%
<i>L.buccalis</i>	39%	0%
<i>C.gracilis</i>	77%	89%
<i>P.intermedia</i>	0%	31%

Com base na Tabela 10, os microrganismos *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a), *T. socranskii*, *C. rectus*, *C. ochracea*, *F. nuc nucleatum*, *F. nuc vincentii*, *T. denticola*, *P. nigrescens*, *A. odontolyticus*, *F. nuc polymo*, *C. showae*, *F. periodonticum*, *N. mucosa*, *S. noxia*, *P. melaninogenica*, *E. corrodens*, *C. sputigena*, , *P. micros*, *V. parvula*, *C. gracilis* sofreram uma redução de mais de 50% quando a terapia fotodinâmica foi aplicada em fase planctônica (suspensão).

Algumas bactérias, sofreram redução em ambas as fluências (30 J/cm² e 60J/cm²): *P.gingivalis* 69% e 75% de redução para 30 e 60 J/cm² respectivamente. Da mesma forma, para *F. nuc. vincentii* (64% e 87%), *C. rectus* (75% e 91%), *T. denticola* (93% e 73%), *P. nigrescens* (58% e 90%), *F. nuc nucleatum* (63% 63%) e *C. gracilis* (77% e 89%).

E. saburreum (54% de redução), *A. odontolyticus* (60%), *N. mucosa* (51%), *S. noxia* (51%), *P. melaninogenica* (52%), *E. corrodens* (57%), *C. sputigena* (82%) e *P. micros* (64%) sofreram redução quando o laser foi aplicado operando com fluência de 30 J/cm².

Utilizando 60 J/cm² as bactérias *A. actinomycetemcomitans* (78% de redução), *T. socranskii* (70%), *V. parvula* (72%), *C. ochracea* (67%), *F. nuc polymorphum* (78%), *C. showae* (87%), *F. periodonticum* (84%) foram reduzidas após a terapia fotodinâmica (PDT).

Buscando alcançar também redução destas bactérias por meio da terapia fotodinâmica em biofilme, testamos o azul de metileno na

concentração de 25 µg/mL e 50 µg/mL, mantendo os parâmetros de irradiação em 30 J/cm² e 60 J/cm².

Os grupos analisados foram 1 (L-D-), 2 (L-D+), 3 (L+D-), 4 (L+D+), 5 (L-D+), 6 (L+D+), sendo que para os grupos 2 e 4 a concentração do fotossensibilizador foi de 50 µg/mL e para os grupos 5 e 6 utilizamos a concentração de 25 µg/mL.

No entanto, nossos resultados mostraram que não houve qualquer redução para os grupos 5 e 6. Portanto, a seguir apresentaremos os resultados e gráficos referentes aos experimentos realizados em biofilme, utilizando a concentração de 50 µg/mL e fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm², detalhando os aspectos mais importantes da análise molecular.

5.2.3 Experimentos em Biofilme - 30 J/cm²

Na Figura 14 mostramos como ilustração, uma das membranas referentes ao experimento em biofilme. No Gráfico 15, mostramos o resultado de todos os sinais de fluorescência obtidos nas membranas referentes aos experimentos em biofilme. Apresentamos barras do grupo controle (L-D-) e do grupo PDT (L+D+), proporcionando uma visão geral da redução das 40 bactérias analisadas em biofilme após a irradiação laser na fluência de 30 J/cm².

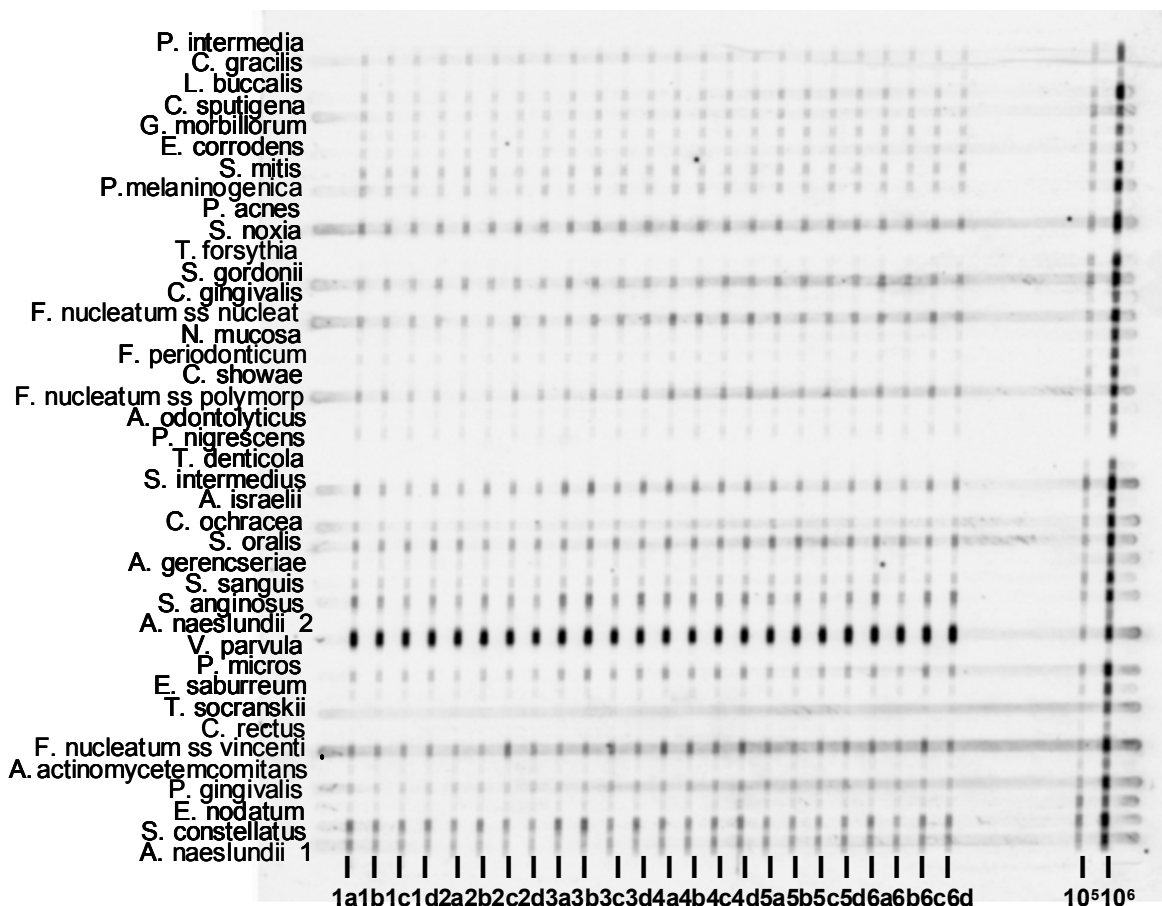


FIGURA 14 - Membrana referente ao experimento realizado em biofilme aplicando 30 J/cm^2 . Na vertical apresentamos os grupos que foram analisados: 1 (L-D-), 2 (L-D+), 3 (L+D-), 4 (L+D+), 5 (L-D+), 6 (L+D+), sendo que para os grupos 2 e 4 a concentração do fotossensibilizador foi de 50 µg/mL e para os grupos 5 e 6 utilizamos concentração de 25 µg/mL .

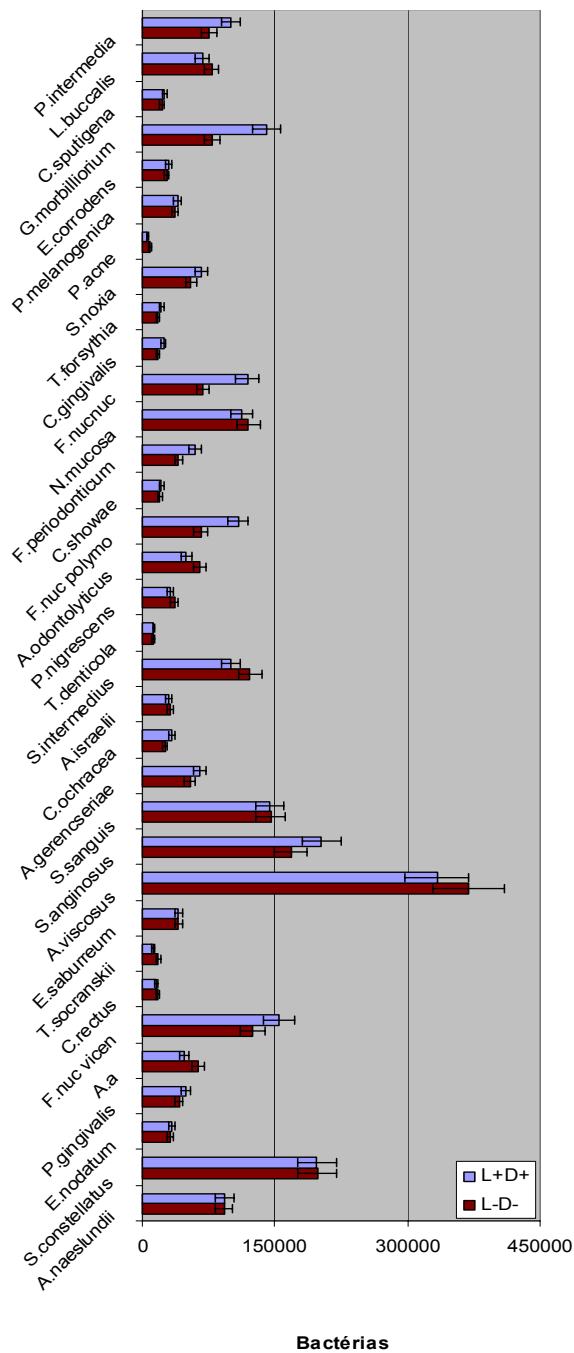


GRÁFICO 15 – Microrganismos encontrados em biofilme no grupo (L-D-) e no grupo (L+D+) utilizando 50 µg/mL de fotossensibilizador e fluência de 30 J/cm².

Conforme mostrado no Gráfico 16, *Veillonella parvula*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* e *Campylobacter gracilis*, foram os microrganismos que se apresentaram em altos níveis, também em biofilme. No entanto, diferente da fase planctônica, em biofilme as reduções bacterianas foram consideravelmente menores, ou mesmo inexistentes. *Veillonella parvula*, *Streptococcus oralis* e *Campylobacter gracilis* não sofreram quaisquer reduções, *Streptococcus gordonii* apenas 10% de redução e *Streptococcus mitis* 7,2%.

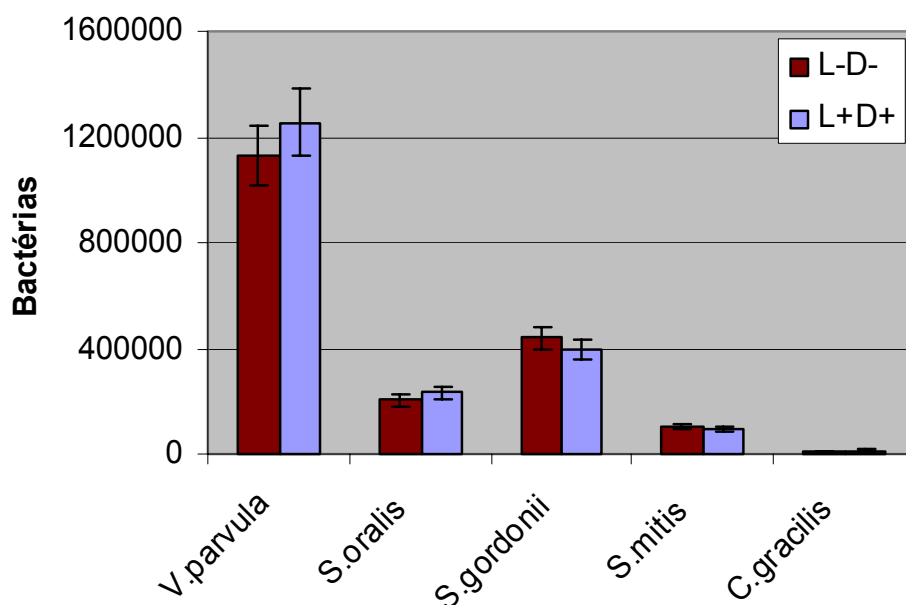


GRÁFICO 16 – Redução dos microrganismos encontrados em altos níveis no biofilme.

Conforme mostrado no Gráfico 17, após sensibilização com 50 µg/mL de azul de metileno e irradiação com fluência de 30 J/cm² a terapia fotodinâmica não foi efetiva na redução das bactéria do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. denticola* ou *T. forsythia*) quando em biofilme .

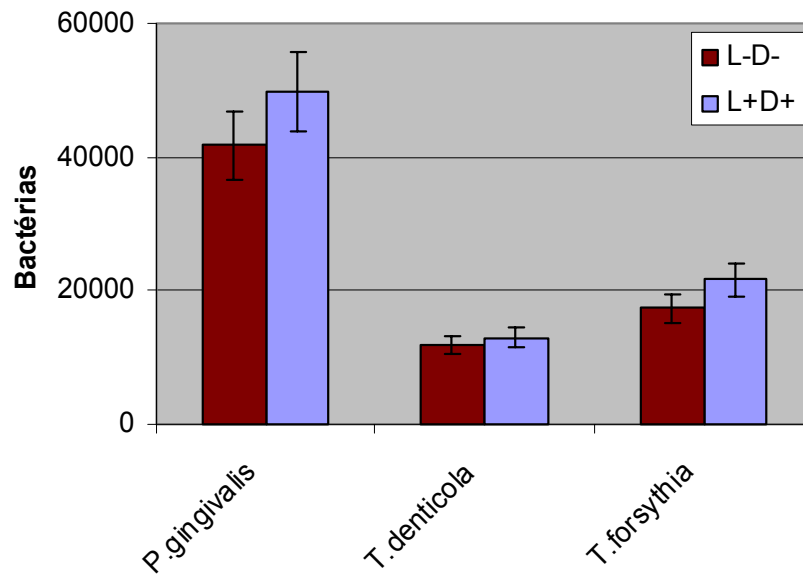


GRÁFICO 17 – A terapia fotodinâmica (PDT) aplicada em biofilme não foi capaz de proporcionar redução de *P. gingivalis*, *T. denticola* ou *T. forsythia*.

5.2.4 Experimentos em Biofilme - 60 J/cm^2

Na Figura 15 mostramos como ilustração, uma das membranas referentes ao experimento em biofilme utilizando 60 J/cm^2 . Podemos observar os sinais de fluorescência obtidos para cada bactéria nos diferentes grupos estudados.

No Gráfico 18, mostramos o resultado de todos os sinais de fluorescência obtidos nas membranas referentes aos experimentos em biofilme 60 J/cm^2 .

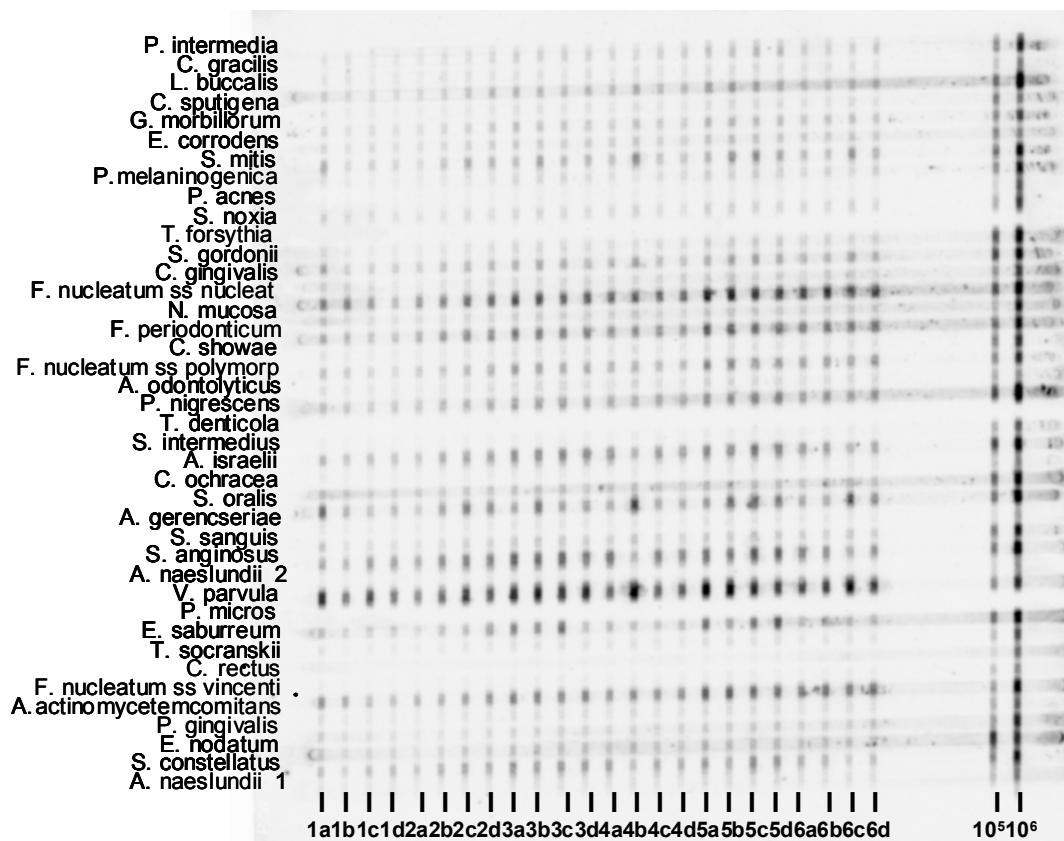


FIGURA 15 - Membrana referente ao experimento realizado em biofilme aplicando 60 J/cm². Nas linhas verticais apresentamos os grupos que foram analisados: 1 (L-D-), 2 (L-D+), 3 (L+D-), 4 (L+D+), 5 (L-D+), 6 (L+D+), sendo que para os grupos 2 e 4 a concentração do fotossensibilizador foi de 50 µg/mL e para os grupos 5 e 6 utilizamos uma concentração de 25 µg/mL. As últimas duas canaletas representam os padrões nas concentrações 10⁵ bactérias e 10⁶ bactérias de cada espécie. Nas linhas horizontais estão os 40 microrganismos investigados.

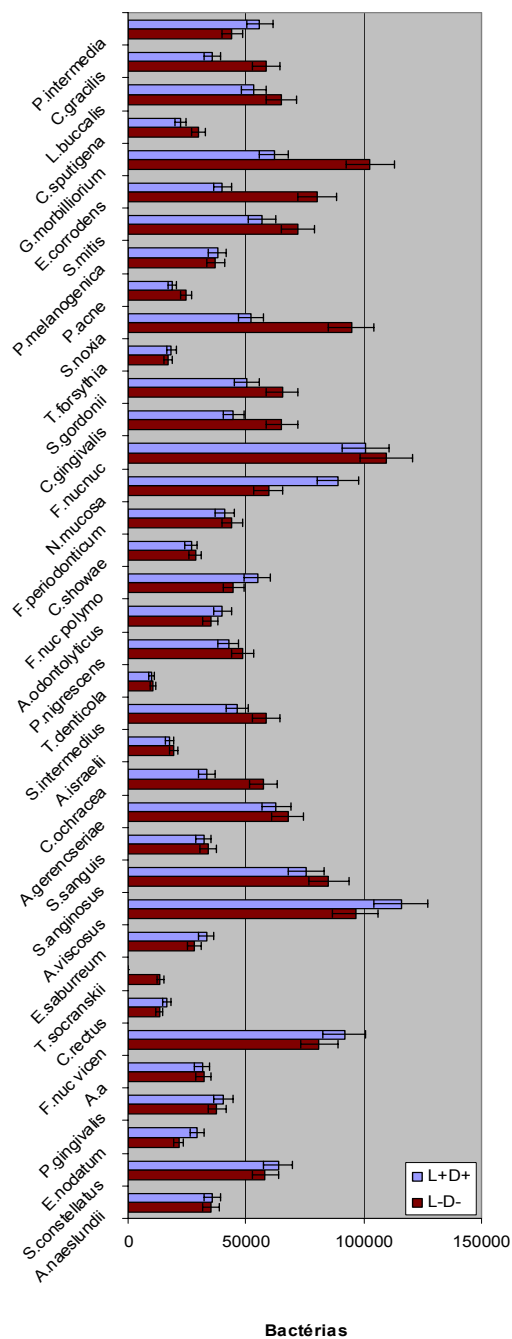


GRÁFICO 18 - Microrganismos encontrados em biofilme no grupo controle e no grupo PDT, utilizando 50 µg/mL de fotossensibilizador e fluência de 60 J/cm².

Conforme mostrado no Gráfico 19, *Veillonella parvula*, *Peptostreptococcus micros* e *Streptococcus oralis*, foram microrganismos que se apresentaram em altos níveis em biofilme. E mesmo na maior fluência utilizada (60 J/cm^2), o DNA destes microrganismos não sofreram quaisquer reduções.

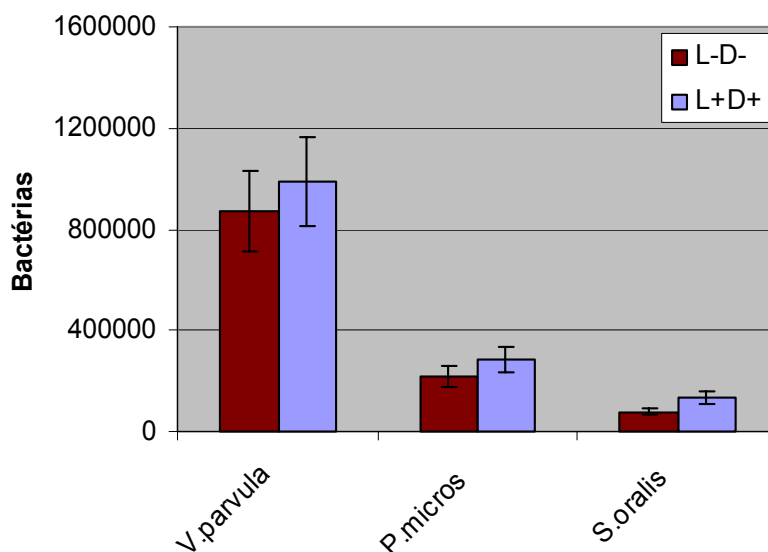


GRÁFICO 19 – Microrganismos em grande quantidade no biofilme.

Especificamente para os microrganismos do “complexo vermelho” em biofilme, após aplicação da fluência de 60 J/cm^2 , observamos redução de apenas 6,2% para *Treponema denticola* e nenhuma redução (100% de sobrevivência) para *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, conforme mostrado no Gráfico 20.

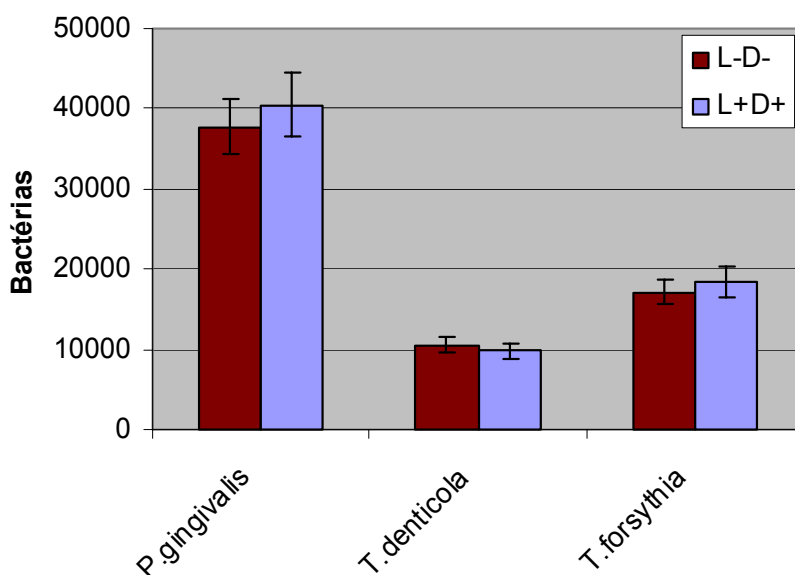


GRÁFICO 20 - Ação da terapia fotodinâmica (PDT) nas bactérias do complexo vermelho em biofilme após sensibilização com 50 µg/mL de azul de metileno e irradiação com fluência de 60 J/cm².

Os dados da Tabela 11 representam as porcentagens de reduções bacterianas obtidas após a ação terapia fotodinâmica em biofilme, utilizando azul de metileno na concentração de 50 µg/mL seguido de irradiação com laser de diodo operando com fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm².

Em biofilme, na fluência 30 J/cm² os microrganismos que sofreram redução foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (24%), *Campylobacter rectus* (8%), *Treponema socranskii* (33%), *Actinomyces viscosus* (9,8%), *Actinomyces israelii* (5,5%), *Streptococcus intermedius*

(17,6%), *Prevotella nigrescens* (11,3%), *Actinomyces odontolyticus* (22,1%), *Neisseria mucosa* (6,5%), *Streptococcus gordonii* (10%), *Propionibacterium acnes* (31,5%), *Streptococcus mitis* (7,2%) e *Leptotrichia buccalis* (13%).

Entretanto, 100% de sobrevivência (0% de redução) foi observada para: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Eubacterium saburreum*, *Peptostreptococcus micros*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces gerencseriae*, *Streptococcus oralis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Selenomonas noxia*, *Prevotella melaninogenica*, *Eikenella corrodens*, *Gemella morbillorum*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter gracilis* e *Prevotella intermedia*.

Ainda, de acordo com os resultado em biofilme da Tabela 11, mesmo a fluência de $60\text{J}/\text{cm}^2$ não foi suficiente para reduzir expressivamente os microrganismos em biofilme. As espécies que sofreram reduções foram: *Treponema socranskii* (100%), *Streptococcus anginosus* (11%), *Streptococcus sanguis* (5,7%), *Actinomyces gerencseriae* (7,2%), *Capnocytophaga ochracea* (42%), *Actinomyces*

israelii (8,6%), *Streptococcus intermedius* (21%), *Treponema denticola* (6,2%), *Prevotella nigrescens* (12%), *Campylobacter showae* (5,8%), *Fusobacterium periodonticum* (6,8%), *Fusobacterium nucleatum sp. Nucleatum* (8%), *Capnocytophaga gingivalis* (31,4%), *Streptococcus gordonii* (23%), *Selenomonas noxia* (44,8%), *Propionibacterium acnes* (23%), *Streptococcus mitis* (21%), *Eikenella corrodens* (50%), *Gemella morbillorum* (39,6%), *Capnocytophaga sputigena* (26%), *Leptotrichia buccalis* (18%) e *Campylobacter gracilis* (39%).

Por outro lado, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium saburreum*, *Peptostreptococcus micros*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum*, *Neisseria mucosa*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella intermedia* não foram afetados pela terapia fotodinâmica, apresentando 100% de sobrevivência.

Tabela 11 - Porcentagem de redução bacteriana em biofilme que foi definida a partir da média dos números das amostras do grupo controle em relação à média do grupo teste (L+D+)

Biofilme	Fluência 30J/cm ²	Fluência 60J/cm ²
Bactérias	Redução (%)	Redução (%)
<i>A.naeslundii</i>	-	-
<i>S.constellatus</i>	0.4%	-
<i>E.nodatum</i>	-	-
<i>P.gingivalis</i>	-	-
<i>A.a</i>	24%	1.5%
<i>F.nuc vican</i>	-	-
<i>C.rectus</i>	8%	-
<i>T.socranskii</i>	33%	100%
<i>E.saburreum</i>	-	-
<i>P.micros</i>	-	-
<i>V.parvula</i>	-	-
<i>A.viscosus</i>	9.8%	-
<i>S.anginosus</i>	-	11%
<i>S.sanguis</i>	-	5.7%
<i>A.gerencseriae</i>	-	7.2%
<i>S.oralis</i>	-	-
<i>C.ochracea</i>	-	42%
<i>A.israelii</i>	5.5%	8.6%
<i>S.intermedius</i>	17.6%	21%
<i>T.denticola</i>	-	6.2%
<i>P.nigrescens</i>	11.3%	12%
<i>A.odontolyticus</i>	22.1%	-
<i>F.nuc polymo</i>	-	-
<i>C.showae</i>	-	5.8%
<i>F.periodonticum</i>	-	6.8%
<i>N.mucosa</i>	6.5%	-
<i>F.nucnuc</i>	-	8%
<i>C.gingivalis</i>	-	31.4%
<i>S.gordonii</i>	10%	23%
<i>T.forsythia</i>	-	-
<i>S.noxia</i>	-	44.8%
<i>P.acne</i>	31.5%	23.7%
<i>P.melaninogenica</i>	-	-
<i>S.mitis</i>	7.2%	21%
<i>E.corrodens</i>	-	50%
<i>G.morbilliorium</i>	-	39.6%
<i>C.sputigena</i>	-	26%
<i>L.buccalis</i>	13%	18%
<i>C.gracilis</i>	-	39%
<i>P.intermedia</i>	-	-

6 Discussão

6.1 Cultura Microbiana

O presente estudo analisou o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em duas diferentes modalidades: a) PDT em fase planctônica e b) PDT em modelo de biofilme. Basicamente, esta terapia (PDT) é um processo dinâmico que consiste na interação de uma específica fonte de luz com um corante apropriado.

Estes corantes, também chamados de fotossensibilizantes, absorvem esta irradiação (fótons), sendo promovidos para o estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental, transferem sua energia ao oxigênio e à outras moléculas, resultando na liberação de substâncias energéticas, altamente reativas e de meia-vida curta, como é o caso do o oxigênio singleto, que ao interagir com os sistemas biológicos, pode causar danos, por exemplo à microrganismos, via oxidação irreversível de componentes celulares (Arakane et al.⁵, 1996; Ackroyd et al.¹, 2001; Herderson, Mayhew⁷³, 1990; Mayhew et al.¹¹³, 1993). Aplicações desta terapia que acarretam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular são relatadas por vários autores (Wilson¹⁹², 1998; Henry et al.⁷⁴, 1996; Henry et al.⁷⁵, 1995; Jori⁸⁰, 1996; Soukos et al.¹⁶⁴, 2003; Wood et al.²⁰², 2006) Em geral, um fotossensibilizante ideal para os sistemas biológicos precisa ter algumas características específicas: ser

fotoquimicamente eficiente, absorver na região do vermelho ou do infravermelho próximo (600 a 800 nm) quando se quer atingir maior penetração, apresentar estabilidade por longos períodos de tempo, ser bioquimicamente e biologicamente estável, ter seletividade e atingir os tecidos-alvo (neste caso fotossensibilizar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) e ainda ser minimamente tóxico aos tecidos normais (Moan¹¹⁸, 1990).

A necessidade da seletividade é clara. É desnecessária a terapia fotodinâmica em tecidos saudáveis e, portanto, o fotossensibilizador não deve ser colocado e nem deve acumular-se em locais que não são alvo. Em geral, estes corantes devem ter uma estabilidade prolongada, pois alterações relativamente pequenas no estado molecular dessas substâncias podem eliminar suas propriedades de sensibilizar localmente os tecidos-alvo, tornando a droga não ideal para a terapia fotodinâmica. Várias classes de substâncias mostraram-se promissoras como sensibilizantes. Essas incluem as fenotiazina, ftalocianinas e seus derivados, as clorinas, as purinas e as moléculas contendo porfirina (Bertoloni et al.¹², 1992; Soukos et al.¹⁶⁵, 2003; Demidova et al.³⁴, 2004; Tegos, Hamblin¹⁷⁴, 2006). Cada droga possui vantagens e desvantagens. As ftalocianinas podem ser facilmente preparadas na forma pura, (Bertoloni et al.¹¹, 1990; Jori et al.⁸³, 2006) e modificadas quimicamente para se obter absorção em diversos comprimentos de onda. As clorinas também são facilmente sintetizadas a

partir da clorofila. As purinas possuem muitas propriedades fotossensibilizantes e localizadoras das porfirinas e são prontamente sintetizadas na forma pura, embora em pequenas quantidades. Os sensibilizantes derivados das hematoporfirinas demonstraram ser uma excelente escolha em especial para a oncologia e são amplamente utilizados em estudos clínicos. (Lipson et al.⁹⁵, 1961) De acordo com a região de absorção dos diferentes fotossensibilizantes, é necessário um comprimento de onda específico para sua excitação (Jockusch et al.⁷⁹, 1996; Jackson et al.⁷⁸, 1999).

No caso de fotossensibilização de bolsas periodontais para a aplicação da terapia fotodinâmica, muitos estudos demonstram que as bactérias Gram-positivas são mais facilmente susceptíveis a fotoinativação (Nitzan et al.¹³⁰, 1987; Soukos et al.¹⁶⁴, 2003, Soukos et al.¹⁶⁸, 2006; Demidova, Hamblin³⁴, 2004). Por outro lado, esta terapia, mesmo que em diferentes proporções, também tem reduzido bactérias Gram-negativas que se mostram cada vez mais resistentes às terapias antibióticas (Malik et al.¹⁰⁵, 1992). Modificações químicas, com Tris/EDTA ou polymyxin B nanopeptídeo, vêm sendo testadas para alterar a permeabilidade da membrana e atingir a eliminação de bactérias Gram-negativas mais facilmente (Scheetz et al.¹⁴⁵, 2006; Falagas, Kasiakou⁴⁴, 2006). Bertoloni et al.¹² (1984) constataram que bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*), mas não espécies Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) poderiam ser

eliminadas pela luz na presença de hematoporfirina. No entanto, foi observado que a aplicação de fotossensibilizadores com carga catiônica, como por exemplo, azul de toluidina O e azul de metileno, aumentam a susceptibilidade das bactérias Gram-negativas à ação fotodinâmica. (Wainwright et al.¹⁸⁸, 1997; Bartlett, Indig⁷ 1999; Usacheva et al.¹⁷⁸, 2001; Usacheva et al.¹⁷⁹, 2003). Desta forma, microrganismos incluindo bactérias orais Gram-positivas e Gram-negativas são ambas fotoinativadas pelo azul de metileno (Harris et al.⁷⁰, 2005).

Por estes motivos, neste estudo utilizamos o azul de metileno como fotossensibilizador. O efeito deste corante no escuro (grupo L-D+) e na presença de luz (PDT: L+D+), assim como a ação do laser isoladamente (L+D-), serão discutidos a seguir.

6.1.1 Grupo Droga (L-D+) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme

O azul de metileno, um corante orgânico pertencente à família da fenotiazina, tem propriedades fotossensibilizantes estabelecidas e vem sendo usado em terapia fotodinâmica (Phoenix, Harris¹³⁹, 2003; Harris et al.⁷⁰, 2005; Soukos et al.¹⁶⁸, 2006). Muitos estudos têm demonstrado que os fotossensibilizadores derivados da fenotiazina atuam em DNA e na membrana externa das espécies bacterianas alvo (Gorman et al.⁵⁷, 2006).

Nossos resultados em fase planctônica, considerando a toxicidade do azul de metileno na ausência da irradiação laser (grupo L-

D+), revelam que a exposição de bactérias orais ao azul de metileno na concentração de 25 µg/mL nos dois períodos de incubação analisados foram altamente citotóxico para esta suspensão. A redução bacteriana, analisando apenas o efeito do fotossensibilizador a 25 µg/mL em fase planctônica, foi de 60% a 70% quando o tempo de incubação foi de 10 e 15 minutos, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Usacheva et al.¹⁸⁰ (2003); Bartlett, Indig⁷ (1999); Soukos et al.¹⁶⁸ (2006).

Entretanto, usando este mesmo fotossensibilizador, porém em uma menor concentração (12,5 µg/mL), obtivemos uma toxicidade muito reduzida. O grupo L-D+, presente nos Gráficos 1 e 2 relata esta menor toxicidade, com redução das unidades formadoras de colônia de aproximadamente 8% a 30%, na presença de 12,5 µg/mL do azul de metileno por 10 ou 15 minutos em suspensão bacteriana.

A penetração deste corante nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ocorre de maneira diferente. De acordo com a literatura revisada por Niederweis¹²⁷, 2003 e Nikaido¹²⁸, 2003, nas bactérias Gram-negativas a membrana externa que envolve a fina parede celular não contém as proteínas de transporte encontradas na membrana plasmática. Contudo, está repleta de amplos canais protéicos denominados porinas. Porinas são proteínas que se agrupam para formar poros na membrana externa, criando pequenos canais que permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular. Uma vez que grandes moléculas não se difundem através desses canais, as porinas restringem o acesso de

muitos agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes, corantes, determinados antibióticos e toxinas ao citoplasma das bactérias Gram-negativas, que de modo geral, são mais resistentes que as Gram-positivas. No entanto, as propriedades hidrofílicas do azul de metileno (Wainwright et al.¹⁸⁸, 1997), seu baixo peso molecular e sua carga positiva permitem sua passagem pelas porinas das bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas, desprovidas da membrana externa presente nas bactérias Gram-negativas, possuem apenas uma espessa parede celular. Apesar de espessa, esta parede, formada por cerca de vinte camadas de peptidoglicano, permite a difusão de muitas moléculas. O peptidoglicano é um polímero semi-rígido, resistente, poroso e insolúvel constituído de uma rede de cadeias de polissacarídeos interconectadas por pequenas cadeias peptídicas. Embebidas na matriz de peptidoglicano dessas bactérias encontram-se pequenas quantidades de ácidos teicóicos (termo funcional para uma ampla variedade de diferentes polímeros contendo açúcares, fosfato e glicerol). Os ácidos teicóicos conferem carga negativa à superfície exterior da célula, podendo ajudar no transporte de íons positivos para dentro e fora da célula.

Conforme ilustrado na Figura 2, na descrição de Material e Método, o azul de metileno, que possui carga positiva, interage predominantemente com macromoléculas aniônicas de lipopolissacarídeo, resultando na geração de dímeros de azul de metileno (Usacheva et al.¹⁸⁰, 2003), os quais participam do processo de fotossensibilização (Usacheva

et al.¹⁷⁹, 2003; Bartlett, Indig⁷, 1999). Desta forma, nos grupos onde o corante foi aplicado, os microrganismos (bactérias orais Gram-positivas e Gram-negativas) foram ambos fotossensibilizados pelo azul de metileno e fotoinativados pela ação da terapia fotodinâmica (Harris et al.⁷⁰, 2005). Nossos resultados aplicando o azul de metileno na ausência da irradiação laser (grupo L-D+) revelam que a toxicidade, para bactérias orais em fase planctônica depende da concentração de corante utilizada.

A toxicidade do azul de metileno a 25 µg/mL em fase planctônica foi muito alta, pois o efeito isolado do corante causou redução das unidades formadoras de colônia ao redor de 60% a 70%. Resultados similares são relatados na literatura (Okamoto et al.¹³³, 1992; Soukos et al.¹⁶⁸, 2006).

Neste estudo, como dito anteriormente, fizemos experimentos aplicando a terapia fotodinâmica tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme. Como esperado, nossos resultados em suspensão, para a maioria dos grupos, incluindo o Grupo L-D+ foram bem diferentes dos resultados de toxicidade no escuro obtidos nos testes com biofilme. Estas diferenças podem ser facilmente compreendidas se analisarmos o conceito atual de biofilme e comunidade bacteriana. Sabemos que muitas espécies bacterianas são responsáveis pela indução e manutenção da inflamação periodontal. No entanto, por muito tempo foi considerado que as bactérias viviam de forma isolada. Porém, nas últimas décadas observou-se que existe não apenas associação, como também a

comunicação entre as bactérias. Esse tipo de comportamento comunitário permite a formação de uma estrutura multicelular complexa denominada biofilme (Marsh, Bradshaw¹¹⁰, 1995; Marsh¹⁰⁸, 2004; Marsh¹⁰⁹, 2005).

Para simular as condições encontradas na bolsa periodontal, no que diz respeito à comunidade bacteriana, neste estudo cultivamos *in vitro* um biofilme múltiplas espécies a partir de amostras de placa bacteriana. Nossos resultados confirmam de maneira muito clara a diferença existente entre o tratamento para redução de bactérias em biofilme ou em fase planctônica. No grupo L-D+, também analisamos em biofilme a toxicidade do fotossensibilizador no escuro. Diferente da alta toxicidade observada quando utilizamos 25 µg/ml em fase planctônica (ou suspensão), para os experimentos em biofilme, mesmo a concentração de 50 µg/ml não causou uma toxicidade significativa. Observamos uma redução das unidades formadoras de colônia (u.f.c.) de 4% e 8%, quando usamos 25 µg/ml de azul de metileno por respectivamente 10 e 15 minutos de incubação. Empregando uma maior concentração (50 µg/ml) por 10 minutos, a redução foi de 12% e a máxima toxicidade no escuro foi de 18% quando incubamos por 15 minutos. Nossos resultados estão de acordo com estudos de Armitage⁶, 2004, no qual relata que as bactérias associadas em um biofilme possuem vantagens nutricionais, proteção e facilidade de comunicação.

O biofilme bacteriano formado por colônias de bactérias inseridas em uma matriz polimérica extracelular, por elas mesmas

produzida (Costerton et al.³⁰, 1999; Haffajee, Socransky⁶⁶, 2006), constitui uma forma de proteção que permite ao microrganismo sobreviver em ambientes adversos. O estilo de vida microbiano na maioria dos ambientes naturais está associado a formação de biofilme múltiplas espécies (Armitage⁶, 2004; Bhinu¹⁴, 2005). No entanto, um biofilme também pode ser constituído por apenas uma espécie de bactéria. Os biofilmes constituídos de uma única espécie existem em uma variedade de infecções e implantes médicos (Gilbert et al.^{54,55}, 1997, 2002; Suntharalingam, Cvitkovitch¹⁷², 2005). Mas a predominância, não só na cavidade bucal, como também na maioria dos ambientes é o biofilme de múltiplas espécies.

O presente estudo revela que os resultados aqui obtidos estão de acordo com a literatura (Birmingham et al.¹⁵, 1995; Black et al.¹⁶, 2004; Costerton et al.³⁰, 1999; Donlan³⁸, 2002), pois grandes diferenças foram observadas quando comparamos o efeito do tratamento aplicado em bactérias orais em fase planctônica e em modelo de biofilme.

6.1.2 Grupo Laser (L+D-) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme

Nossos resultados relacionados com a irradiação com o laser de diodo como procedimento único (grupo L+D-), não demonstrou redução nas u.f.c. quando o parâmetro utilizado durante a irradiação foi de 30 J/cm². Este resultado foi obtido tanto para o experimento em fase

planctônica quanto para o experimento em biofilme. Nossos achados estão de acordo com Wilson et al.¹⁹⁸, (1993), que testou *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* com laser de He-Ne operando em uma densidade de energia de 44 J/cm². Neste estudo os autores também não observaram praticamente nenhuma redução. Alguns estudos mostram que bactérias não pigmentadas, quando expostas aos lasers de baixa intensidade, não manifestam efeitos adversos (McGuff, Bell⁹⁹, 1966). Burns et al.²⁰, 1993, testaram microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *A. viscosus*) utilizando laser de He-Ne (584 mJ e 44 J/cm²) e laser de GaAs (990 mJ e 1,5 J/cm²), e também não constataram redução bacteriana apenas com a irradiação destes lasers.

Por outro lado, diferente do que esperávamos, os resultados relacionados com os experimentos nos quais utilizamos a irradiação com o laser de diodo (grupo L+D) operando em 665 nm com irradiância de 100 mW/cm² e fluência de 60 J/cm², obtivemos redução nas u.f.c. por volta de 10 % em biofilme e de 25 % das bactérias em fase planctônica. Esta redução bacteriana foi inesperada e provavelmente não está relacionada com morte de microrganismos por efeito térmico. Análises térmicas para os parâmetros de 30 J/cm² e 60 J/cm² não mostraram aumento de temperatura considerável para justificar a redução bactéria apenas por efeito térmico (Fontana et al.^{47,48}, 2004; Soukos et al.¹⁶³, 2006). Na literatura (Frankenberg et al.⁵¹, 2002) é também relatado que algumas

bactérias, como por exemplo, *E. faecalis* podem sobreviver a 60° C por 30 minutos. Assim, descartando a possibilidade de morte bacteriana devido ao aumento de temperatura, uma possível explicação para a redução bacteriana encontrada no grupo L+D-, quando a maior fluência foi empregada (60 J/cm²), pode estar relacionada com a ativação de cromóforos endógenos, como por exemplo, as porfirinas sintetizadas por certas espécies bacterianas (Kjeldstad, Johnsson⁸⁷, 1986; Henry et al.⁷⁴, 1996; Henry et al.⁷⁵, 1995; König et al.⁹⁰, 2000). Esta maior energia pode ter sido suficiente para ativar cromóforos endógenos de microrganismos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica* ou *Prevotella nigrescens*, uma vez que a literatura relata redução de bactérias pigmentadas de negro com apenas a irradiação laser, dependendo da fluência aplicada (Shah, Gharbia¹⁴⁶, 1993; Shah et al.¹⁴⁷, 1979; McGuff, Bell⁹⁹, 1966; McCaughan⁹⁸, 1999; König et al.⁹⁰, 2000).

Considerando que estes compostos endógenos em *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são similares às porfirinas, Wilson et al.¹⁹³, 1993; Wilson et al.¹⁹⁷, 1992, estudaram a ação do laser de He-Ne em *P. gingivalis* irradiando por 80 segundos, totalizando uma densidade de energia de 44 J/cm², porém seus resultados não demonstraram redução bacteriana, fato atribuído a provável inefetiva absorção da luz pela substância endógena, nos parâmetros utilizados. Henry et al.⁷⁵, 1995, utilizando a densidade de

energia de 70 J/cm², relataram que bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia*, que possuem respectivamente protoemina e protoporfirina, podem ser mortas através do processo de terapia fotodinâmica. (Smalley et al.¹⁵², 2006; Smalley et al.¹⁵³, 1998; Smalley et al.¹⁵⁴, 2003) No estudo de Henry⁷⁵, 1995, a irradiação foi realizada no comprimento de onda de 515 nm.

O espectro de absorção UV-visível das porfirinas exibem um intenso pico ao redor de 405 nm, seguido por absorções menores nos comprimentos de onda de 450 nm ao 700 nm. Ainda que a protoporfirina IX de ferro (PpIX de ferro) seja o pigmento predominante nas bactérias pigmentadas de negro, estas espécies também acumulam variadas quantidades de protoporfirina livres de ferro (Smalley et al.¹⁵², 2006; Shah, Gharbia¹⁴⁶, 1993; Shah et al.¹⁴⁷, 1979), as quais são fotossensíveis em outros comprimentos de onda.

Assim, os resultados de redução bacteriana encontrados para o grupo L+D-, quando a maior fluência foi empregada (60 J/cm²), podem estar relacionados com a excitação das porfirinas endógenas na banda Q (ao redor de 665 nm), uma vez que o comprimento de onda do laser utilizado foi 665 nm (Shah, Gharbia¹⁴⁶, 1993; Shah et al.¹⁴⁷, 1979, Smalley et al.¹⁵³, 1998; Smalley et al.¹⁵⁴, 2003). No entanto, algumas espécies não são pigmentadas de negro e não produzem porfirina endógena.

Contudo, a redução bacteriana ocorrida na ausência do azul de metileno pode se dar pelo dano celular causado pela absorção da luz por certas bactérias que expressam citocromos do tipo *bd*. (D'Mello³⁵, 1996; Winstedt et al.²⁰¹, 2000; Megehee¹¹⁴, 2006). O citocromo-oxidase terminal *bd*, cuja principal função na cadeia respiratória é reduzir oxigênio e água (O_2 e H_2O), é crucial para impedir o dano gerado pelo oxigênio livre. Estas moléculas são importantes na energética celular e um déficit neste citocromo tipo *bd* pode provocar alteração ou morte celular. Neste estudo, a redução encontrada tanto em fase planctônica quanto em biofilme após irradiação (665 nm) na fluência de $60 J/cm^2$ pode ter atingido tanto as porfirinas endógenas quanto o citocromo *bd*, levando ao dano celular e, conseqüentemente, explicar a redução bacteriana observada. (Konig et al.⁹⁰, 2000; Winstedt et al.²⁰¹, 2000; Das et al.³³, 2005; D'Mello³⁵, 1996; Megehee¹¹⁴, 2006).

6.1.3 Grupo PDT (L+D+) em fase planctônica (suspensão) e em biofilme

Como dito anteriormente, para realizar a terapia fotodinâmica é necessário ocorrer uma interação entre a luz e o fotossensibilizador (corante apropriado), o qual é capaz de transferir essa energia para outras moléculas. Este processo resulta na liberação de espécies energéticas com tempos de vida curtos, que interagem com os sistemas biológicos para causar morte celular ou alterações teciduais. A

ação desta terapia é restrita a região onde a substância fotossensibilizadora ficou concentrada. Uma vez que os fotossensibilizadores irão absorver a luz irradiada, este fenômeno é geralmente muito seletivo. A excitação do fotossensibilizador depende do comprimento de onda no qual a luz é absorvida por um determinado composto. Geralmente usam-se lasers como fontes de luz, porém mais recentemente, LEDs vêm sendo utilizados.

Neste estudo utilizamos o laser de diodo vermelho operando em 665 nm e o fotossensibilizador de escolha foi o azul de metileno. A eficiência da absorção difere entre as substâncias e os comprimentos de onda. Por exemplo, a hematoporfirina absorve luz no azul (402 nm), no verde (526 nm) e no vermelho (630 nm). O coeficiente de extinção (eficiência da absorção) dessa substância é muito maior no azul e no verde, do que no vermelho. No entanto, quando se trabalha com sistemas biológicos a situação se torna mais complexa. O corpo humano é composto de proteínas e moléculas, tais como a melanina e a hemoglobina, que absorvem a luz azul e verde com muito maior eficiência do que a luz vermelha. De fato, grande parte da luz azul e verde dirigida para um tecido biológico é absorvida nos primeiros milímetros do alvo irradiado. Por outro lado, a luz vermelha e na região do infravermelho próximo, sofrem uma absorção muito menor e, portanto tem maior penetração. Em alguns procedimentos clínicos, nos deparamos com situações nas quais vários centímetros de espessura podem ser uma

barreira para esta irradiação. Para estes procedimentos, a luz deve ter capacidade de penetração para que atinja toda a extensão do local irradiado, levando energia suficiente para ativar o fotossensibilizador ali concentrado.

Por todos estes fatores, utilizamos neste estudo um laser de diodo operando em 665 nm, associado ao corante azul de metileno. De acordo com Jori⁸¹, 2006 a terapia fotodinâmica é baseada no conceito de que certo fotossensibilizador, não tóxico, pode ser preferencialmente localizado ou aplicado em certos tecidos ou áreas. Este fotossensibilizador é subsequenteiramente ativado por luz com comprimento de onda apropriado, gerando oxigênio singleto e radicais livres que são citotóxicos as células do tecido ou área específica (Phoenix, Harris¹³⁹, 2003; Foster et al.⁵⁰, 1991).

Nossos resultados referentes aos experimentos realizados com bactérias em fase planctônica (suspensão), revelaram que o fotossensibilizador na concentração de 25 µg/mL no grupo L-D+ gerou efeito tóxico. Desta forma, de acordo com o critério de que a terapia fotodinâmica deve aplicar um fotossensibilizador, não tóxico, escolhemos para o grupo L+D+ do experimento em fase planctônica a concentração de 12,5 µg/mL de azul de metileno.

Desta forma, utilizando 12,5 µg/mL de azul de metileno, obtivemos após PDT uma inativação de 70 % das bactérias em suspensão quando irradiamos as amostras com fluência de 30 J/cm².

Com o dobro da fluência (60 J/cm^2) obtivemos uma redução de 80% das u.f.c. em experimentos na fase planctônica. De acordo com Kjeldstad et al.⁸⁷, 1986; Foster et al.⁵⁰, 1991, Wilson, Dosbison¹⁹⁵, 1993; Soukos et al.^{120,122,123}, 1997, 1998, 1999 a inativação de bactérias é possível após sua incubação em compostos fotoativos, seguida de exposição à luz visível operando em comprimento de onda apropriado.

Para os experimentos do grupo terapia fotodinâmica em biofilme (L+D+), testamos duas diferentes concentrações do fotossensibilizador ($25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) uma vez que a toxicidade do azul de metileno no escuro não foi alta para bactérias em biofilme. Utilizando o azul de metileno na concentração de $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e irradiação com o laser na fluência de 30 J/cm^2 obtivemos uma redução de apenas 8% das u.f.c em biofilme. Ainda com a mesma concentração do fotossensibilizador ($25 \text{ }\mu\text{g/mL}$), porém com o dobro da fluência (60 J/cm^2) observamos uma redução em torno de 25% para as u.f.c em biofilme.

Buscando alcançar melhor redução bacteriana, testamos o azul de metileno numa maior concentração ($50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) e mantivemos os parâmetros das irradiações com fluências de 30 J/cm^2 e 60 J/cm^2 . Com a menor fluência, obtivemos em torno de 27% de redução das u.f.c. do biofilme. Utilizando 60 J/cm^2 atingimos 40% de redução das u.f.c. em biofilme.

A redução bacteriana alcançada com a terapia fotodinâmica foi menor em biofilme do que em fase planctônica. As bactérias, segundo

Sbordone, Bortolaia¹⁴⁴, 2003 e Wuertz et al.²⁰⁵, 2004, são excelentes organismos produtores de biofilme devido aos seus tamanhos reduzidos, alta taxa de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante. Esta proteção característica das bactérias em biofilme explica os resultados de 27% e 40% (no máximo) de redução após PDT utilizando a concentração de 50 µg/mL na presença de luz em fluências de 30 e 60 J/cm² (grupo L+D+) respectivamente. Por outro lado, em fase planctônica, mesmo utilizando uma concentração quatro vezes menor do mesmo fotossensibilizador (12,5 µg/mL), após PDT observamos uma redução das u.f.c de 70% e 80 % para a aplicação dos respectivos parâmetros de fluência de 30 J/cm² e 60 J/cm².

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que bactérias em biofilme são mais resistentes do que as mesmas bactérias em fase planctônica. Portanto, a persistência de certas infecções se deve a presença de microrganismos em biofilme (Suntharalingam, Cvitkovitch¹⁷², 2005; Marsh^{107, 109}, 2003, 2005; Costerton et al.³⁰, 1999).

Uma hipótese mais remota, encontrada na literatura, seria relacionar a maior resistência apresentada pelas bactérias quando em comunidade (biofilme) com mudanças fenotípicas causadas pela expressão de novos genes (Cochran et al.^{28,29}, 2000). Mesmo que microrganismos em fase planctônica (suspensão) ainda carreguem os

distintos e protegidos fenótipos, estes apenas são expressos quando aderidos ao dente. Whiteley et al.¹⁹¹, 2001 identificou 73 genes (correspondente a aproximadamente 1% do total de genes) diferentemente expressos em biofilme de *P. aeruginosa* quando comparado com o seu equivalente em fase planctônica, submetido a condições ambientais similares. No entanto, esta diferença de apenas 1 % na expressão dos genes foi crítica para o desenvolvimento de resistência desta bactéria em biofilme à antibióticos.

Apesar das bactérias em biofilme serem mais resistentes, Jori⁸¹, 2006 e Komic, MacRobert⁸⁹, 2006 concordam que a técnica da PDT pode oferecer diversas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana seria rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de antibióticos e anti-sépticos. Em segundo lugar, como a morte das bactérias não está ligada à mediação de radicais químicos, o desenvolvimento de resistência seria improvável. Finalmente, como nem o fotossensibilizador, ou a luz, em doses adequadas, são bactericidas, a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada, evitando a destruição da microbiota em outros locais (Brundish, Love¹⁸, 2000; Demidova, Hamblin³⁴, 2004). Portanto, nosso estudo mostrou que a PDT não deve ser utilizada como substitutiva de tratamentos já estabelecidos, mas sim como uma alternativa interessante

a antibióticos e anti-sépticos, os quais são utilizados como coadjuvantes aos métodos mecânicos de controle da qualidade da placa subgengival e supra gengival e também na descontaminação bacteriana de bolsas periodontais.

Tendo descrito e discutido os resultados obtidos para os experimentos realizados tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme múltiplas espécies, a seguir apresentamos a discussão dos resultados obtidos após análise molecular, novamente analisando o efeito da PDT tanto em suspensão quanto em modelo de biofilme.

6.2 Análise Molecular – Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Com avanços tecnológicos na área da microbiologia, atualmente é possível avaliar um grande número de amostras contendo largo espectro de espécies bacterianas com a técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization.

Sabemos que a etiologia da doença periodontal é multifatorial e que patologias periodontais observadas não são resultado de uma única bactéria, mas sim de uma associação bacteriana complexa. Segundo Liljemark et al.⁹³, 1997 e Kolenbrander⁸⁸, 2000, a cavidade bucal, com sua microbiota, é um sistema ecológico de complexidade desconcertante. É um sistema aberto de crescimento, ou seja, microrganismos e nutrientes são repetidamente introduzidos e retirados do sistema. Entretanto, estudos da década de 90, citados por Bhinu¹⁴,

2005, Lovegrove⁹⁷, 2004 e Cugini et al.³¹, 2000, já demonstravam que cada bactéria presente na cavidade bucal tem um importante papel no aparecimento e desenvolvimento da doença periodontal. Neste sentido, a relação entre a presença de certos tipos de bactérias e as várias formas de doenças periodontais vem sendo amplamente estudada com o intuito de encontrar tratamentos que sejam mais eficientes, com menos efeitos colaterais e que também possam atuar como forma de prevenção.

Neste estudo avaliamos 40 diferentes cepas bacterianas a partir de 120 amostras de placa colhidas supra e subgingivalmente, sendo o foco principal do estudo o efeito da terapia fotodinâmica tanto em fase planctônica quanto em biofilme. Além das contagens de unidades formadoras de colônia (u.f.c.), analisamos a redução bacteriana proporcionada pela PDT por análise molecular utilizando a técnica “Checkerboard DNA-DNA hybridization”, que será aqui discutida. Esta técnica tem a vantagem de permitir a avaliação de um número maior de espécies bacterianas (40 espécies) simultaneamente. Como resultado deste procedimento, encontramos diferentes quantidades de DNA das 40 bactérias pesquisadas, tanto em amostras de placa fresca (experimentos planctônicos), quanto em amostras de placa que foram cultivadas para formar biofilme. As porcentagens das reduções, das bactérias avaliadas em nosso estudo, serão aqui discutidas e estão mostradas no Capítulo 5, nas Tabelas 5 e 6 para experimentos em fase planctônica e Tabelas 7 e 8 para os resultados dos experimentos em biofilme. Estas tabelas ilustram

de maneira global as espécies que sofreram redução após a terapia fotodinâmica.

6.2.1 Análise molecular em fase planctônica - 30 J/cm²

Analisando a ação da PDT em fase planctônica quando o laser foi utilizado operando na fluência de 30 J/cm² observamos as seguintes reduções: *E. saburreum* com 54% de redução, *T. denticola* com 93%, *A. odontolyticus* com 60%, *N. mucosa* com 51%, *S. noxia* com 51%, *P. melaninogenica* com 52%, *E. corrodens* com 57%, *C. sputigena* com 82% e *P. micros* com 64%.

Observando grupos específicos, como por exemplo bactérias do “complexo vermelho”, a ação da terapia fotodinâmica (PDT), após sensibilização com 12,5 µg/mL de azul de metileno e irradiação com fluência de 30 J/cm², demonstrou um decréscimo de 69% para *Porphyromonas gingivalis*, 93% para *Treponema denticola* e de 36% para *Tannerella forsythia*.

De acordo com Cobb et al.²⁷, 1992, a eficácia da terapia periodontal está diretamente relacionada à habilidade do tratamento em reduzir ou eliminar os níveis e/ou a prevalência de uma ou mais espécies bacterianas patogênicas. Estudos de Cugini et al.³¹, 2000 e Haffajee et al.⁶⁷, 2004 utilizando o método do “Checkerboard DNA-DNA hybridization” relataram que a terapia periodontal convencional de raspagem e alisamento radicular (RAR) é, na maioria das vezes, capaz de reduzir a contagem do DNA das bactérias do “complexo vermelho” (*Porphyromonas*

gingivalis, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*). Por outro lado, estes autores relatam que pacientes periodontais com baixos níveis destes três microrganismos no período pré-terapia, eram fortemente associados aos casos onde se observou baixa resposta ao tratamento de RAR como tratamento único. Os dados do estudo sugerem ainda que pacientes com altos índices iniciais de *T. denticola*, geralmente possuem um benefício grande em relação ao processo saúde/doença apenas com o tratamento RAR. Pensando nos casos onde o tratamento de RAR não é o suficiente, a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa aos tratamentos coadjuvantes periodontais sem causar efeitos colaterais indesejáveis. Neste estudo, a terapia fotodinâmica foi eficiente na redução destas bactérias em fase planctônica. A importância de se obter reduções bacterianas, especialmente baixos níveis destes três microrganismos pertencentes ao “complexo vermelho” é relatada na literatura e nossos resultados mostraram expressiva redução destes microrganismos-chave. (Ali et al.⁴, 1992; Simonson et al.¹⁵⁰, 1992; Shiloah, Patters¹⁴⁸, 1994; Socransky et al.¹⁵⁸, 2000).

Ainda em fase planctônica utilizando 30 J/cm², a terapia fotodinâmica também foi eficiente na redução de outros patógenos. Nossos resultados mostram grande eficiência na redução do DNA de quase todas as 40 bactérias. Apenas *Actinomyces naeslundii* I, *Treponema socranskii*, *Streptococcus mitis* e *Prevotella intermedia* não sofreram qualquer redução após a PDT nestes parâmetros de irradiação.

A análise específica destas 40 bactérias é baseada na classificação de Socransky et al.¹⁵⁹, 1998 que identificaram seis grupos principais associados a microbiota periodontal, denominados complexos bacterianos. Grupo 1) *Actinomyces*; 2) complexo amarelo, que consiste de membros do gênero *Streptococcus*; 3) complexo verde, consistindo de espécies do gênero *Capnocytophaga*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo A, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter*; 4) complexo roxo, constituído de *Veillonella parvula* e de *Actinomyces odontolyticus*; 5) complexo laranja, consistindo de grupos bacterianos Gram-positivos; 6) complexo vermelho, consistindo das bactérias Gram-negativas, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Os quatro primeiros grupos colonizam facilmente a superfície dos dentes. Porém, o crescimento destes geralmente precede a colonização e a multiplicação dos grupos dos complexos laranja e vermelho, predominantemente Gram-negativos (Socransky, Haffajee¹⁵⁵, 2002).

6.2.2 Análise molecular em fase planctônica - 60 J/cm²

A ação da PDT, também foi analisada após irradiação laser com fluência de 60J/cm². Obtivemos redução superior a 50% da contagem do DNA nas seguintes bactérias: *P. gingivalis*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *F. nucleatum vincentii*, *T. denticola*, *P. nigrescens*, *A. odontolyticus*,

N. mucosa, *S. noxia*, *P. melaninogenica*, *E. corrodens*, *C. sputigena*, *P. micros*, *V. parvula* e *C. gracilis*.

Nossos resultados (60 J/cm²) também apresentaram uma diminuição do “complexo laranja”. Observamos 78% de redução de *F. nuc polymorphum*, 87% de *C. showae*, 84% de *F. periodonticum*, 87% de *F. nuc. vincentii*, 91% de *C. rectus*, 89% de *C. gracilis*, 63% de *F. nuc nucleatum* e 90% de *P. nigrescens*.

Também obtivemos reduções significativas para os complexos verde e roxo, como por exemplo 78% de redução de *A. actinomycetemcomitans*, 70% para *T. socranskii*, 72% para *V. parvula* e 67% para *C. ochracea*.

Nas bactérias do complexo vermelho em fase planctônica observamos redução de 75% na contagem do DNA de *Porphyromonas gingivalis*, 73% para *Treponema denticola* e 30% para *Tannerella forsythia*.

Feres et al.⁴⁵, 2001 citam que até o início dos anos 70, terapias baseadas na hipótese da placa não-específica focavam a redução da quantidade de placa. Posteriormente, a hipótese da placa específica determinou o papel de alguns microrganismos como *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *T.denticola*, *P.intermedia* e *F.nucleatum* nas diferentes formas de doença periodontal. Recentemente, foi sugerido que estes patógenos periodontais não atuam isoladamente e interações entre espécies, bem como o equilíbrio entre

bactérias patogênicas e benéficas afetam a progressão da doença e a resposta tecidual à terapia periodontal. Atualmente está bem estabelecido que um dos objetivos da terapia é o controle destes patógenos. Em geral, a composição bacteriana que predomina no estado de saúde dos tecidos do periodonto são cocos Gram-positivos imóveis, enquanto que na doença periodontal, esta microbiota é composta principalmente de microrganismos anaeróbios, bastonetes Gram-negativos e com motilidade. Por este motivo, neste estudo coletamos amostras de pacientes periodontais para mimetizar a condição natural das interações entre espécies, porém para interpretar os resultados, é interessante analisar o comportamento individual destas bactérias de acordo com cada terapia (grupo) aplicada.

Considerando *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, resultados similares ao nosso estudo na redução destes patógenos foram encontrados por Haas et al.⁷¹, 1997, após a terapia fotodinâmica, utilizando o diodo 690 nm associado ao fotossensibilizador azul de toluidina. Packer et al.¹³⁴, 2000, após terapia fotodinâmica utilizando o azul de toluidina e irradiação com laser vermelho (633 nm) operando até 111.4 J/cm², também encontrou altas porcentagens de redução de *Porphyromonas gingivalis*. König et al.⁹⁰, 2000 observou redução de *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Prevotella intermedia*. Dörtbudak et al.⁴⁰, 2001 atingiu mais

de 90% de morte de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* após terapia fotodinâmica.

Altos níveis de colonização de *V. parvula*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *Streptococcus mitis* e *C. gracilis* foram observados neste estudo. Podemos interpretar a presença destes microrganismos em nossas amostras tendo como base estudos como o de Mager et al.¹⁰¹, 2003. Estes autores analisaram comparativamente o local predominante da prevalência de microrganismos. *V. parvula*, *P. melaninogenica*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mucosa*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium periodonticum*, *F. nucleatum* ss *vincentii* e *Porphyromonas gingivalis* foram encontradas em maiores proporções em saliva e língua, enquanto que *Streptococcus mitis*, *S. oralis* e *S. noxia* se mostraram em níveis mais altos em outros tecidos mole. Os perfis microbianos supra e subgingival diferiram com relação à posição de onde foi colhida a amostra. Além disto, espécies diferentes, dentro de um mesmo gênero apresentam diferentes proporções de colonização das superfícies intra-orais. Dentro do gênero *Streptococcus*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. constellatus* foram espécies mais facilmente encontradas em tecidos mole e saliva do que em amostras dos dentes. Contudo, outras quatro espécies dentro do gênero *Streptococcus* colonizaram em proporções comparáveis tanto saliva e tecidos mole quanto superfícies dentais. De acordo com Becker et al.⁸, 2002, *Actinomyces gerencseriae*, *Bifidobacterium*, *S. mutans*, *Veillonella*, *S.*

salivarius, *S. constellatus*, *S. parasanguinis* e *Lactobacillus fermentum* foram associados predominantemente com sítios com cáries.

A composição bacteriana também pode variar dependendo da profundidade alcançada durante a coleta. Sunde et al.¹⁷¹, 2000 analisaram trinta e quatro pacientes portadores de periodontite com envolvimento apical. Analisando o DNA bacteriano das amostras por meio de 40 sondas previamente definidas, constatou-se que dependendo da incisão feita para o acesso à lesão, diferenças notáveis eram observadas com relação a presença de certos microrganismos. *Campylobacter gracilis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Propionibacterium acnes*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Streptococcus constellatus* e *Actinomyces naeslundii* foram identificados quando realizadas incisões marginais. Espécies bacterianas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Bacteroides forsythus* (*T. forsythia*) foram descobertas em mais que 60% das lesões de ambos os grupos. *P. endodontalis* foi abundante em tecido periapical. Estes dados apóiam a idéia que bactérias da bolsa periodontal podem alcançar tecidos subjacentes através de bacteremia durante os procedimentos realizados durante o tratamento odontológico. Desta forma, neste estudo, apesar de padronizar a coleta, os microrganismos que encontramos e seus diferentes níveis podem estar relacionados com a variação na quantidade de amostra do local de onde foi coletada.

Darout et al.³², 2002, analisaram amostras de pacientes, encontrando altos níveis de *A. actinomycetemcomitans*, *P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *C. rectus* e *E. corrodens*, associados com a doença periodontal. Bactérias como *P. micros*, *V. parvula*, *S. mutans*, *S. anginosus*, *A. israelii*, *C. sputigena*, *C. gingivalis* e também *A. actinomycetemcomitans*, *P. melaninogenica*, *C. rectus*, foram mais encontradas na saliva de pacientes com altos índices de cárie. Duerden⁴², 1980, afirmou que ocorre um mecanismo seletivo no qual certas bactérias são mais capazes de sobreviver e se multiplicar do que outras, graças a inter-relação entre elas (comensalismo e antagonismo), e ao suprimento nutricional existente. Bactérias anaeróbias Gram-negativas, como por exemplo bacilos produtores de pigmento negro e *Fusobacterium nucleatum*, são mais sensíveis ao oxigênio e também necessitam da presença de outros organismos para sobreviver. Portanto, algumas combinações bacterianas são necessárias e podem ser mais virulentas que outras (Van Dalen et al.¹⁸¹, 1998; Vansteenberg et al.¹⁸⁴, 1993).

Como fatores de ataque ou agressão, as células Gram-positivas e Gram-negativas caracterizam-se por graus diferentes de virulência. Nas bactérias Gram-negativas a endotoxina (LPS), lhes confere a propriedade de patogenicidade, enquanto nas bactérias Gram-positivas a endotoxina, composta pelo ácido lipoteicoico, tem como característica principal a aderência. O lipopolissacarídeo (LPS) é o maior fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na

amplificação das reações inflamatórias. Esta endotoxina é um antígeno fraco não específico que é pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar a cascata do complemento. A ativação do complemento envolve a formação de importantes mediadores da inflamação. Além disto, ativa plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. O LPS induz os macrófagos a secretarem outras proteínas, as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator alfa de necrose tumoral (TNF α), oxigênio reativo, nitrogênio intermediário (óxido nítrico), interferon α , β e γ , fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas. Estes são fatores importantes na doença periodontal e também responsáveis pelas reabsorções ósseas. Mesmo quantidades pequenas de endotoxinas são capazes de induzir uma resposta inflamatória. As endotoxinas são encontradas em maior quantidade em dentes sintomáticos que naqueles assintomáticos. Considerando estes fatores de agressividade das células bacterianas, neste estudo, além da análise por cultura bacteriana, investigamos a presença do DNA bacteriano, mesmo que não viável para o crescimento em agar, uma vez que a toxicidade, em especial das Gram-negativas (LPS) é fator determinante na condição inflamatória periodontal.

Como efeito da terapia fotodinâmica aplicada em fase planctônica, neste estudo observamos que mais de 80 % das espécies estudadas sofreram uma redução considerável na contagem do DNA após PDT. Desta forma, reduzindo os níveis gerais destes

microrganismos acreditamos favorecer a resposta tecidual à terapia periodontal e paralisar a progressão da doença.

Dzink et al.⁴³, 1988 demonstraram que há uma mudança significativa na microbiota subgengival quando a doença está ativa ou inativa. A comparação de 100 sítios com doença periodontal ativa com 150 sítios não ativos mostraram um aumento dos níveis de *Tannerella forsythia* (*B. forsythus*), *B. gingivalis*, *P. micros*, *A. actinomycetemcomitans*, *W. recta* e *B. intermedius* nos sítos ativos.

Nishida et al.¹²⁹, 2000, definem que a patogênese da periodontite envolve bactérias anaeróbias da cavidade bucal e que o dano tecidual ocorre como resultado de uma complexa interação patogênica bacteriana e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro à infecção.

Observamos ainda que a eliminação do DNA bacteriano proporcionada pela terapia fotodinâmica foi diretamente relacionada com a fluência utilizada. Por exemplo, para *P.gingivalis*, importante patógeno para a doença periodontal, houve redução de 69% quando utilizamos a fluência de 30 J/cm². Já quando utilizamos 60 J/cm², obtivemos 75% de redução de *P.gingivalis*. Da mesma forma para *F. nuc. vincentii* (64% e 87%), *C. rectus* (75% e 91%), *P. nigrescens* (58% e 90%), *F. nuc nucleatum* (63% e 63%) e *C. gracilis* (77% e 89%).

Nas fluências de 30 J/cm² ou de 60 J/cm² em fase planctônica, os microrganismos *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a*), *F. nuc vincentii*, *C. rectus*, *T. socranskii*, *P.*

micros, *V. parvula*, *C. ochracea*, *T. denticola*, *P. nigrescens*, *A. odontolyticus*, *F. nuc polymo*, *C. showae*, *F. periodonticum*, *N. mucosa*, *F. nuc nucleatum*, *S. noxia*, *P. melaninogenica*, *E. corrodens*, *C. sputigena*, *C. gracilis* sofreram uma redução de mais de 50% na contagem do DNA quando a terapia fotodinâmica foi aplicada.

Estas reduções são bastante importantes, pois apesar de cada microrganismo ter o seu papel, acredita-se que bastonetes anaeróbios Gram-negativos, bastonetes móveis e espiroquetas são os principais patógenos periodontais (Lovegrove⁹⁷, 2004). Estas diferenças no perfil bacteriano entre saúde e doença periodontal são creditadas pela hipótese de especificidade de placa. No entanto, é necessário considerar que a composição da microbiota varia não somente entre os diferentes estágios da doença, mas também entre pessoas com sinais e sintomas semelhantes. A reação imunoinflamatória do hospedeiro e os produtos do biofilme dental, tais como amônia, sulfito de hidrogênio, aminas tóxicas, indol e escatol são potencialmente prejudiciais ao tecidos periodontais. Algumas das enzimas da placa que podem ser de origem bacteriana ou de células lisossômicas do hospedeiro são capazes de degradar os tecidos conjuntivos periodontais. Produtos citotóxicos de alto peso molecular, tais como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos das paredes e membranas das células bacterianas podem penetrar no epitélio juncional e sensibilizar os tecidos do hospedeiro, iniciando e mantendo dessa forma, uma resposta inflamatória exacerbada e não desejada. Por outro

lado, a presença de certas bactérias pode causar agressões no periodonto de um indivíduo, mas não em outro, pois a resposta imunológica é distinta e individual para cada hospedeiro. Deste modo, muitos microrganismos periodontopatogênicos são encontrados tanto em áreas sadias quanto nas áreas acometidas pela doença. Conforme Socransky et al.¹⁵⁷, 1987, diferenças demonstradas apenas na composição da microbiota nas diversas condições patológicas da gengiva e periodonto de sustentação não terão, necessariamente, significação patogênica. Na avaliação do papel etiológico destes microrganismos, deve-se considerar que a quantidade de bactérias presentes em áreas saudáveis deve ser consideravelmente inferior às encontradas em áreas patológicas, e que a eliminação ou redução à números toleráveis destes microrganismos deve, ao menos, estancar a progressão da lesão ativa.

Por estes motivos, analisamos neste estudo a quantidade de bactérias viáveis após a PDT e também, por meio de análise molecular (Checkerboard), o número de células bacterianas que resistiram à terapia.

Apesar do procedimento de raspagem e alisamento radicular ser a forma mais comum de terapia da doença periodontal, muito ainda tem a ser descoberto em relação aos seus efeitos na microbiota subgengival quando associado a alguns métodos complementares de tratamento. Atualmente, estudos estão direcionados para encontrar novos métodos coadjuvantes que não causem os efeitos colaterais indesejáveis e que aumentem a efetividade do tratamento mecânico. Mantendo este

objetivo, avaliamos a partir de 120 amostras de placa colhidas supra e subgengivalmente o efeito da terapia fotodinâmica como coadjuvante na redução bacteriana, altamente desejada para que ocorra um equilíbrio entre a microbiota e a resposta do hospedeiro e conseqüentemente a paralisação da doença. Estas amostras foram utilizadas tanto para os experimentos em fase planctônica quanto para as análises em biofilme.

Conforme discutido anteriormente, nossos resultados em fase planctônica são encorajadores. Após a terapia fotodinâmica em bactérias em suspensão, obtivemos reduções significativas na contagem do DNA das 40 espécies tanto para o grupo no qual utilizamos 30 J/cm² quanto para o grupo 60 J/cm², sendo que o último apresentou os melhores resultados. Porém, a contagem do DNA de espécies bacterianas em biofilme após PDT, utilizando o azul de metileno na concentração de 50 µg/mL e mantendo os parâmetros de irradiação em 30 J/cm² e 60 J/cm², não apresentaram o mesmo comportamento e serão discutidas a seguir.

6.2.3 Análise molecular em biofilme - 30 J/cm²

De acordo com nossos resultados pudemos observar que, em biofilme, aplicando a menor fluência (30 J/cm²), obtivemos a persistência do DNA de 26 diferentes bactérias. Quando a eliminação do DNA foi possível, a maior taxa de redução encontrada na contagem do DNA foi de 33% (para *T. socranskii*). Utilizando 60 J/cm², ainda com

concentração de 50 µg/mL, atingimos um maior número de bactérias e a redução obtida foi consideravelmente maior. No entanto, a ação da terapia fotodinâmica em biofilme é bastante inferior se comparada aos resultados obtidos na fase planctônica.

Utilizando 30 J/cm² em biofilme os microrganismos tiveram as seguintes reduções: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (24%), *Campylobacter rectus* (8%), *Treponema socranskii* (33%), *Actinomyces viscosus* (9,8%), *Actinomyces israelii* (5,5%), *Streptococcus intermedius* (17,6%), *Prevotella nigrescens* (11,3%), *Actinomyces odontolyticus* (22,1%), *Neisseria mucosa* (6,5%), *Streptococcus gordonii* (10%), *Propionibacterium acnes* (31,5%), *Streptococcus mitis* (7,2%) e *Leptotrichia buccalis* (13%).

Nenhuma redução foi observada em biofilme quando irradiamos com a fluência de 30 J/cm² para as seguintes bactérias: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Eubacterium saburreum*, *Peptostreptococcus micros*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces gerencseriae*, *Streptococcus oralis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Selenomonas noxia*, *Prevotella melaninogenica*, *Eikenella*

corrodens, *Gemella morbillorum*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter gracilis*, *Prevotella intermedia*.

6.2.4 Análise molecular em biofilme - 60 J/cm²

Como resultado da PDT em biofilme utilizando 60 J/cm², observamos redução considerável para os microrganismos: *Treponema socranskii* (100%), *Streptococcus anginosus* (11%), *Streptococcus sanguis* (5,7%), *Actinomyces gerencseriae* (7,2%), *Capnocytophaga ochracea* (42%), *Actinomyces israelii* (8,6%), *Streptococcus intermedius* (21%), *Treponema denticola* (6,2%), *Prevotella nigrescens* (12%), *Campylobacter showae* (5,8%), *Fusobacterium periodonticum* (6,8%), *Fusobacterium nucleatum* sp. *Nucleatum* (8%), *Capnocytophaga gingivalis* (31,4%), *Streptococcus gordonii* (23%), *Selenomonas noxia* (44,8%), *Propionibacterium acnes* (23,7%), *Streptococcus mitis* (21%), *Eikenella corrodens* (50%), *Gemella morbillorum* (39,6%), *Capnocytophaga sputigena* (26%), *Leptotrichia buccalis* (18%) e *Campylobacter gracilis* (39%).

Para o “complexo vermelho” em biofilme, apenas *T. denticola* foi reduzida quando a maior fluência (60J/cm²) foi utilizada.

Nenhuma redução foi observada em biofilme quando irradiamos com a fluência de 60 J/cm² para as seguintes bactérias: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* sp. *vincentii*,

Campylobacter rectus, *Eubacterium saburreum*, *Peptostreptococcus micros*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces viscosus*), *Streptococcus oralis*, *Actinomyces odontolyticus*l, *Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum*, *Neisseria mucosa*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella intermedia*.

Veillonella parvula, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* e *Campylobacter gracilis*, também em biofilme, foram os microrganismos que se apresentaram em altos níveis. No entanto, diferente da fase planctônica, em biofilme as reduções bacterianas foram consideravelmente menores ou mesmo não existiram.

A dificuldade de redução bacteriana por meio da terapia fotodinâmica em biofilme se deve a complexa organização das bactérias neste meio. O biofilme pode ser considerado como uma comunidade bacteriana, em uma matriz composta por polímeros extracelulares, aderida a uma superfície. Na cavidade bucal, qualquer superfície sólida como esmalte, cimento radicular, dentina, implantes, restaurações ou próteses estarão recobertos por um biofilme. No entanto, a aderência bacteriana envolve mecanismos físico-químicos específicos, sendo influenciada não apenas pela interação entre as estruturas da superfície das bactérias e as superfícies colonizáveis, mas também pela atividade da saliva como um fluido em suspensão. Algumas das bactérias pioneiras que aderem diretamente às superfícies dentais são espécies de streptococcus (como *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, etc) e

actinomyces. Isto ocorre, pois a maioria dos streptococcus orais são anaeróbios facultativos e portanto, capazes de crescer tanto em condições aeróbias como anaeróbias. O biofilme bucal possui uma extensa variedade de fenótipos, particularmente à respeito da sensibilidade ao oxigênio (Ackroyd et al.¹, 2001, Arakane et al.⁵, 1996). A placa supragengival é caracterizada inicialmente por uma microbiota predominantemente Gram-positiva e anaeróbia facultativa (Socransky, Haffajee¹⁵⁹, 1998; Malik et al.¹⁰⁵, 1992). Nos casos de periodontite, há uma predominância de bastonetes anaeróbios Gram-negativos, e em alguns casos números elevados de espiroquetas (Caffesse et al.²³, 1995; Kolenbrander et al.⁸⁸, 2000). Estudos relatam que a transição dos microrganismos Gram-positivos para Gram-negativos observada na estrutura da placa dental é associada a uma transição fisiológica na placa em desenvolvimento (Haffajee, Socransky⁶⁵, 2005). Os colonizadores iniciais utilizam o oxigênio e baixam o potencial de oxi-redução do meio, favorecendo o crescimento de espécies anaeróbias. O meio nutricional na superfície dentária é totalmente diferente daquele encontrado nas bolsas periodontais. Na bolsa periodontal, os microrganismos, mesmo os mais exigentes, encontram todos os nutrientes necessários para seu crescimento (Costerton et al.³⁰, 1999).

De maneira geral, por ser uma comunidade que possui “auto proteção” o biofilme não limita apenas a penetração de antibióticos ou drogas locais, mas também a penetração dos fotossensibilizadores

necessários para a ação da terapia fotodinâmica, que conseqüentemente, foi prejudicada em biofilme.

Nossos resultados mostraram que não houve expressiva redução das bactérias em biofilme quando aplicamos o fotossensibilizador a 25 µg/mL, resistência explicada pelas características do biofilme. Portanto, como descrito anteriormente, o dobro da concentração (50 µg/mL) também foi testada. Porém, apesar de ter ocorrido uma diminuição na contagem do DNA bacteriano em biofilme, a maioria das bactérias ainda foram altamente resistentes à terapia.

Da mesma forma que outros estudos em terapia fotodinâmica em fase planctônica, também encontramos razoáveis taxas de redução bacteriana. No entanto, nossos dados evidenciam que esta terapia não tem a mesma efetividade quando aplicada em biofilme. Desta forma, este estudo estabeleceu melhores parâmetros de irradiação, bem como concentrações diferenciadas de fotossensibilizador quando se trata de aplicar a PDT em biofilme. Ainda resta descobrir drogas com penetração ideal em biofilme e diferentes comprimentos de onda de excitação para que a PDT possa ser empregada com maior benefício, especialmente em biofilme dental.

Neste estudo, mostramos que a PDT pode reduzir o número de microrganismos viáveis, e o efeito da morte bacteriana foi dependente da concentração da droga (azul de metileno) e a densidade de energia utilizada durante a irradiação.

Além disso, os resultados da terapia foram dependentes das fases estudadas (planctônica e biofilme). Concluimos que a susceptibilidade das bactérias em fase planctônica é muito maior quando comparadas com biofilme. E, portanto a eficiência da redução dos microrganismos foi melhor observada em fase planctônica.

Estudos envolvendo a terapia fotodinâmica devem continuar sendo realizados para determinar os melhores parâmetros de energia e novos fotossensibilizadores, de forma que esta terapia possa ser empregada com sucesso como coadjuvante ao tratamento periodontal.

7 Conclusão

Em função de nossa metodologia e resultados, podemos concluir que:

1. a terapia fotodinâmica (PDT) causou, em fase planctônica, reduções muito maiores do que em biofilme. Utilizando o fotossensibilizador na concentração de 12,5 µg/mL, a terapia fotodinâmica atingiu reduções (do número de unidades formadoras de colônias (u.f.c)) de 70% quando o laser foi utilizado em 30 J/cm² e 80% de redução quando o parâmetro de irradiação foi de 60 J/cm²;
2. em modelo de biofilme, mesmo utilizando o fotossensibilizador em uma concentração quatro vezes maior, a redução das u.f.c. foi de 27% e 40% após a irradiação laser nas fluências de 30 J/cm² e 60 J/cm² respectivamente;
3. a análise molecular (Checkerboard DNA-DNA Hybridization) mostrou alta susceptibilidade da maioria dos 40 microrganismos estudados, incluindo as bactérias do “complexo vermelho” (*Pg*, *Td*, *Tf*) e “laranja”, quando a PDT foi aplicada em fase planctônica (suspensão). No entanto, em biofilme, o DNA da maioria das 40 bactérias estudadas ainda se encontrava preservado;

4. os resultados evidenciam que microrganismos em biofilmes são mais resistentes à PDT que bactérias em fase planctônica (suspensão).

8 Referências *

1. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001; 74: 656-69.
2. Ade WG, Moram J, Morgan, JR. The effects of antimicrobial acrylic strips on the subgingival microflora in chronic periodontites. *J Clin Periodontol.*1992; 9: 127-34.
3. Ahn WS, Bae SM, Huh SW, Lee JM, Namkoong SE, Han SI, et al. Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14: 475-82.
4. Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol.* 1992; 63:540-7.
5. Arakane K, Ryu A, Hayashi C, Masunaga T, Shinmoto K, Mashiko S, Nagano T, Hirobe M. Singlet oxygen ((1)Delta(g)) generation from coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 223 : 578-82.
6. Armitage GC. Basic features of biofilms--why are they difficult therapeutic targets? *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2004;17:30-4.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Bartlett JA, Indig GL. Effect of self-association and protein binding on the photochemical reactivity of triarylmethans. Implication of noncovalent interactions on the competition between photosensitization mechanisms type I and type II. *Photochem Photobiol.* 1999;70:490-8.
8. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin J.L, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1001-9.
9. Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: an in vivo study. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14: 137-43.
10. Bertoloni G, Salvato B, Dall'acqua M, Vazzoler M, Jori G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem Photobiol.* 1984; 39:811-6.
11. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, Van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 59:149-55.
12. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, Van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios.* 1992; 71:33-46.
13. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson MA. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol.* 1998; 68: 370-6.
14. Bhinu VS. Insight into biofilm-associated microbial life. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2005; 10: 15-21.
15. Birmingham JJ, Hughes NP, Treloar R. Diffusion and binding measurements within oral biofilms using fluorescence photobleaching recovery methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995; 350 (1334): 325-43.

16. Black C, Allan I, Ford SK, Wilson M, McNab R. Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. Arch Oral Biol. 2004; 49: 295-304.
17. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. Photochem Photobiol. 1996; 64: 469-85.
18. Brundish DE, Love WG. Photodynamic therapy comes of age. IDrugs. 2000; 3:1487-508.
19. Burne RA. Oral streptococci products of their environment. J Dent Res. 1998; 77:445-52.
20. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. J Med Microbiol. 1993;38:401-5.
21. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminum arsenide diode-laser. J Dent. 1994; 22: 273-8.
22. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. Caries Res. 1995; 29:192-7.
23. Caffesse R, Motta L, Morrison E. The rationale for periodontal therapy. Periodontol 2000. 1995; 9: 7-13.
24. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. J Photochem Photobiol B. 2005;78 :1-6.
25. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4288-95.

26. Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, et al. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:525-34.
27. Cobb CM, Mccawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. *J Periodontol*. 1992; 63:701-7.
28. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol*. 2000;88:22-30.
29. Cochran WL, Suh SJ, McFeters GA, Stewart PS. Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol*. 2000;88:546-53.
30. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284: 1318-22.
31. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*. 2000;27:30-6.
32. Darout IA, Albandar JM, Skaug NS, Ali RW. Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 411.
33. Das A, Silaghi-Dumitrescu R, Ljungdahl LG, Kurtz DM JR. Cytochrome bd oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *J Bacteriol*. 2005;187:2020-9.
34. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *International Journal of Immunopathol Pharmacol*. 2004; 17: 245-54.

35. D'Mello R, Hill S, Poole R K. The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition [Abstract]. Microbiology. 1996; 142: 755–63.
36. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992; 37: 883-7.
37. Dolgachev V, Oberley LW, Huang TT, Kraniak JM, Tainsky MA, Hanada K, et al. A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 332:411-7.
38. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 881-90.
39. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2001; 12: 104-8.
40. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Matejka M. Photodynamic therapy for bacterial reduction of periodontal microorganisms. J Laser Appl. 2001; 1: 115-8.
41. Dudkowiak A. Selection of dyes for medical application by determination of their properties and estimation of the yield of triplet state generation. Phys Med. 2004; 20 (Suppl 1): 43-5.
42. Duerden BI. The isolation and identification of Bacteroides spp. from the normal human gingival flora. J Med Microbiol. 1980;13:89-101.
43. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1988;15:316-23.
44. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care. 2006;10: R27.

45. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001;28:597-609.
46. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol.* 2002;29:724-35.
47. Fontana CR, Kurachi C, Mendonca CR, Bagnato VS. Microbial reduction in periodontal pockets under exposition of a medium power diode laser: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2004;35:263-8.
48. Fontana CR, Kurachi C, Mendonca CR, Bagnato VS. Temperature variation at soft periodontal and rat bone tissues during a medium-power diode laser exposure. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 519-22.
49. Fontana CR, Malta DAMP, Fontana UF, Sampaio JEC, Bernardes VL, Andrade MF. Study of the morphological alterations to enamel and dentin in human and bovine teeth after irradiation with Er : YAG laser. *Laser Physics Letters* 2004; 1: 411-6.
50. Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SI, Hilf R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1991;126:296-303.
51. Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L. Enterococcus faecalis heme-dependent catalase. *J Bacteriol.* 2002;184:6351-6.
52. Garcez AS, Souza FR, Nunez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia - laser de baixa potencia para redução microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2003; 57:223-6.
53. Genco RJ. Using antimicrobial agents to manage periodontal diseases. *J Am Dent Assoc.* 1991;122:30-8.

54. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997;11:160-7.
55. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002;46:202-56.
56. Golding PS, Maddocks L, King TA, Drucker DB. Eradication of bacterial species via photosensitization. *Proc SPIE*. 1999; 3563:18-27.
57. Gorman SA, Brown SB, Griffiths J. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25:71-108.
58. Gouw-Soares SC, Gutknecht N, Conrads G, Lampert F, Matson E, Eduardo CP. Bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. *J Clin Laser Med Surg*. 2000; 18:81-7.
59. Greenbaum L, Rothmann C, Lavie R, Malik Z. Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biol Chem*. 2000;381:1251-8.
60. Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22:9-13.
61. Gutknecht N, Kaiser F, Hassan A, Lampert F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. *J. Clin Laser Med Surg*. 1996; 14:7-11.
62. Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in vitro root canal. *J Clin Laser Med Surg*, 1996; 14: 77-80.

63. Gutknecht N, Van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bacterial effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg.* 2000; 18: 57-60.
64. Haas R, Dörbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8: 249-54.
65. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005;38:9-12.
66. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000.* 2006;42:7-12
67. Haffajee AD, Uzel NG, Arguello EI, Torresyap G, Guerrero DM, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 869-77.
68. Hardee MW, Miserendino L, Kos W, Walia H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endod.* 1994; 20:377-80.
69. Hardy JH, Newman HN, Strahan JD. Direct irrigation and subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1982; 9: 57-65.
70. Harris F, Chatfield LK, Phoenix DA. Phenothiazinium based photosensitisers - Photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. *Curr Drug Targets.* 2005;6: 615-27
71. Hass R, Dörbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8: 249-54.

72. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005;76: 1275-81.
73. Henderson BW, Mayhew E. Experience with the liposomal delivery of the photosensitizer isoBoSiNc. *Proc SPIE.* 1990; 1203: 126-35.
74. Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JI. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 34: 123-8.
75. Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews JI. Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol.* 1995; 61: 410-3.
76. Hitzig C, Charbit Y, Bitton C, Fosse T, Teboul M, Hannoun L, et al. Topical metronidazole as an adjunct to subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1994; 21:146-51.
77. Ivanov KN, Titorenko VA, Shoub GM, Lepilin AV, Ovchinnikov IS, Mischenko OS, et al. Photodynamic action of laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms of oral cavity. *Proc of SPIE.* 2000;3910:30 –4.
78. Jackson Z, Meghji S, Macrobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999; 14: 150-7.
79. Jockusch S, Lee D, Turro NJ, Leonard EF. Photo-induced inactivation of viruses: adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Qbeta bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:7446-51.
80. Jori G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 36: 87-93.

81. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006; 25: 505-19.
82. Jori G, Spikes JD. Photothermal sensitizers: possible use in tumor therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1990; 6:93-101.
83. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006; 38:468-81
84. Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med*. 1998; 23: 299-309.
85. Kawamoto K, Senda N, Shimada K, Ito K, Hirano Y, Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. *Lasers Med Sci*. 2000; 15: 257-62.
86. Kim TS, Burklin T, Schacher B, Ratka-Kruger P, Schaecken MT, Renggli HH, et al. Pharmacokinetic profile of a locally administered doxycycline gel in crevicular fluid, blood, and saliva. *J Periodontol*. 2002; 73: 1285-91.
87. Kjeldstad B, Johnsson A. An action spectrum for blue and near ultraviolet inactivation of *Propionibacterium acnes*; with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1986; 43: 67-70.

88. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-37.
89. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006; 25: 487-504.
90. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000; 46: 1297-303.
91. Lagneaux L, DE Meulenaer EC, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Moerman C, et al. Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Exp Hematol.* 2002; 30: 1293-1301.
92. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2005;4: 503-9.
93. Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT, et al. Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res.* 1997; 11: 14-23.
94. Lin PP, Beck FM, Matsue M, Horton JE. The effect of a pulsed Nd:YAG laser on periodontal pockets following subgingival application [abstracts] *J Dent Res.* 1992; 71:299.
95. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst.* 1961; 26:1-11.
96. Liu CM, Hou LT, Wong MY, Lan WH. Comparison of Nd : YAG laser versus scaling and root planing in periodontal therapy. *J Periodontol.* 1999; 70: 1276-82.
97. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol.* 2004; (87):7-21.

98. McCaughan JS. Photodynamic therapy - a review. *Drugs Aging*. 1999; 15: 49-68.
99. McGuff PE, Bell EJ. The effect of laser energy radiation on bacteria. *Med Biol Illus*. 1966;16:191-3.
100. Mc Ilroy BW, Curnow A, Buonaccorsi G, Scott MA, Bown SG, Macrobert AJ. Spatial measurement of oxygen levels during photodynamic therapy using time-resolved optical spectroscopy. *J Photochem Photobiol B*. 1998; 43: 47-55.
101. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 644-54.
102. Magnusson I. The use of locally-delivered metronidazole in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 959-63.
103. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3: 907-17.
104. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*. 1990;5: 281-93.
105. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 14: 262-6.
106. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y, Ehrenberg B. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B*. 1990; 6: 419-30.

107. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. Oral Dis. 2003;9 (Suppl 1):16-22.
108. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. 2004; 38: 204-11.
109. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005;32 (Suppl 6):7-15.
110. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol. 1995; 15:169-75.
111. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. J Periodontal Res. 2003; 38: 428-35.
112. Mathews MM. Comparative study of lethal photosensitization of *sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and by toluidine blue. J Bacteriol. 1963; 85: 322-8.
113. Mayhew E, Vaughan L, Panus A, Murray M, Henderson BW. Lipid-associated methylpheophorbide-a (hexyl-ether) as a photodynamic agent in tumor-bearing mice. Photochem Photobiol. 1993; 58: 845-51.
114. Megehee JA, Jonathan P, Hosler JP, Lundrigan MD. Evidence for a cytochrome *bcc-aa₃* interaction in the respiratory chain of *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology. 2006; 152: 823-9.
115. Meisel P, Kocher T Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B. 2005; 79: 159-70.
116. Milanesi C, Biolo R, Reddi E, Jori G. Ultrastructural studies on the mechanism of the photodynamic therapy of tumors. Photochem Photobiol. 1987;46:675-81.

117. Millson CE, Wilson M, Macrobert AJ, Bedwell J, Bown SG. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Med Microbiol.* 1996; 44:245-52.
118. Moan J. Properties for optimal PDT sensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 1990; 5:521-4.
119. Moritz A, Doertbudak O, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Sperr W. Nd:YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbiological examinations. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 1525-30.
120. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. *Lasers Surg Med.* 1997; 21: 221-6.
121. Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P, et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J Clin Laser Med Surg.* 1997; 15:33-7.
122. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:302-11.
123. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jakolitsch S, Kluger W, Wernisch J, et al. The bactericidal effect of Nd: YAG, Ho : YAG, and Er : YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. *J Clin Laser Med Surg.* 1999; 17: 161-4.
124. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
125. Mouhyi J, Sennerby L, Reck JV. The soft tissue response to contaminated and cleaned titanium surfaces using CO2 laser, citric acid and hydrogen peroxide. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:93-8.

126. Neff S, Abels C, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. *Med Welt*. 2000; 51: 410-4.
127. Niederweis M. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol*. 2003; 49: 1167-77.
128. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67: 593-656.
129. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Calcium and the risk for periodontal disease. *J Periodontol*. 2000; 71:1057-66.
130. Nitzan Y, Shainberg B, Malik Z. Photodynamic effects of deuteroporphyrin on Gram-positive bacteria. *Curr Microbiol*. 1987; 15:251-8.
131. Nussbaum EI, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660- and 905- nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg*. 2002; 20:325-33.
132. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers in Surg Med*. 2002; 31:86-90.
133. Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med*. 1992; 12: 450-8.
134. Packer S, Bhatti M, Wilson M. Inactivation of proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. *Lasers Med Sci*. 2000; 15: 24-30.
135. Pappas JD, Walker CB. Gingival crevicular fluid levels of erythromycin and the in vitro effect on periodontal bacteria. *J Dent Res*. 1987;66(Special Issue): 154.

136. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J.* 2001;15: 612-7.
137. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33: 551-6.
138. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004; 75: 1343-9.
139. Phoenix DA, Harris F. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? *Trends Mol Med.* 2003; 9: 283-5.
140. Radvar M, MacFarlane TW, Mackenzie D, Whitters CJ, Payne AP, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dent J.* 1996; 180: 57-62.
141. Romanos GE, Everts H, Nentwig GH. Effects of diode and Nd:YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. *J Periodontol.* 2000; 71: 810-5.
142. Sakellari D, Goodson JM, Socransky SS, Kolokotronis A, Konstantinidis A. Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 53-60.
143. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 1993; 28: 204-10.
144. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig.* 2003; 7: 181-8.
145. Scheetz MH, Hurt KM, Noskin GA, Oliphant CM. Applying antimicrobial pharmacodynamics to resistant gram-negative pathogens. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 63:1346-60.

146. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical analyses of black-pigmented gram-negative anaerobes. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 6: 89-96.
147. Shah HN, Bonnett R, Mateen B, Williams RA. The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. Biochem J. 1979; 180:45-50.
148. Shiloah J, Patters MR. DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing, and intra-pocket irrigation. J Periodontol. 1994; 65: 568-75.
149. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. J Periodontol. 2005; 76:1100-5.
150. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. J Periodontol. 1992;63:270-3.
151. Slots J, Rams ET. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. J Clin Periodontol. 1990; 17: 479 – 93.
152. Smalley JW, Birss AJ, Szmigielski B, Potempa J. The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes micro-oxo bis-haem formation from monomeric iron(III) protoporphyrin IX. Microbiology. 2006;152:1839-45.
153. Smalley JW, Silver J, Marsh PJ, Birss AJ. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. Biochem J. 1998; 331: 681-5.

154. Smalley JW, Silver J, Birss AJ, Withnall R, Titler PJ. The haem pigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron(III) protoporphyrin IX in the monomeric form. Microbiology. 2003; 149:1711-8.
155. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28:12-55.
156. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; 38:135-87.
157. Socransky SS, Haffajee AD, Smith GL, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1987; 14: 588-93.
158. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2000; 27: 810-8.
159. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.
160. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. Biotechniques.1994;17: 788-92.
161. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:352-62.
162. Som S, Goodson JM, Abernethy A, Ruggiero K, Dunham J, Skobe Z, et al. Characterization and validation of a dental plaque microcosm laboratory biofilm [abstract 1408] J Dent Res. 2004; 83.
163. Soukos NS, Hamblin M R, Hasan T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin e6 conjugates. Photochem Photobiol. 1997; 65:723-9.

164. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 161-8.
165. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speigh PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18:253-9.
166. Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res.* 2000;17:405-9.
167. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:2595–601.
168. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006; 32: 979-84.
169. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, et al. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1391-6.
170. Spikes JD, Straight RC. Biochemistry of photodynamic-action. In: Heitz JR, Downum K, editors. *Light-activated pesticides*. Washington: American Chemical Society. 1987. p. 98-108. ACS Symposium Series 339.
171. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16: 191-6.
172. Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol.* 2005;13: 3-6.

173. Tadakuma T. Possible application of the laser in immunobiology. Keio J Med. 1993; 42:180-2.
174. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50:196-203.
175. Thomas J, Walker C, Bradshaw M. Long-term use of subantimicrobial dose doxycycline does not lead to changes in antimicrobial susceptibility. J Periodontol. 2000; 71: 1472-83.
176. Tseng P, Liew V. The bactericidal effect of Nd:YAG laser: Preliminary in vitro studies. Periodontology. 1992; 13: 20-5.
177. Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. J Photochem Photobiol B. 1993; 21:103-24.
178. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg Med. 2001; 29: 165-73.
179. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. Lasers Surg Med 2003;33:311-9.
180. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. J Photochem Photobiol B. 2003; 71:87-98.
181. Van Dalen PJ, Van Deutekom-Mulder EC, de Graaff J, Van Steenberghe TJ. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes and Prevotella species in pure and mixed culture. J Med Microbiol. 1998; 47:135-40.

182. Van Der Meulen FW, Ibrahim K, Sterenborg HJ, Alphen LV, Maikoe A, Dankert J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 40: 204-8.
183. Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000*. 1996; 10: 45-78.
184. Vansteenberghe TJM, Vanwinkelhoff AJ, Degraaff J, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of black-pigmented gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993; 6 : 229-34.
185. Venezia FR, Divincenzo C, Sherman R, Reichman M, Origitano TC, Thompson K, et al. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. *J Infect Dis*. 1985; 151:166-9.
186. Vol'pin ME, Vorozhtsov GN, Kaliya OI, Lukyanets EA. Phthalocyanine metal complex in photodynamic and catalytic therapy of cancer. *J Inorg Biochem*. 1997; 67: 151.
187. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 13-28.
188. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobacterial activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997; 19:75-80.
189. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J*. 1997; 42: 247-54.
190. White JM, Goodis HE, Marchall GWJR, Marshall SJ. Identification of the physical modification threshold of dentin induced by neodymium and holmium YAG lasers using scanning electron microscopy. *Scanning Microsc*. 1993; 7: 239-46.

191. Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001; 413: 860-4.
192. Wilson BC. Light sources for photodynamic therapy. *Photodynamic Therapy News*. 1998; 1: 6-8.
193. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol*. 1993; 75: 299-306.
194. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J*. 1994; 44: 181-9.
195. Wilson M, Dobson J. Lethal Photosensitization of oral anaerobic-bacteria. *Clin Infect Dis*. 1993; 16 (Suppl. 4):S414-15.
196. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med*. 1995; 16: 272-6.
197. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser-radiation. *Curr Microbiol*. 1992; 25: 77-81.
198. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of *Streptococcus sanguis* to killing by light from a helium-neon laser. *Lasers Med Sci*. 1993; 8: 69-73.
199. Wilson M, Dobson J, Sakar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993; 8: 182-7.
200. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol*. 1995; 78: 569-74.

201. Winstedt L, Frankenberg L, Hederstedt L, Von Wachenfeldt C. *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-Type Respiratory Oxidase. J Bacteriol. 2000; 182: 3863-6.
202. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C . Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 680-4.
203. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. J Photochem Photobiol B. 1999; 50: 1-7.
204. Woods JA, Traynor NJ, Brancalion L, Moseley H. The effect of Photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study. Photochem Photobiol. 2004; 79: 105-13.
205. Wuertz S, Okabe S, Hausner M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. Water Sci Technol. 2004;49: 327-36.
206. Yamamoto M, Nagano T, Okura I, Arakane K, Urano Y, Matsumoto K. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, zinc-coproporphyrin III, with low host toxicity. Biometals 2003; 16: 591-7.
207. Yeung FIS, Newman NH, Addy M. Subgingival metronidazole in acrylic resin vs. chlorhexidine irrigation in the control of chronic periodontitis. J Periodontol. 1983; 54: 651-7.
208. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of galium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. Lasers Surg Med. 2002; 30: 60-6.

Apêndice

Apêndice 1 – Contagem de colônias dos experimentos em fase planctônica e em biofilme nos parâmetros de 30 J/cm² e 60 J/cm²

Planktonic 30 Joules/cm ²					
% of survival					
MB=12.5 µg					MB=25 µg
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+
100	87.38	110.8	67.56		47.74
100	57.83	66.01	19.41		23.71
100	62.97	91.27	0.85		52.12
100	135	154.41	11.76		27.94
100	116.26	71.1	47.82		54.41
100	91.888	98.718	29.48		41.184
Serror	14.9485	16.0244	12.2913		6.39628
Planktonic (c.f.u.)					
MB=12.5 µg					MB=25 µg
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+
22	17	13	12		14
19	23	60	11		9
23	38	25	21		12
47	19	25	31		17
27.75	24.25	30.75	18.75		13.25
100	87.38	110.8	67.56		47.74
367	87	97	36		36
102	112	201	43		60
122	99	86	31		33
130	119	92	30		42
180.25	104.25	119	35		42.75
100	57.83	66.01	19.41		23.71
263	64	192	0		64
44	114	111	2		62
110	68	68	1		73
53	50	58	1		46
117.5	74	107.25	1		61.25
100	62.97	91.27	0.85		52.12
140	52	68	15		16
54	49	54	6		42
32	316	344	13		25

114	42	59	6		12
85	114.75	131.25	10		23.75
100	135	154.41	11.76		27.94
143	89	114	98		110
69	27	198	24		126
303	317	72	136		102
198	396	123	83		50
178.25	207.25	126.75	85.25		97
100	116.26	71.1	47.82		54.41

Planktonic 60 Joules /cm ²					
MB=12.5 µg					MB=25 µg
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+
100	115.27	83.33	36.11		23.6
100	73.01	69.34	33.5		47.14
100	85.38	90.64	14.61		7.01
100	44.82	70.9	23.85		23.98
100	73.19	86.59	16.49		37.11
100	77.19	86.67	9.27		54.29
100	16.64	43.2	4.65		17.62
100	69.35714	75.81	19.78286		30.10714
Serror	11.78708	6.248825	4.494447		6.349466
MB=12.5 µg					MB=25 µg
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+
33	113	29	17		8
42	9	44	4		13
46	32	23	24		7
23	12	24	7		6
36	41.5	30	13		8.5
100	115.27	83.33	36.11		23.6
288	203	191	96		109
185	179	199	64		107
303	208	162	108		118
206	127	129	61		129
245.5	179.25	170.25	82.25		115.75
100	73.01	69.34	33.5		47.14
34	26	37	23		3
40	38	35	0		4
47	22	18	2		3

50	60	65	0		2
42.75	36.5	38.75	6.25		3
100	85.38	90.64	14.61		7.01
181	92	127	17		47
268	98	196	45		76
242	88	149	98		38
72	64	69	22		22
190.75	85.5	135.25	45.5		45.75
100	44.82	70.9	23.85		23.98
40	11	49	2		9
19	8	9	5		4
16	10	18	5		9
22	42	8	4		14
24.25	17.75	21	4		9
100	73.19	86.59	16.49		37.11
313	218	372	31		198
212	193	189	19		81
283	189	136	34		201
205	182	181	10		70
253.25	195.5	219.5	23.5		137.5
100	77.19	86.67	9.27		54.29
64	57	60	9		28
150	28	160	11		30
488	19	64	8		70
115	32	69	10		16
204.25	34	88.25	9.5		36
100	16.64	43.2	4.65		17.62

Biofilm 30 Joules/cm ²						
% survival						
MB=50 µg					MB=25 µg	
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+	L+D+
100	76.5	98.64	45.54		96.26	96.35
100	101.84	91.26	83.69		98.31	92.1
100	69.73	95	64.47		83.42	84.73
100	95.53	115.47	112.9		95.98	104.76
100	97.52	116	58.34		106.77	80.49
100	88.224	103.274	72.988		96.148	91.686
0	6.342984	5.219975	11.7218		3.738609	4.281297

u.f.c.						
MB=50 µg					MB=25 µg	
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+	L+D+
288	181	303	131		274	281
322	198	297	151		302	298
301	243	274	143		316	299
268	280	289	112		243	258
294.75	225.5	290.75	134.25		283.75	284
100	76.5	98.64	45.54		96.26	96.35
166	171	149	86		84	89
121	170	164	215		158	131
156	157	94	115		83	95
152	108	136	82		260	233
148.75	151.5	135.75	124.5		146.25	137
100	101.84	91.26	83.69		98.31	92.1
99	62	74	66		43	74
58	65	83	66		51	83
177	70	122	64		33	66
46	68	82	49		190	99
95	66.25	90.25	61.25		79.25	80.5
100	69.73	95	64.47		83.42	84.73
195	139	169	129		165	193
95	160	251	170		186	170
195	148	181	145		102	193
187	195	175	315		192	148
168	160.5	194	189.75		161.25	176
100	95.53	115.47	112.94		95.98	104.76
158	148	124	92		140	96
149	152	376	81		164	99
123	107	95	78		184	139
175	183	107	102		158	153
151.25	147.5	175.5	88.25		161.5	121.75
100	97.52	116.03	58.34		106.77	80.49

Biofilm 60 Joules/cm²						
% survival						
MB=50 µg					MB=25 µg	
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+	L+D+
100	90.2	134	77.7		102	87.39
100	84.21	71.89	42.34		94.89	82.57

100	71.13	62.05	62.64		81.84	55.5
100	66.11	70.15	55.64		72.71	60.84
100	81.84	89.31	60.89		92.91	75.15
0	5.59719	16.63126	7.362287		6.551866	7.877447
u.f.c.						
MB=50 µg					MB=25 µg	
L-D-	L-D+	L+D-	L+D+		L-D+	L+D+
84	83	192	70		109	58
85	79	90	58		105	66
88	62	96	72		54	75
84	83	80	65		81	99
85.25	76.75	114.5	66.25		87.25	74.5
100	90.02	134.31	77.71		102.34	87.39
476	149	167	128		298	176
172	338	164	93		222	178
181	229	169	135		146	338
210	159	247	84		320	166
259.75	218.75	186.75	110		246.5	214.5
100	84.21	71.89	42.34		94.89	82.57
127	125	165	78		107	105
153	104	77	86		123	104
202	130	106	132		128	88
190	119	69	125		192	76
168	119.5	104.25	105.25		137.5	93.25
100	71.13	62.64	62.64		81.84	55.5
230	171	178	142		225	153
443	189	204	204		213	203
337	245	182	152		218	190
203	197	287	177		226	192
303.25	200.5	212.75	168.75		220.5	184.5
100	66.11	70.15	55.64		72.71	60.84

Apêndice 2 – Números gerados a partir das membranas do *Checkerboard* – Análise Molecular para os experimentos em fase planctônica e em biofilme nos parâmetros de 30 J/cm² e 60 J/cm²

		A.naesslundii	S.constellata	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.aocranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.gerenceser	S.oralis	C.cochranea	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	57544	501187	14791	40738	16596	81283	17378	0	34674	89125	1230268.771	549541	301995	218776	301995	112202	63096	0
	1B	43652	79433	8128.3	19953	13804	54954	24547	0	24547	48978	758577.575	371535	42658	83176	194984	301995	33884	33884
	1C	66069	346737	10965	16982	14454	54954	30903	0	30200	69183	870963.59	707946	58884	102329	295121	181970	33884	72444
	1D	39811	213796	28840	26303	16596		22909	0	29512	45709	1047128.548	478630	46774	95499	223872	316228	27542	42658
L-D+	2A	64565	53703	5623.4	0	0	35481	16218	0	19953	27542	269153.4804	1E+06	38905	69183	524807	467735	46774	60256
	2B	48978	67608	11749	9772.4	0	114815	11220	0	25119	30200	1412537.545	691831	47863	81283	295121	100000	31623	38905
	2C	26915	70795	13183	16596	17378	81283	21878	0	32359	40738	1548816.619	97724	50119	79433	89125	524807	32359	0
	2D	28184	58884	4786.3	12023	0	50119	44668	0	13183	26915	21379.6209	95499	36308	83176	75858	562341	19498	0
L+D-	3A	39811	89125	15488	15488	14125	61660	16218	0	32359	52481	1778279.41	354813	51286	213796	190546	575440	31623	38019
	3B	39811	147911	11482	20417	17378	89125	47863	0	31623	64565	977237.221	295121	70795	363078	181970	239883	36308	34674
	3C	27542	70795	14125	16218	15849	79433	32359	0	26303	29512	616595.0019	95499	43652	154882	87096	199526	22909	29512
	3D	41687	81283	17378	23442	16982	120226	42658	0	40738	61660	1659586.907	301995	56234	245471	169824	288403	47863	51286
L+D+	4A	12589	43652	14125	32359	0	331131	20893	0	19055	89125	6456.54229	27542	22909	52481	74131	33884	28184	0
	4B	46774	75858	18621	23442	30903	162181	204174	0	45709	41687	1412537.545	223872	64565	213796	165959	776247	22909	75858
	4C	52481	52481	7413.1	13490	0	57544	34674	0	19498	26915	257039.5783	645654	38019	158489	223872	416869	33884	63096
	4D	60256	32359	3311.3	0	0	23988	0	0	14454	15136	19952.62315	1E+06	35481	70795	316228	398107	18621	87096

S.intermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyticus	F.nuc polym	C.sohawae	F.peridont	N.mucosa	F.nuc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spulgentis	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
67608	10965	21380	63096	47863	36308	85114	57544	56234	37154	524807	6456.5	58884	0	15136	91201	56234	85114	33884	28184	97724	44668
43652	0	40738	43652	37154	32359	36308	21878	47863	24547	457088	14125	36308	0	23442	85114	28184	47863	24547	89125	257040	67608
60256	0	0	53703	48978	36308	29512	24547	40738	26915	416869	9772.4	39811	0	13804	81283	45709	47863	10471	19055	457088	13804
44668	0	0	44668	38019	36308	39811	45709	42658	11482	512861	7244.4	38019	0	16596	97724	38905	40738	12589	29512	102329	13490
27542	0	0	74131	22909	22909	0	23988	26915	0	251189	5888.4	40738	0	15849	123027	40738	24547	11749	22387	0	8912.5
38019	0	0	54954	61660	14125	61660	38905	57544	26303	588844	0	63096	0	9549.9	79433	52481	32359	11482	28184	0	14125
41687	0	0	40738	48978	27542	28840	102329	45709	18197	331131	0	51286	0	19953	123027	66069	36308	8709.6	20893	0	13490
31623	0	38905	23988	39811	54954	120226	28840	39811	14454	354813	0	28184	0	16218	93325	36308	19953	0	9549.9	0	125893
50119	0	0	63096	28840	26303	158489	104713	32359	22909	97724	6456.5	58884	0	15849	79433	63096	37154	13804	22909	295121	15488
60256	9549.9	31623	43652	87096	50119	194984	75858	54954	20417	363078	9549.9	57544	0	21878	87096	52481	39811	11282	27542	288403	47863
63096	0	25704	35481	20417	43652	0	28840	43652	11749	467735	6166	52481	0	13183	79433	54954	41687	10965	24547	426580	66069
47863	13183	0	50119	89125	69183	138038	69183	53703	19498	691831	5623.4	57544	31623	19055	79433	41687	44668	26915	363078	23988	
24547	0	295121	18621	97724	12023	154882	67608	83176	25704	45709	15136	38019	0	33884	26915	25704	30903	8317.6	36308	467735	2E+06
52481	14454	31623	53703	70795	331131	229087	56234	50119	28184	380189	11220	72444	35481	17783	165959	61660	61660	17378	42658	173780	34674
39811	0	0	45709	48978	58884	33884	95499	24547	14125	416869	7585.8	44668	0	10965	89125	29512	37154	12303	16982	0	28184
22909	0	0	43652	28184	0	38019	41687	20893	14454	245471	0	34674	29512	14125	77625	13490	35481	8128.3	22909	0	23442

		A.naesslundii	S.constellata	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.aocranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.gerenceser	S.oralis	C.cochranea	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	70795	75858	43652	57544	58884	575440	0		46774	316228	1E+06	77625	57544	75858	97724	70795	45709	0
	1B	70795	69183	35481	93325	47863	489779	0		53703	288403	1E+06	83176	41687	48978	67608	74131	44668	0
	1C	93325	75858	38905	263027	51286	281838	0		54954	295121	1E+06	83176	63096	63096	70795	56234	67608	0
	1D	0	61660	43652	45709	0	389045	0		37154	354813	2E+06	93325	53703	38905	120226	70795	44668	0
L-D+	2A	77625	97724	39811	125893	53703	537032	0		67608	245471	2E+06	181970	74131	60256	125893	95499	43652	0
12.5 µg/ml	2B	77625	85114	43652	38905	0	524807	0		44668	218776	1E+06	93325	74131	66069	77625	97724	36308	0
	2C	102329	107152	46774	41687	64565	616595	0		52481	114815	1E+06	117490	93325	89125	97724	223872	52481	0
	2D	81283	102329	44668	75858	46774	407380	0		47863	436516	1E+06	81283	79433	67608	83176	91201	47863	0
L+D-	3A	85114	85114	60256	41687	51286	616595	0		46774	275423	2E+06	154882	66069	165959	91201	147911	46774	0
	3B	112202	81283	45709	46774	72444	562341	0		60256	213796	1E+06	93325	72444	61660	79433	93325	33884	0
	3C	77625	75858	32359	33884	61660	537032	0		74131	501187	1E+06	91201	66069	61660	70795	123027	35481	0
	3D	75858	93325	38019	35481	79433	588844	0		52481	436516	2E+06	208930	213796	56234	85114	83176	34674	0
L+D+	4A	169824	109648	31623	47863	0	64565	0		42658	75858	2E+06	354813	54954	91201	251189	301995	47863	0
	4B	97724	114815	33113	54954	81283	223872	0		54954	93325	1E+06	141254	70795	85114	107152	123027	33113	0
	4C	165959	208930	40738	38905	104713	338844	0		52481	95499	1E+06	245471	85114	269153	125893	181970	38905	0
	4D	162181	87096	50119	32359	70795	416869	0		48978	79433	2E+06	218776	70795	87096	95499	194984	43652	0

S.intermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyticus	F.nuc polym	C.sohawae	F.peridont	N.mucosa	F.nuc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spulgentis	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
60256	0	102329	31623	181970	25704	107152	26915	331131	36308	85114	28184	363078	0	467735	57544	29512	37154	29512	30200	380189	75858
52481	0	67608	23988	154882	19953	0	28840	251189	45709	79433	25704	251189	0	123027	60256	28184	34674	25119	34674	0	30200
60256	28184	69183	31623	93325	25704	0	28184	144544	38905	83176	21878	263027	0	162181	61660	26303	37154	22909	34674	223872	30200
48978	0	0	26915	144544	22387	109648	19055	138038	44668	69183	15849	234423	0	72444	70795	23442	35481	17378	26915	229087	21878
63096	0	0	33113	524807	21878	194984	23988	331131	44668	79433	20417	218776	0	79433	8317	31623	28978	10955	47863	0	20893
74131	0	0	25704	269153	23442	177828	25704	331131	33884	149119	15488	109648	0	52481	83176	30200	48978	19498	37154	0	0
81283	27542	0	43652	281838	25742	138038	33113	251189	70795	182009	21380	194984	0	75858	93325	31623	56234	27542	46774	0	23988
72444	0	0	28840	104713	19055	117490	25119	117490	38905	95499	18621	100000	0	70795	70795	23442	40738	21380	48978	0	18621
67608	0	0	25704	316228	33113	190546	33884	309030	45709	257040	24547	354813	0	154882	97724	32359	57544	36308	69183	223872	26915
54954	0	0	28184	116128	21878	144544	25704	223872	33113	89125	24547	177828	0	168298	75858	39811	61813	32359	63096	0	35481
56234	0	0	28184	181776	22909	134896	30200	346737	40738	70795	18621	269153	0	162181	93325	46774	66069	23988	79433	218776	33113
60256	0	0	25119	570352	29512	234423	30200	516178	39811	83176	23442	229087	109648	17828	162181	61660	77625	28184	72444	20893	54954
69183	0	0	46774	63096	19055	0	23442	41687	32359	371535	18621	117490	0	34674	257040	41687	61660	20893	81283	0	36308
69183	0	0	38905	89125	18621	228825	28184	97724	64565	89125	15488	107152	0	33113	138038	30903	52481	19498	90796	0	19953
87096	0	0	50119	338844	18197	186209	41687	275423	67608	390405	16982	81283	0	24547	194984	32359	54565	15849	74131	0	28184
51286	0	0	60609	741310	27542	281838	70795	957302	60609	177828	30903	154882	0	42658	229087	42658	64565	20893	109648	0	33884

	A.naesiundi	S.constellati	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.ginginosus	S.sanguis	A.gerenceser	S.oralis	C.cochracea	A.israelii
	1	2	3	4	5	6	7	8	19	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1A	102329	83176	50119	177828	190546	295121	269153		102329	398107	2E+06	549541	186209	213796	151356	616595	26915	112202
1B	138038	85114	66069	158489	173780	323594	229087		0	562341	1E+06	489779	173780	316228	125893	630957	35481	0
1C	97724	91201	33113	117490	77625	208930	128825		83176	281838	1E+06	467735	154882	426580	169824	537032	32359	72444
1D	83176	66069	21380	66069	0	162181	234423		0	269153	2E+06	501187	97724	239883	120226	457088	0	0
2A	123027	77625	35481	77625	0	288403	151356		0	89125	2E+06	676083	194984	354813	165959	812831	25704	93325
2B	74131	61660	21878	51286	0	131826	162181		0	69183	977237	407380	93325	194984	95499	794328	0	0
2C	93325	85114	34674	134896	0	204174	109648		0	151356	1E+06	436516	117490	269153	104713	660693	22909	0
2D	74131	69183	25119	48978	0	61660	0		0	77625	2E+06	562341	107152	173780	91201	676083	0	0
3A	91201	70795	33113	114815	0	323594	131826		0	123027	2E+06	602560	89125	218776	109648	794328	37154	97724
3B	144544	93325	33884	74131	100000	208930	147911		0	177828	1E+06	457088	128825	269153	107152	645654	0	102329
3C	83176	83176	28184	77625	0	275423	120226		0	158489	1E+06	467735	117490	346737	138038	602560	0	67608
3D	95499	75858	38905	81283	85114	199526	120226		0	91201	2E+06	524807	177828	165959	134896	831764	27542	100000
4A	0	0	18197	0	0	50119	0		0	23988	57544	0	0	0	0	46774	0	0
4B	0	19498	0	0	0	0	0		0	28184	45709	0	42658	22387	0	63096	0	0
4C	102329	66069	28184	45709	0	60256	0		0	57544	74131	0	81283	53703	83176	194984	34674	0
4D	66069	50119	25704	56234	0	79433	0		0	77625	83176	102329	102329	64565	177828	162181	26303	0

S.intermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyti	F.nuc polym	C.sahowae	F.periodonti	N.mucosa	F.nucru	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillorum	C.apuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
91201	0	79433	323594	162181	234423	371535	512861	436516	144544	758578	56234	87096	0	54954	162181	77625	616595	54954	331131	0	97724
72444	0	186209	380189	301995	269153	436516	602560	724436	316228	851138	58884	63096	0	123027	223872	794328	645654	66069	436516	0	407380
83176	0	95499	257040	138038	144544	275423	257040	316228	77625	1E+06	41687	66069	0	44668	234423	43652	467735	38019	181970	0	173780
61660	0	70795	331131	85114	316228	213796	275423	213796	46774	691831	36308	46774	0	0	151356	42658	338844	27542	134896	0	100000
93325	0	0	186209	0	131826	109648	208930	85114	43652	1E+06	35481	70795	0	0	323594	43652	446684	32359	190546	0	28840
69183	0	0	114815	47863	190546	158489	218776	151356	50119	478630	25119	57544	0	0	134896	45709	389045	27542	75858	0	47863
74131	0	0	281838	0	85114	162181	162181	69183	48978	707946	25704	48978	0	0	162181	52481	301995	38019	89125	0	0
75858	0	0	190546	0	60256	100000	169824	64565	52481	426580	25119	69183	0	0	151356	40738	288403	28840	91201	0	45709
79433	0	66069	331131	54954	181970	147911	389045	457088	245471	758578	56234	95499	0	47863	199526	281838	501187	77625	363078	0	85114
70795	0	0	239883	51286	181970	147911	138038	89125	0	588844	25704	74131	0	0	151356	44668	257040	33113	95499	0	56234
81283	0	66069	281838	63096	251189	190546	223872	97724	57544	891251	34674	85114	0	0	158489	61660	301995	39811	109648	0	81283
85114	0	0	691831	61660	83176	181970	229087	75858	48978	323594	22909	89125	0	0	234423	50119	169824	32359	74131	0	31623
14125	0	0	46774	0	0	0	53703	31623	0	22387	0	0	0	0	0	32359	0	0	0	0	0
21878	0	0	41687	0	38905	181970	77625	53703	0	50119	0	22909	0	0	33884	0	50119	0	0	0	0
41687	0	0	47863	48978	48978	138038	245471	51286	46774	33113	34674	53703	0	0	64565	37154	95499	0	56234	0	0
54954	0	0	79433	69183	75858	125893	128825	42658	0	54954	31623	58884	0	0	301995	33113	223872	30200	61660	0	33113

		A.naesundii	S.constellati	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.gingivitis	S.sanguis	A.gerenceser	S.oralis	C.cochracea	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	19	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	47863	301995	26303	309030	33884	1E+06	85114	204174	112202	436516	741310	63096	40738	66069	58884	776247	18197	46774
	1B	0	79433	16596	58884	51286	912011	0	57544	74131	97724	602560	50119	33884	47863	21380	426580	16982	21380
	1C	0	67608	8709.6	40738	0	575440	0	0	38019	74131	562341	43652	38905	36308	0	467735	20893	24547
	1D	0	63096	10715	63096	28840	588844	0	77625	41687	89125	812831	38905	41687	43652	21878	512861	23988	31623
L-D+	2A	0	58884	4570.9	30903	53703	562341	0	81283	0	77625	660693	40738	37154	45709	18621	457088	27542	20893
	2B	0	79433	16218	41687	83176	346737	54954	34674	60256	79433	1E+06	52481	67608	81283	14454	660693	17783	30903
	2C	52481	75858	9332.5	44668	28184	489779	58884	123027	60256	77625	562341	40738	48978	70795	13490	316228	39811	23442
	2D	48978	120226	15488	57544	66069	371535	0	61660	138038	301995	1E+06	81283	67608	69183	19953	724436	21380	24547
L+D-	3A	40738	70795	17378	58884	56234	660693	79433	104713	63096	190546	676083	46774	37154	52481	21878	407380	24547	48978
	3B	0	56234	14454	38019	28184	660693	0	53703	83176	91201	562341	39811	33884	47863	14125	338844	22387	30903
	3C	0	57544	19498	43652	31623	776247	0	81283	42658	97724	575440	32359	35481	48978	12589	371535	16982	22909
	3D	0	66069	35481	87096	87096	630957	83176	67608	60256	141254	660693	54954	33113	38019	12882	281838	42658	45709
L+D+	4A	0	48978	22909	20893	32359	104713	0	177828	0	37154	11220	45709	25119	52481	13490	549541	31623	0
	4B	0	199526	38019	37154	33884	91201	0	181970	53703	91201	407380	52481	45709	58884	25119	741310	22909	21380
	4C	0	72444	23988	16596	0	74131	0	61660	0	63096	457088	67608	44668	42658	12882	467735	16982	23442
	4D	0	87096	38019	23442	114815	64565	0	151356	0	74131	794328	36308	63096	75858	16218	758578	17783	0
L-D+	5A	0	91201	29512	36308	38905	501187	81283	177828	0	125893	1E+06	66069	54954	60256	16218	741310	17783	36308
	5B	0	93325	35481	53703	60256	602560	0	64565	37154	245471	741310	44668	41687	44668	15136	562341	26303	19498
	5C	0	75858	29512	32359	257040	457088	54954	72444	54954	91201	831764	63096	39811	58884	14791	478630	38905	19953
	5D	0	75858	26915	40738	70795	436516	89125	66069	58884	93325	912011	70795	43652	83176	18197	758578	25119	22909

S.intermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyti	F.nuc polym	C.slowae	F.periodont	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivitis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
54954	20893	0	257040	257040	18197	60256	169824	1E+06	131826	1E+06	0	602560	181970	165959	501187	97724	218776	1E+06	186209	676083	245471
32359	0	0	23442	87096	0	50119	70795	407380	75858	123027	0	46774	0	38019	208930	31623	44668	39811	61660	213796	165959
40738	0	79433	24547	64565	0	37154	38019	181970	61660	72444	0	38905	0	19498	147911	23442	35481	19055	36308	0	35481
48978	0	66069	30903	69183	0	38019	44668	281838	66069	74131	0	51286	0	18197	199526	25119	21380	15849	41687	0	67608
60256	0	0	0	138038	0	48978	31623	275423	45709	91201	0	56234	0	15136	234423	25704	30903	22387	45709	346737	20417
48978	0	0	28184	54954	0	30903	36308	97724	109648	173780	0	72444	0	25704	363078	25119	38019	23442	52481	0	32359
48978	0	0	0	79433	0	35481	34674	138038	51286	77625	0	42658	0	18197	213796	0	26303	32359	38905	0	47863
58884	0	0	30903	67608	0	37154	36308	102329	75858	275423	0	89125	0	24547	446684	31623	42658	21878	42658	0	27542
48978	0	0	0	371535	12882	91201	46774	398107	52481	245471	0	60256	0	18621	275423	28184	33884	23442	72444	223872	63096
33884	0	47863	0	245471	0	69183	43652	346737	53703	81283	0	75858	0	26915	269153	33884	37154	18197	51286	213796	63096
39811	0	0	22909	331131	11220	79433	45709	407380	64565	301995	0	70795	177828	28184	407380	32359	46774	17783	75858	239883	117490
25704	0	0	0	199526	0	70795	50119	380189	42658	64565	0	74131	263027	32359	331131	50119	56234	36308	60256	323594	97724
26915	0	0	0	30903	0	19953	0	46774	0	186209	0	45709	0	0	354813	0	25704	13490	20417	0	0
87096	0	0	0	31623	0	30903	26915	33884	54954	257040	0	46774	0	16596	446684	33884	30200	15136	33113	0	20893
40738	0	67608	0	22909	25119	19498	16596	34674	42658	61660	0	39811	0	0	269153	32359	21878	10233	22387	0	54954
44668	0	0	0	18621	11749	0	18197	34674	72444	588844	0	40738	0	15488	478630	54954	37154	11220	26303	0	15488
58884	0	0	0	147911	20417	61660	38905	389045	44668	371535	0	87096	0	32359	524807	79433	61660	21380	109648	0	33113
75858	0	0	0	107152	12303	61660	41687	354813	38905	91201	0	61660	0	26915	398107	54954	36308	17378	63096	0	46774
50119	0	0	0	89125	15488	60256	45709	223872	48978	91201	0	69183	138038	26915	323594	64565	38019	25119	50119	0	38905
40738	0	0	37154	87096	10715	66069	38905	263027	46774	616595	0	74131	0	37154	512861	69183	53703	17378	52481	0	38905

		A.naestlundii	S.constellata	E.odontum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vican	C.rectus	T.socranskii	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.ginginosus	S.aangus	A.gerenceser	S.orais	C.cochranei	A.israelii	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
L-D-	1A	33884	15488	16218	6918.3	0	16596	0			0	57544	1584893.192	478630	537032	85114	234423	426580	58884	0
	1B	47863	34674	2290.9	0	0	22387	0			0	83176	371535.2291	398107	234423	58884	323594	245471	34674	0
	1C	38905	16982	7244.4	5248.1	0	20417	0			0	138038	1000000	204174	346737	29512	120226	295121	28184	81283
	1D	58884	17378	7244.4	6309.6	0	23988	0			0	141254	457088.1896	549541	630957	33884	199526	457088	25119	0
L-D+ 12.5 µg/ml	2A	26915	12303	12023	0	0	10471	0			0	138038	138038.4265	186209	104713	29512	144544	158489	0	0
	2B	28184	21380	20893	12882	0	12589	0			0	100000	61659.50019	70795	186209	36308	91201	316228	19953	0
	2C	0	22387	2754.2	0	0	0	0			0	66069	35481.33892	0	100000	33113	407380	102329	0	0
	2D	0	21878	10233	0	0	16596	0			0	104713	281838.2931	0	95499	36308	0	138038	34674	0
L+D-	3A	41687	21878	6166	5495.4	0	0	0			0	100000	269153.4804	128825	36308	69183	208930	309030	0	85114
	3B	38019	40738	4786.3	0	0	14125	0			0	102329	537031.7964	117490	173780	69183	229087	416869	0	87096
	3C	38905	24547	20893	10965	0	15136	0			0	134896	524807.4602	169824	257040	39811	114815	218776	35481	0
	3D	28184	15488	11749	0	0	10965	0			0	93325	371535.2291	91201	89125	39811	138038	97724	0	0
L+D+ 12.5 µg/ml	4A	79433	14125	36308	27542	0	56234	0			0	194984	1096478.196	724436	478630	28840	309030	229087	0	83176
	4B	32359	16218	8912.5	0	0	0	0			0	123027	51286.1384	0	144544	47863	0	112202	0	0
	4C	13804	18197	0	0	0	31623	0			0	75858	363078.0548	0	69183	42658	0	181970	0	0
	4D	28840	21380	0	8912.5	0	0	0			0	131826	933254.3008	120226	588844	53703	144544	301995	41687	0
L-D+ 25 µg/ml	5A	22909	34674	0	4786.3	0	17378	0			0	58884	354813.3892	173780	114815	72444	147911	257040	0	0
	5B	39811	57544	30200	27542	0	31623	0			0	234423	891250.9381	83176	660693	56234	147911	239883	0	0
	5C	46774	14791	17378	24547	0	0	0			0	102329	977237.221	295121	512861	50119	125893	1E+06	117490	0
	5D	48978	91201	0	0	0	0	0			0	162181	229086.7653	128825	489779	54954	123027	165959	0	0

Sintermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyti	F.nucopolym	C.slowae	F.periodont	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivitis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
81283	151356	75858	346737	123027	46774	301995	134896	128825	107152	812831	8317.6	64565	0	37154	177828	0	1E+06	15136	20893	0	0
87096	0	0	54954	199526	6166	0	131826	251189	93325	61660	10471	32359	0	0	630957	27542	79433	0	151356	812831	0
48978	0	0	50119	380189	10715	323594	117490	162181	75858	63096	28184	67608	0	39811	281838	24547	436516	0	173780	70795	40738
95499	0	0	35481	154882	13490	0	199526	112202	109648	158489	0	33884	0	56234	426580	0	1E+06	35481	0	0	0
53703	0	0	30903	234423	0	0	165959	0	107152	199526	30200	56234	0	0	398107	32359	380189	16982	251189	54954	81283
52481	0	0	25704	0	15136	0	54954	109648	251189	398107	0	38019	0	75858	389045	0	1E+06	48978	114815	72444	100000
40738	0	0	22387	112202	0	0	89125	0	44668	57544	0	33884	0	0	331131	43652	251189	35481	190546	0	81283
61660	0	0	32359	151356	0	0	100000	112202	120226	74131	0	47863	0	0	331131	37154	478630	14791	257040	0	114815
75858	0	0	16982	0	0	0	89125	0	32359	61660	0	83176	0	75858	2E+06	38905	0	0	354813	1E+06	77625
123027	0	0	48978	0	7943.3	0	446684	114815	81283	154882	0	67608	0	93325	2E+06	190546	74131	0	208930	2E+06	97724
42658	0	0	13804	0	7413.1	0	46774	114815	177828	199526	0	50119	69183	208930	257040	0	1E+06	26915	114815	70795	46774
33113	0	0	35481	0	7413.1	0	50119	0	72444	30200	18197	134896	0	281838	933254	28840	1E+06	60256	151356	2E+06	93325
41687	0	0	281838	109648	7079.5	0	33884	102329	281838	371535	22387	83176	72444	177828	309030	22909	1E+06	26303	112202	0	75858
29512	0	0	16982	0	0	0	50119	114815	131826	154882	9120.1	58884	0	75858	380189	22387	707946	0	112202	53703	117490
37154	0	0	48978	0	0	0	63096	138038	77625	53703	21878	28184	0	0	512861	34674	125893	0	158489	48978	0
45709	0	0	26303	93325	7413.1	0	223872	117490	186209	354813	0	81283	0	213796	229087	28184	1E+06	44668	162181	58884	128825
100000	0	0	38019	0	0	0	295121	177828	38019	69183	0	25119	0	0	549541	25704	0	0	125893	0	36552
114815	0	0	42658	125893	0	0	137780	100000	102329	75858	11749	43652	0	0	371535	41687	0	0	0	0	41687
54954	0	0	13804	0	15849	0	131826	0	48978	21796	0	42658	0	83176	239883	0	97724	0	29512	0	0
181970	0	0	25119	0	0	0	281838	125893	56234	77625	10000	16596	0	0	426580	26303	0	0	186209	0	0

		A.naeslundii	S.constellatus	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.gerences	S.oralis	C.ochracea	A.israeli
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	33884	15488	16218	6918.3	0	16596	0		0	57544	2E+06	478630	537032	85114	234423	426580	58884	0
	1B	47863	34674	2290.9	0	0	22387	0		0	83176	371535	398107	234423	58884	323594	245471	34674	0
	1C	38905	16982	7244.4	5248.1	0	20417	0		0	138038	1E+06	204174	346737	29512	120226	295121	28184	81283
	1D	58884	17378	7244.4	6309.6	0	23988	0		0	141254	457088	549541	630957	33884	199526	457088	25119	0
L-D+ 12.5 µg/ml	2A	26915	12303	12023	0	0	10471	0		0	138038	138038	186209	104713	29512	144544	158489	0	0
	2B	28184	21380	20893	12882	0	12589	0		0	100000	61660	70795	186209	36308	91201	316228	19953	0
	2C	0	22387	2754.2	0	0	0	0		0	66069	35481	0	100000	33113	407380	102329	0	0
	2D	0	21878	10233	0	0	16596	0		0	104713	281838	0	95499	36308	0	138038	34674	0
L+D-	3A	41687	21878	6166	5495.4	0	0	0		0	100000	269153	128825	36308	69183	208930	309030	0	85114
	3B	38019	40738	4786.3	0	0	14125	0		0	102329	537032	117490	173780	69183	229087	416869	0	87096
	3C	38905	24547	20893	10965	0	15136	0		66069	134896	524807	169824	257040	39811	114815	218776	35481	0
	3D	28184	15488	11749	0	0	10965	0		0	93325	371535	91201	89125	39811	138038	97724	0	0
L+D+ 12.5 µg/ml	4A	79433	14125	36308	27542	0	56234	0		79433	194984	1E+06	724436	478630	28840	309030	229087	0	83176
	4B	32359	16218	8912.5	0	0	0	0		0	123027	51286	0	144544	47863	0	112202	0	0
	4C	13804	18197	0	0	0	31623	32359		67608	75858	363078	0	69183	42658	0	181970	0	0
	4D	28840	21380	0	8912.5	0	0	0		75858	131826	933254	120226	588844	53703	144544	301995	41687	0
L-D+ 25 µg/ml	5A	22909	34674	0	4786.3	0	17378	0		69183	58884	354813	173780	114815	72444	147911	257040	0	0
	5B	39811	57544	30200	27542	26303	31623	0		0	234423	891251	83176	660693	56234	147911	239883	0	0
	5C	46774	14791	17378	24547	0	0	0		0	102329	977237	295121	512861	50119	125893	1E+06	117490	0
	5D	48978	91201	0	0	0	0	0		0	162181	229087	128825	489779	54954	123027	165959	0	0

S	T	P	A	F	C	F	C	G	S	T	S	P	P	P	E	E	G	C	P	P		
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
81283	151356	75858	346737	123027	46774	301995	134896	128825	107152	812831	8317.6	64565	0	37154	177828	0	1023292	992	15136	20893	0	0
87096	0	0	54954	199526	6166	0	131826	251189	93325	61660	10471	32359	0	0	630957	27542	79432	82347	0	151356	812831	0
48978	0	0	50119	380189	10715	323594	117490	162181	75858	63096	28184	67608	0	39811	281838	24547	436515	8322	0	173780	70795	40738
95499	0	0	35481	154882	13490	0	199526	112202	109648	158489	0	33884	0	56234	426580	0	1174897	555	35481	0	0	0
53703	0	0	30903	234423	0	0	165959	0	107152	199526	30200	56234	0	0	398107	32359	380189	3963	16982	251189	54954	81283
52481	0	0	25704	0	15136	0	54954	109648	251189	398107	0	38019	0	75858	389045	0	1479108	388	48978	114815	72444	100000
40738	0	0	22387	112202	0	0	89125	0	44668	57544	0	33884	0	0	331131	43652	251188	6432	35481	190546	0	81283
61660	0	0	32359	151356	0	0	100000	112202	120226	74131	0	47863	0	0	331131	37154	478630	0.923	14791	257040	0	114815
75858	0	0	16982	0	0	0	89125	0	32359	61660	0	83176	0	75858	2E+06	38905	0	0	354813	1E+06	77625	0
123027	0	0	48978	0	7943.3	0	446684	114815	81283	154882	0	67608	0	93325	2E+06	190546	74131	0.2413	0	208930	2E+06	97724
42658	0	0	13804	0	7413.1	0	46774	114815	177828	199526	0	50119	69183	208930	257040	0	1096478	196	26915	114815	70795	46774
33113	0	0	35481	0	7413.1	0	50119	0	72444	30200	18197	134896	0	281838	933254	28840	1479108	388	60256	151356	2E+06	93325
41687	0	0	281838	109648	7079.5	0	33884	102329	281838	371535	22387	83176	72444	177828	309030	22909	1000000	26303	112202	0	75858	
29512	0	0	16982	0	0	0	50119	114815	131826	154882	9120.1	58884	0	75858	380189	22387	707945	7844	0	112202	53703	117490
37154	0	0	48978	0	0	0	63096	138038	77625	53703	21878	28184	0	0	512861	34674	125892	5412	0	158489	48978	0
45709	0	0	26303	93325	7413.1	0	223872	117490	186209	354813	0	81283	0	213796	229087	28184	1000000	44668	162181	58884	128825	0
100000	0	0	38019	0	0	0	295121	177828	38019	69183	0	25119	0	0	549541	25704	0	0	125893	0	43652	0
114815	0	0	42658	125893	0	0	173780	100000	102329	75858	11749	43652	0	0	371535	41687	0	0	0	0	41687	0
54954	0	0	13804	0	15849	0	131826	0	48978	213796	0	42658	0	83176	239883	0	97723	7221	0	29512	0	0
181970	0	0	25119	0	0	0	281838	125893	56234	77625	10000	16596	0	0	426580	26303	0	0	186209	0	0	0

		A.naeslundii	S.constellatus	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.genesidii	S.oralis	C.ochracea	A.israeli
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	229086.8	707945.8	53703.18	112201.8	51286.14	489778.8	43651.58	213796.2	27542.29	602559.6	2041738	389045.1	1202264	851138	323593.7	891250.9	93325.43	186208.7
	1B	177827.9	478630.1	51286.14	57543.99	66069.34	120226.4	38018.94	0	39810.72	77624.71	1995262	194984.5	812830.5	630957.3	524807.5	741310.2	54954.09	125892.5
	1C	107151.9	295120.9	28183.83	28183.83	43651.58	74131.02	0	0	27542.29	42657.95	1778279	199526.2	660693.4	281838.3	436515.8	676083	35481.34	97723.72
	1D	114815.4	223872.1	25703.96	24547.09	45708.82	67608.3	0	0	19952.62	33113.11	1148154	275422.9	707945.8	323593.7	323593.7	831763.8	56234.13	97723.72
L-D+ 12.5 µg/ml	2A	54954.09	93325.43	10232.93	0	25703.96	42657.95	0	0	17378.01	28840.32	1445440	165958.7	537031.8	93325.43	263026.8	851138	39810.72	64565.42
	2B	46773.51	75857.76	12882.5	0	22387.21	37153.52	0	0	15135.61	27542.29	1380384	95499.26	549540.9	93325.43	194984.5	741310.2	25118.86	47863.01
	2C	43651.58	102329.3	14454.4	17378.01	20417.38	45708.82	0	0	18620.87	27542.29	1258925	151356.1	630957.3	95499.26	251188.6	501187.2	30902.95	75857.76
	2D	47863.01	316227.8	13489.63	0	26302.68	40738.03	0	0	20892.96	38904.51	1698244	173780.1	870963.6	169824.4	204173.8	1122018	31622.78	56234.13
L+D-	3A	69183.1	257039.6	23442.29	35481.34	43651.58	213796.2	0	0	34673.69	77624.71	2041738	229086.8	891250.9	776247.1	223872.1	1023293	36307.81	81283.05
	3B	69183.1	346736.9	23442.29	35481.34	42657.95	79432.82	0	0	23988.33	85113.8	1513561	301995.2	933254.3	794328.2	239883.3	776247.1	25118.86	91201.08
	3C	74131.02	371535.2	22387.21	36307.81	46773.51	162181	0	0	30199.52	93325.43	1737801	223872.1	831763.8	630957.3	154881.7	977237.2	35481.34	89125.09
	3D	83176.38	602559.6	26302.68	43651.58	48977.88	131825.7	29512.09	0	28840.32	85113.8	2398833	229086.8	1258925	851138	199526.2	1258925	47863.01	83176.38
L+D+ 12.5 µg/ml	4A	144544	1174898	33113.11	43651.58	53703.18	74131.02	35481.34	0	32359.37	64565.42	1905461	239883.3	1659587	549540.9	263026.8	1445440	46773.51	83176.38
	4B	141253.8	109647.8	25118.86	61659.5	52480.75	81283.05	30199.52	0	33113.11	61659.5	2137962	288403.2	77623.72	229086.8	269153.5	1235699	36810.72	91201.08
	4C	186208.7	61659.5	22387.21	30490.95	26915.35	72443.6	0	0	14791.08	44668.36	1202264	288403.2	61659.5	63095.73	199526.2	537031.8	25703.96	93325.43
	4D	97723.72	398107.2	23113.11	62904.75	53703.18	275422.9	35481.34	0	23988.33	4266.18	912010.8	131825.7	537031.8	1174898	213796.2	1479108	30902.95	79432.82
L-D+ 25 µg/ml	5A	93325.43	794328.2	27542.29	39810.72	36307.81	60255.96	28183.83	0	25118.86	60255.96	2041738	263026.8	1548817	281838.3	173780.1	75857.76	47863.01	81283.05
	5B	289165.3	24547.09	31622.78	43651.58	57543.99	0	0	194984.5	40738.03	2089296	154881.7	588847.1	93325.43	162181	1047129	275422.9	74131.02	54954.09
	5C	173780.1	575439.9	29512.09	47773.51	48977.88	77624.71	0	0	26302.68	12589.25	223872.1	21776.82	851138	32354.33	190546.1	95499.26	60255.96	91201.08
	5D	56234.13	33113.11	15488.17	16772.79	19952.62	38018.94	0	0	0	36307.81	72443.6	204173.8	891250.9	93325.43	10226.4	831763.8	61209.56	50118.72

[illegible]

		A naslediti		Sostavljati		Enodnost		F-igrala		A a		F-ic viden		Cretus		7 socranski		Esaburum		P mirones		10 Varvalla		Avisous		12		13		14		15		16		17		18				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18																							
L-D-	1A	123026	147910	57543	99	194984	5	56234	13	457088	2	75857	76	232872	1	42657	95	146869	4	1202264	162181	77624	75113	82138	223872	1	912018	8	70794	58	70794	58										
	1B	95499	26	147910	44668	36	60255	96	56234	13	281838	1	47863	01	36307	81	42657	95	95499	26	1905461	158489	93325	43	120226	4	141253	8	89763	6	48977	8	64565									
	1C	44668	97723	72	211818	86	105194	34673	69	173780	1	21379	62	0	44668	36	16069	34	162180	138038	94	93242	8	95499	26	85113	8	879263	3	61659	5	57543	99									
	1D	812635	147910	40738	03	46773	51	58884	37	229687	8	29512	09	37153	52	54954	09	4655	42	223872	31131	1	74761	01	147908	1	216776	2	100000	4	7683	01	69183	1								
L-D+ 12.5 µg/ml	2A	51286	14	87096	36	125417	26587	34983	69	89125	09	75857	19054	61	24547	09	29512	09	85113	234422	77624	71	67068	1	74131	02	831763	22	23817	29	39810	72										
	2B	812835	104712	9	22977	36737	69	47863	01	74131	02	18620	87	107151	9	34673	69	34810	13	778279	602559	8	9126	38	75857	76	218776	2	891250	9	26183	83	57303	18								
	2C	60693	34	223872	1	211818	86	33978	3	30199	52	102329	3	12882	5	0	16186	94	37172	158489	524807	5	8126	08	93325	43	77827	9	891250	9	26183	83	57303	18								
	2D	75857	6	173780	1	19054	61	29512	09	33884	42	812635	12589	25	43651	58	42657	95	52480	75	213796	724436	134896	3	120226	4	323593	7	1148154	57857	76	72443	6									
L-D+	3A	162181	295120	9	47863	01	44668	36	60255	96	48977	8	64565	42	263026	8	50118	72	82403	2	398833	4	48977	8	114815	4	169824	4	380189	4	120269	60693	4	812635	05							
	3B	912018	281838	3	79631	1	54954	09	79432	82	257039	6	34673	69	0	50118	72	8126	08	169824	4	48977	8	7723	72	144544	5	13565	1	732617	2	34673	69	85113	8							
	3C	93325	43	223872	1	211818	86	48977	8	144544	5	33113	11	38004	51	46565	42	100000	2	398833	602559	234422	9	194894	5	34673	69	104712	9	891250	9	26183	83	57303	18							
	3D	251186	281838	3	46773	51	45708	82	54954	09	181970	1	45708	82	0	60693	34	100000	2	398833	602559	234422	9	251186	4	46773	51	1148154	57857	76	891250	9	26183	83	57303	18						
L-D+ 12.5 µg/ml	4A	34673	69	63095	73	8519	20183	683	27542	29	57543	99	0	117489	19054	61	40738	03	56234	13	158489	9	3121	08	58884	37	70945	8	93325	43	45708	82	27542	29								
	4B	244229	56234	13	19419	59	11481	54	0	2840	32	0	0	0	0	42657	95	28183	13	134896	60255	96	46773	51	60693	4	380189	4	42657	95	234422	9										
	4C	186208	60255	96	38904	51	15488	17	11481	54	48977	8	0	912018	8	18620	87	4738	03	58843	7	109647	58884	37	60255	96	501187	2	57038	18	63095	73	20473	18								
	4D	275429	57543	99	26195	33	24547	09	0	46773	51	0	74131	02	16218	1	40738	03	59810	72	1479108	9	16813	3	12026	4	837018	5	218763	2	837018	5	218763	2								
L-D+ 25 µg/ml	5A	123026	99	380189	4	26915	33	33884	42	58884	37	154891	7	16595	82	44668	36	28840	32	6758	03	93325	43	912018	8	288403	1	174489	8	288403	1	75857	76	93325	43	87096	36					
	5B	93325	43	79432	82	19499	42	20892	96	114815	4	30199	52	10262	4	61659	5	40738	03	10169	5	64565	42	831763	22	128295	49	323593	7	95497	7	309029	5	93325	43							
	5C	97723	72	158489	3	23988	13	51286	14	45708	82	125892	5	15418	93	123026	9	44668	36	31253	52	280296	69	81931	186208	239883	3	257039	6	100000	70794	58	85113	8								
	5D	79432	82	48977	8	29159	57543	99	46773	51	114815	4	3113	11	54954	09	44668	36	40738	03	60255	96	2041738	60693	4	741310	2	218763	2	45708	82	1202264	57857	76	7624	17						

S.intemedus	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyci	F.nuc polym	C.shovae	F.periodontici	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivalis	S.gordoni	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitorum	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
57543.99	21877.62	69183.1	50118.72	120226.4	44668.36	446683.6	229068.6	457088.2	66069.34	151566.1	34673.69	38018.94	54954.09	758577.6	831763.8	57543.99	93325.43	39810.72	91201.08	1023260	524807.5
56234.13	20417.36	61659.5	46773.51	51286.14	29512.09	93325.43	138038.4	87096.36	28183.83	120226.4	12882.6	75957.76	45708.82	53703.18	602559.6	53703.18	60255.96	19952.62	46773.51	426579.5	06099.34
56234.13	14454.4	50118.72	43651.58	40738.03	27542.29	70794.58	57543.99	70794.58	26915.35	89125.09	8317.638	63095.73	42657.96	52480.75	616595	31622.78	60255.96	18620.87	46773.51	30195.2	41686.94
46565.42	20892.96	44668.36	53703.18	47863.01	26915.35	77624.71	77624.71	77624.71	34673.69	79432.82	8912.509	85113.8	64565.42	54954.09	724436	41686.94	57543.99	23988.33	44668.36	316227.8	26915.35
60255.96	0	30199.62	30902.95	13182.57	22387.21	28840.32	38904.51	32359.37	18197.01	60255.96	5495.409	24547.09	0	21379.62	371535.2	29512.09	37153.52	0	20417.36	251188.6	10715.19
57543.99	0	21379.62	53703.18	14125.6	19054.61	38904.51	47863.01	28183.83	25118.86	77624.71	5623.413	46773.51	44668.36	0	524807.5	33113.11	45708.82	10000	22908.68	81283.05	13182.57
63095.73	0	32359.37	48977.88	16218.1	13489.63	52480.75	39810.72	32359.37	18620.87	93325.43	7079.458	53703.18	0	19952.62	776247.1	35481.34	58884.37	14125.38	43651.58	36307.81	15848.93
69183.1	16982.44	30902.95	56234.13	19498.45	13803.84	41686.94	50118.72	40738.03	25118.86	95499.26	6309.573	46773.51	0	20892.96	724436	39810.72	48977.88	21379.62	32359.37	38018.94	12022.64
74131.02	30199.62	75857.76	70794.58	74131.02	54954.09	83176.38	79432.82	301995.2	41686.94	363078.1	19498.45	79432.82	43651.58	58884.37	812830.5	75857.76	66069.34	22908.68	57543.99	144540	40738.03
74131.02	23442.29	56234.13	67608.3	54954.09	41686.94	91201.08	74131.02	87096.36	48977.88	363078.1	16982.44	77624.71	41686.94	57543.99	851138	61659.5	74131.02	25118.86	56234.13	69183.1	35481.34
91201.08	22387.21	67608.3	58884.37	56234.13	50118.72	91201.08	85113.8	83176.38	36307.81	301995.2	19952.62	83176.38	48977.88	63095.73	1000000	67608.3	69183.1	28840.32	64565.42	1096478	37153.52
74131.02	30199.62	87096.36	69183.1	58884.37	44668.36	87096.36	123026.9	87096.36	34673.69	338944.2	17782.79	74131.02	54954.09	93325.43	977237.2	70794.58	74131.02	25118.86	60255.96	1023293	64565.42
48977.88	0	15848.93	234422.9	12022.64	11481.54	47863.01	54954.09	23442.29	15848.93	72443.6	7943.282	29512.09	0	22387.21	426579.5	30902.95	38018.94	12302.69	28183.83	0	13182.57
38018.94	0	14761.08	61659.5	0	0	0	27542.29	27542.29	0	45708.82	0	0	0	0	0	0	83176.38	15488.17	23442.29	14454.4	21379.62
41686.94	0	19952.62	91201.08	7079.458	0	30902.95	35481.34	17378.01	27542.29	45708.82	0	0	0	0	0	18620.87	23988.33	26302.68	12302.69	21877.62	0
52480.75	0	21379.62	97723.72	7244.36	0	30199.62	29512.09	20892.96	12882.5	57543.99	0	0	0	0	0	524807.5	14454.4	33884.42	13803.84	20417.36	0
87096.36	0	30902.95	54954.09	11481.54	15848.93	1096478	63095.73	72443.6	57543.99	218776.2	10964.78	37153.52	41686.94	22387.21	794328.2	42657.95	58884.37	25703.96	43651.58	41686.94	13803.84
75857.76	17378.01	25703.96	67608.3	19952.62	11481.54	524807.5	123026.9	30902.95	39810.72	95499.26	9549.926	33884.42	0	14454.4	588843.7	32359.37	27542.29	54954.09	43651.58	20417.36	0
93325.43	21877.62	38018.94	63095.73	20892.96	20892.96	37153.52	56234.13	38018.94	30199.62	21877.62	12302.68	66069.34	52480.75	23988.33	1023293	45708.82	74131.02	18197.01	53703.18	69183.1	23988.33
363078.1	18197.01	22908.68	70794.58	28183.83	27542.29	45708.82	74131.02	41686.94	43651.58	33113.11	9549.926	57543.99	0	20892.96	1023293	48977.88	61659.5	23442.29	54954.09	407380.3	23988.33

		A.naeslundii	S.constellati	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.gingivitis	S.sanguis	A.gerenseri	S.oralis	C.ochracea	A.israeli
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	85114	186209	64565	72444	213796	123027	0	0	128825	707946	1E+06	190546	72444	257040	263027	251189	22387	0
	1B	74131	91201	38019	47863	131826	102329	0	0	81283	562341	1E+06	114815	51286	229087	131826	181970	20417	0
	1C	75858	190546	48978	72444	95499	154882	0	0	107152	645654	1E+06	177828	75858	371535	154882	316228	25704	0
	1D	75858	251189	51286	48978	109648	154882	0	0	79433	707946	2E+06	208930	72444	354813	204174	295121	30200	0
L-D+	2A	67608	120226	57544	54954	109648	194984	0	0	91201	776247	2E+06	165959	66069	416869	229087	309030	30903	0
	2B	70795	112202	48978	47863	83176	154882	0	0	75858	549541	1E+06	114815	69183	331131	162181	301995	22909	0
	2C	57544	93325	46774	38905	91201	169824	0	0	67608	457088	977237	104713	56234	398107	169824	245471	27542	0
	2D	75858	177828	63096	47863	107152	165959	0	0	85114	741310	2E+06	154882	83176	398107	173780	309030	22909	0
L+D-	3A	89125	251189	60256	64565	114815	199526	0	0	114815	812831	2E+06	154882	91201	478630	194984	331131	30200	0
	3B	67608	147911	47863	47863	77625	169824	0	0	75858	537032	630957	95499	72444	234423	162181	194984	23442	0
	3C	75858	194984	42658	52481	75858	186209	0	0	74131	501187	645654	125893	70795	239883	151356	239883	22909	0
	3D	81283	229087	48978	40738	91201	128825	0	0	102329	812831	2E+06	138038	89125	457088	245471	301995	30903	0
L+D+	4A	109648	346737	70795	83176	128825	234423	0	0	125893	812831	2E+06	169824	109648	389045	288403	269153	37154	0
	4B	64565	109648	44668	58884	72444	213796	0	0	67608	380189	758578	107152	60256	251189	181970	204174	23442	0
	4C	70795	134896	53703	120226	89125	218776	0	0	97724	478630	851138	125893	74131	263027	234423	281838	31623	0
	4D	85114	218776	60256	64565	131826	354813	0	0	117490	776247	2E+06	173780	144544	346737	245471	416869	57544	0

S.intemedus	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyci	F.nuc polym	C.shovae	F.periodontici	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivalis	S.gordoni	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitorum	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
117490	30200	69183	53703	138038	33113	147911	102329	112202	45709	660693	23442	0	0	58884	234423	33113	89125	18197	95499	0	114815
79433	28184	87096	50119	107152	30903	102329	79433	109648	36308	645654	32359	0	0	45709	177828	22909	58884	14791	64565	0	141254
190546	33113	75858	50119	204174	41687	131826	102329	162181	33884	933254	29512	0	0	46774	275423	33113	64565	16982	89125	0	114815
144544	37154	91201	85114	169824	39811	134896	100000	162181	67608	1E+06	27542	0	0	47863	257040	33113	75858	19953	67608	0	87096
162181	34674	81283	52481	239883	38019	134896	102329	208930	43652	954993	25704	0	0	46774	338844	30200	72444	19953	64565	0	93325
144544	26915	70795	46774	186209	38905	109648	120226	138038	30200	776247	19498	0	0	46774	281838	23442	67608	17378	58884	0	79433
97724	29512	52481	48978	147911	30200	114815	75858	147911	38905	537032	22909	0	0	48978	204174	21878	67608	16218	53703	0	91201
177828	29512	60256	51286	239883	37154	117490	81283	141254	40738	794328	22909	0	0	39811	301995	21380	87096	17378	58884	0	75858
120226	23988	79433	57544	199526	44668	144544	114815	169824	58884	1E+06	34674	0	0	81283	398107	33113	83176	21878	79433	0	144544
79433	34674	70795	39811	112202	33113	0	83176	85114	46774	524807	22387	0	0	64565	223872	19953	75858	16218	61660	0	125893
85114	33113	69183	36308	141254	26915	0	81283	154882	42658	562341	32359	0	0	74131	173780	21380	64565	15488	70795	0	123027
181970	33113	125893	64565	147911	45709	158489	102329	128825	57544	912011	35481	0	0	77625	331131	26915	81283	19953	74131	0	131826
134896	38905	102329	66069	107152	24547	158489	95499	128825	48978	91251	36308	0	0	109648	251189	41687	91201	21818	87166	0	169824
70795	39623	61660	43652	190546	58489	151356	57544	93325	31623	562341	19498	0	0	69183	183780	22387	57544	15848	72444	0	104713
75858	37154	9433	36308	165959	43652	120226	66069	91201	38905	741310	35704	0	0	74131	229087	23988	64565	19498	63096	0	102329
169824	79433	75858	72444	436516	40738	19498	112022	354813	141254	1E+06	33113	0	0	124202	2950121	56234	93325	23950	138038	0	77625

S.intermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyti	F.nuc polym	C.slowae	F.periodont	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
354813	0	0	0	47863	0	0	181970	45709	0	213796	0	89125	0	47863	27542	0	51286	43652	26915	0	57544
275423	0	0	0	0	0	0	112202	27542	0	83176	0	52481	0	44668	29512	0	0	28184	0	0	60256
165959	0	0	0	0	0	0	83176	27542	0	70795	0	60256	0	0	31623	23442	0	22387	0	0	33113
128825	0	0	0	0	0	0	120226	28840	0	85114	0	70795	0	0	27542	0	0	23442	0	0	33113
213796	0	0	0	38905	0	134896	114815	34674	0	70795	0	61660	0	0	0	0	0	20893	0	0	33884
218776	0	147911	0	40738	0	0	104713	36308	0	72444	0	58884	0	0	23442	0	34674	19498	0	0	47863
234423	158489	0	0	44668	0	0	93325	35481	0	66069	0	60256	0	0	21380	0	0	0	0	0	29512
245471	0	0	0	58884	0	0	95499	45709	0	79433	0	56234	0	0	0	0	34674	24547	0	0	43652
147911	0	0	0	35481	0	0	141254	44668	0	74131	0	69183	0	45709	20893	0	40738	29512	0	0	69183
190546	0	0	0	66069	0	0	120226	61660	0	83176	0	66069	0	37154	21878	0	39811	26915	0	0	77625
288403	0	0	0	43652	0	0	181970	52481	0	151356	0	81283	0	54954	31623	0	52481	39811	32359	0	107152
128825	0	0	0	45709	0	0	114815	37154	0	70795	0	77625	0	54954	22387	0	43652	33113	0	0	95499
257040	0	0	0	54954	0	0	147911	51286	0	165959	0	89125	0	51286	25704	0	46774	26303	0	0	70795
125893	0	0	0	51286	0	0	151356	44668	0	151356	0	75858	0	57544	22909	0	45709	25704	28184	0	85114
97724	0	147911	0	37154	0	0	181970	56234	0	77625	0	70795	0	93325	20893	0	39811	43652	28184	0	275423
251189	0	0	0	52481	0	0	186209	64565	0	89125	0	91201	0	57544	27542	23442	45709	28840	26303	0	85114
194984	0	0	0	43652	0	0	162181	46774	0	107152	0	97724	0	51286	35481	28840	47863	22909	28184	0	79433
251189	0	0	0	0	0	0	85114	23442	0	75858	0	64565	0	41687	28840	26303	41687	20417	0	0	67608
309030	0	0	0	56234	0	0	213796	66069	0	107152	0	95499	0	39811	31623	33113	48978	22387	29512	0	70795
239883	0	0	0	44668	0	0	218776	48978	0	77625	0	93325	0	72444	32359	38905	61660	33884	35481	0	114815

		A.naestlundii	S.constellati	E.odontum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vican	C.ectact	T.aocranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.aangus	A.gerencesi	S.oralis	C.cochranea	A.ir	A.18
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
L-D-	1A	43652	524807	50119	26303	60256	70795	25704	194984	38019	575440	1621810.097	263027	102329	407380	43652	194984	14791	54954	
	1B	30903	208930	38019	18197	42658	40738	0	52481	28840	416869	1548816.619	275423	58884	457088	36308	151356	10000	46774	
	1C	28184	69183	23988	12589	32359	32359	0	0	21878	194984	1412537.545	223872	37154	223872	0	107152	6918.3	39811	
	1D	32359	323594	27542	9549.9	23988	23442	0	0	19953	316228	1412537.545	123027	54954	81283	26303	52481	0	0	
L-D+	2A	28840	199526	25119	0	23442	29512	0	0	21380	275423	1584893.192	251189	44668	141254	27542	95499	10233	36308	
50 µg/ml	2B	50119	95499	20417	9772.4	23988	28840	0	42658	0	138038	1548816.619	309030	41687	169824	0	100000	11220	87096	
	2C	45709	389045	31623	11749	19055	27542	0	0	0	478630	1513561.248	309030	64565	79433	30200	58884	10471	37154	
	2D	38905	301995	39811	11482	30200	38019	0	57544	18197	436516	1862087.137	616595	72444	281838	43652	102329	15849	40738	
L+D-	3A	32359	154882	29512	12882	32359	37154	0	69183	20417	489779	1819700.859	478630	56234	213796	52481	102329	26915	0	
	3B	27542	67608	16218	10471	36308	42658	0	64565	19055	102329	1659586.907	346737	39811	281838	64565	169824	23988	0	
	3C	56234	346737	41687	15849	39811	52481	26915	154882	28840	588844	1584893.192	436516	63096	186209	74131	208930	29512	46774	
	3D	33113	141254	34674	14791	41687	56234	46774	83176	25704	645654	1819700.859	588844	66069	281838	74131	147911	23988	58884	
L+D+	4A	42658	257040	35481	11749	31623	79433	35481	95499	25704	588844	1862087.137	645654	83176	245471	93325	288403	36308	66069	
	4B	23442	123027	26303	10233	30903	50119	32359	38905	24547	645654	1584893.192	346737	67608	229087	61660	223872	23442	38905	
	4C	28840	85114	23988	15136	34674	74131	25704	85114	30903	239883	1621810.097	354813	81283	234423	66069	162181	26915	0	
	4D	25704	120226	26303	14125	25119	63096	0	26303	28184	323594	1737800.829	457088	89125	301995	77625	213796	27542	41687	
L-D+	5A	42658	245471	31623	15849	33884	61660	46774	70795	58884	309030	1819700.859	562341	138038	446684	93325	208930	40738	47863	
25 µg/ml	5B	27542	275423	34674	16596	16982	83176	28184	208930	26915	416869	1412537.545	169824	257040	147911	48978	138038	30903	0	
	5C	52481	107152	30200	20893	25704	45709	21878	95499	28184	398107	1412537.545	301995	89125	239883	60256	128825	28840	35481	
	5D	48978	239883	33113	32359	41687	102329	57544	154882	46774	562341	1819700.859	501187	186209	616595	107152	275423	40738	35481	

Sintermedi	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyti	F.nuc polym	C.slowae	F.periodont	N.mucosa	F.nucnuc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
346737	0	0	19953	43652	15136	75858	138038	81283	54954	1E+06	0	50119	0	0	47863	48978	173780	29512	128825	0	47863
114815	0	0	21878	37154	14791	0	93325	57544	42658	2E+06	0	42658	0	0	45709	39811	95499	19953	93325	0	35481
60256	0	0	17378	25119	10233	0	64565	36308	30903	1E+06	0	33113	0	0	27542	25704	43652	16218	66069	0	25119
218776	0	0	0	19953	10471	0	53703	19055	28840	602560	0	26915	0	0	19055	28840	70795	13183	61660	0	17378
97724	0	0	15849	20417	10965	0	58884	27542	31623	1E+06	0	37154	0	0	34674	39811	123027	15849	70795	0	26303
81283	0	0	0	24547	10000	0	61660	42658	30903	933254	0	39811	0	0	29512	36308	75858	18621	66069	0	30200
208930	0	0	0	18621	9332.5	0	48978	35481	22909	630957	0	33113	0	0	26915	31623	48978	16218	58884	0	28840
144544	0	0	16596	30200	12882	0	85114	43642	43652	1E+06	0	44668	33113	11482	52481	34674	69183	23988	87096	0	33113
93325	0	0	12882	20893	13804	0	77625	45709	34674	1E+06	0	46774	31623	0	23988	30200	79433	16982	70795	0	30903
53703	0	0	14454	27542	0	0	61660	41687	22387	1E+06	0	47863	0	0	30200	33884	66069	16596	72444	0	33884
251189	0	0	15488	26915	17378	0	69183	48978	25119	851138	0	56234	36308	11482	38905	40738	66069	21380	69183	0	33884
79433	0	0	22387	52481	12589	0	89125	70795	22387	1E+06	17378	57544	35481	0	39811	64565	97724	20893	77625	0	32359
85114	0	0	29512	45709	29512	100000	123027	74131	33884	1E+06	0	74131	41687	0	57544	50119	691831	23442	95499	134896	46774
213796	0	0	21878	25119	27542	0	77625	53703	43652	870964	0	56234	0	0	39811	39811	194984	18621	72444	0	30200
70795	0	0	20417	22909	12882	123027	100000	60256	39811	912011	8912.5	72444	40738	0	35481	51286	213796	18197	74131	0	38019
79433	0	53703	23988	31623	23988	67608	91201	44668	41687	794328	0	64565	0	12882	45709	58884	245471	18621	79433	131826	36308
245471	43652	0	23442	40738	20417	70795	125893	97724	47863	1E+06	18621	89125	32359	16218	56234	74131	616595	52359	123027	131826	50119
239883	0	0	0	20893	10233	87096	72444	40738	46774	570302	0	47863	0	0	33113	345481	512861	13489	61660	0	28840
81283	0	0	0	21380	8912.5	85114	64565	37154	29512	570302	9120.1	56234	0	0	28184	37154	83176	18197	58884	0	23988
138038	38019	0	21380	31623	15136	66069	107152	100000	44668	1E+06	9332.5	89125	33113	12882	48978	57033	426580	28184	112202	123027	39811

		A.naeslundii	S.constellati	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.gerenceri	S.oralis	C.chracea	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	67608	169824	14454	109648	43652	380189	0	58984	48978	83176	1023292.992	93325	323594	52481	56234	97724	69183	0
	1B	54954	74131	9549.9	52481	37154	288403	0	61660	29512	57544	977237.221	70795	134896	38019	28840	77625	39811	0
	1C	54954	69183	8912.5	48978	33884	251189	0	0	28184	63096	954992.586	87096	81283	28840	30903	87096	34674	0
	1D	53703	87096	10000	56234	30903	257040	0	0	28184	70795	977237.221	100000	138038	30903	30200	147911	45709	0
L-D+	2A	61660	60256	7079.5	61660	33884	199526	0	0	31623	43652	933254.3008	87096	77625	28184	29512	97724	41687	0
50 µg/ml	2B	46774	85114	9549.9	53703	0	144544	0	0	28184	69183	1047128.548	87096	169824	28184	27542	77625	39811	0
	2C	58884	64565	10965	48978	30200	436516	0	0	34674	63096	1047128.548	125893	102329	33884	28840	85114	36308	0
	2D	63096	52481	10965	67608	47863	245471	0	0	28840	54954	933254.3008	74131	72444	28184	26303	97724	66069	0
L+D-	3A	61660	131826	12303	66069	27542	213796	0	0	42658	117490	1071519.305	117490	354813	44668	32359	112202	41687	0
	3B	70795	257040	16218	79433	37154	316228	0	0	47863	199526	1071519.305	144544	457088	46774	38019	169824	50119	0
	3C	75858	64565	13183	144544	46774	436516	0	0	30903	93325	954992.586	87096	131826	34674	28184	131826	48978	0
	3D	60256	97724	11482	75858	30200	257040	0	0	34674	123027	1000000	100000	371535	37154	30903	95499	48978	0
L+D+	4A	74131	77625	13804	85114	41687	489779	0	0	34674	177828	954992.586	91201	229087	37154	26303	186209	41687	0
50 µg/ml	4B	64565	69183	12023	100000	0	398107	0	0	72444	100000	933254.3008	87096	245471	38905	32359	128825	64565	0
	4C	53703	79433	18197	125893	30200	363078	0	0	38905	173780	977237.221	112202	263027	46774	29512	120226	53703	0
	4D	83176	97724	36308	158489	27542	446684	0	0	42658	165959	977237.221	109648	288403	44668	30903	218776	60256	0
L-D+	5A	58884	63096	15488	93325	40738	309030	0	0	44668	81283	977237.221	104713	194984	50119	25119	239883	58884	0
25 µg/ml	5B	52481	63096	14791	74131	40738	229087	0	0	52481	79433	1047128.548	114815	181970	48978	32359	263027	50119	0
	5C	52481	58884	14791	64565	46774	218776	0	0	43652	87096	933254.3008	100000	102329	43652	29512	158489	47863	0
	5D	57544	63096	15136	117490	29512	263027	0	0	39811	93325	1023292.992	109648	186209	41687	26303	134896	48978	0
L+D+	6A	61660	87096	12589	79433	52481	316228	0	0	44668	154882	977237.221	125893	346737	63096	120226	117490	39811	0
25 µg/ml	6B	61660	45709	13804	83176	27542	141254	0	0	40738	56234	1023292.992	120226	75858	38019	28184	112202	42658	0
	6C	57544	85114	15488	67608	31623	363078	0	0	42658	234423	1047128.548	151356	295121	47863	32359	100000	45709	0
	6D	60256	91201	13490	64565	0	257040	0	0	45709	147911	1202264.435	186209	363078	53703	33113	186209	48978	0

S.intermedia	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyticus	F.nuc polym	C.slowae	F.peridontalis	N.mucosa	F.nucrus	C.gingivalis	S.gordonii	T.forisymbia	S.noxia	P.acne	P.melanogenes	S.mitis	E.coriaceus	G.morbillorum	C.spulgentis	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	P. interm
66069	0	144544	26303	177828	0	72444	39811	169824	0	54954	0	131826	0	104713	81283	33884	42658	38905	51286	0	263027
40738	0	85114	22387	97724	0	50119	0	75858	0	43652	0	64565	0	52481	50119	19498	24547	18197	33884	0	87096
33884	0	93325	23442	64565	0	52481	0	74131	0	40738	0	67608	0	46774	54954	14791	30200	19498	28184	0	89125
46774	0	75858	22387	64565	0	47863	25704	85114	0	58884	0	81283	0	40738	52481	23988	29512	19055	30200	0	75858
35481	0	79433	0	45709	0	43652	0	70795	0	57544	0	81283	0	47863	58884	26915	28840	20417	33113	0	69183
53703	0	66069	22387	48978	0	41687	0	60256	0	46774	0	85114	0	41687	47863	29512	33113	19498	37154	0	64565
45709	0	63096	0	109648	0	67608	30200	186209	0	53703	0	83176	0	35481	48978	25704	36308	20893	41687	0	58884
41687	0	67608	0	77625	0	45709	0	95499	0	45709	0	87096	0	64565	47863	29512	31623	21878	30200	0	54954
85114	0	69183	0	83176	0	53703	25119	95499	0	64565	0	81283	0	44668	56234	30200	40738	23988	39811	0	69183
95499	0	58884	26303	117490	0	64565	34674	181970	0	69183	0	117490	0	48978	66069	29512	45709	28184	48978	0	74131
56234	0	83176	0	112202	0	48978	32359	141254	0	52481	0	77625	0	64565	58884	25704	38019	25119	45709	0	85114
83176	0	72444	0	117490	0	52481	30200	117490	0	51286	0	100000	0	58884	58884	29512	45709	28184	43652	0	77625
72444	0	102329	0	234423	0	75858	32359	281838	0	51286	0	74131	0	63096	70795	27542	45709	27542	58884	0	93325
74131	0	123027	26303	173780	0	74131	30903	245471	0	66069	0	120226	0	77625	72444	31623	54954	31623	64565	125893	117490
64565	0	117490	26303	181970	0	69183	33113	234423	0	74131	0	81283	0	75858	64565	23442	52481	30903	63096	134896	173780
69183	0	109648	25119	204174	0	58884	41687	275423	0	60256	0	93325	0	69183	77625	31623	63096	29512	74131	128825	208930
52481	0	95499	25704	117490	0	43652	52481	154882	0	58884	0	81283	0	66069	66069	36308	67608	29512	79433	0	125893
50119	0	83176	29512	85114	0	45709	57544	104713	0	67608	0	81283	0	60256	74131	37154	77625	30200	72444	0	93325
43652	0	89125	28840	162181	0	53703	56234	120226	0	47863	0	72444	0	64565	58884	38019	63096	25119	72444	0	97724
48978	0	107152	29512	123027	0	47863	46774	169824	0	60256	12589	79433	0	69183	64565	38019	75858	24547	66069	0	173780
61660	0	120226	30200	177828	0	66069	52481	234423	34674	107152	0	81283	0	63096	70795	47863	81283	26303	89125	0	134896
39811	0	100000	25119	77625	0	64565	50119	81283	39811	75858	0	83176	0	60256	54954	41687	87096	24547	60256	0	89125
63096	0	123027	28840	213796	0	75858	43652	251189	0	63096	15488	81283	0	60256	72444	44668	85114	36308	66069	0	114815
66069	0	107152	31623	134896	0	63096	47863	181970	31623	74131	0	87096	0	67608	87096	47863	77625	29512	67608	165959	177828

		A.naeslundii	S.constellati	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc vici	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.anginosus	S.sanguis	A.gerenceri	S.oralis	C.chracea	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-																			
	1A	478630	83176	50119	25119	177828	61660	123027		61660	123027	1E+06	1E+06	269153	36308	69183	549541	34674	154882
	1B	190546	58884	38019	16982	60256	26303	58884		54954	64565	588844	263027	93325	30200	0	316228	19498	70795
	1C	204174	57544	27542	19498	67608	31623	63096		56234	58884	575440	295121	87096	34674	0	501187	23988	123027
	1D	295121	58884	35481	13490	107152	31623	75858		0	67608	851138	588844	177828	34674	0	457088	23442	154882
L-D+																			
	2A	275423	47863	38019	15136	81283	38019	64565		0	58884	363078	309030	112202	29512	60256	478630	28184	102329
	2B	288403	46774	33113	15488	93325	40738	66069		0	50119	645654	416869	87096	33884	0	426580	28184	102329
	2C	123027	44668	34674	15136	66069	40738	70795		0	54954	512861	371535	93325	29512	0	281838	22387	87096
	2D	190546	60256	54954	15488	81283	46774	81283		0	64565	1E+06	512861	204174	36308	0	436516	19055	97724
L+D-																			
	3A	154882	70795	33884	14125	104713	54954	104713		75858	72444	1E+06	630957	169824	43652	83176	346737	21878	165959
	3B	229087	67608	38905	15488	87096	44668	72444		53703	64565	1E+06	831764	177828	45709	91201	741310	34674	120226
	3C	426580	70795	44668	19498	169824	46774	89125		67608	67608	933254	707946	229087	45709	93325	478630	38905	223872
	3D	100000	70795	29512	14791	61660	33884	45709		0	56234	794328	331131	288403	38019	0	275423	25704	72444
L+D+																			
	4A	177828	64565	31623	18621	64565	38905	48978		60256	63096	1E+06	691831	95499	37154	56234	398107	30903	120226
	4B	275423	69183	57544	16982	93325	57544	66069		97724	77625	1E+06	891251	281838	52481	58884	724436	53703	125893
	4C	147911	66069	50119	21878	75858	41687	54954		70795	79433	1E+06	562341	151356	48978	0	380189	46774	173780
	4D	186209	57544	38905	18621	85114	50119	52481		79433	69183	1E+06	851138	97724	43652	0	398107	41687	234423
L-D+																			
	5A	630957	66069	41687	23442	199526	77625	70795		83176	64565	851138	537032	102329	41687	79433	489779	44668	416869
	5B	301995	57544	45709	21380	95495	75858	48978		75858	74131	977237	549541	89125	38905	75858	457088	53703	275423
	5C	134896	58884	33884	38019	81283	50119	52481		56234	67608	741310	363078	154882	36308	0	380189	32359	93325
	5D	691831	72444	34674	33884	218776	87096	70795		104713	87096	741310	380189	112202	43652	83176	457088	41687	467735
L+D+																			
	6A	239883	72444	44668	31623	102329	56234	48978		83176	75858	1E+06	501187	169824	46774	63096	630957	40738	194984
	6B	218776	63096	44668	33884	91201	54954	44668		97724	67608	933254	407380	91201	42658	0	323594	38905	186209
	6C	363078	70795	32359	42658	158489	83176	50119		117490	74131	1E+06	602560	114815	45709	79433	549541	46774	391131
	6D	309030	77625	35481	60256	95499	95499	44668		91201	79433	1E+06	645654	186209	52786	75858	549541	46774	199526

S.intermedia	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyticus	F.nuc.polym	C.shawae	F.periodont	N.mucosa	F.nucruc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
20417	39811	0	56234	58884	83176	0	537032	41687	0	75858	87096	151356	69183	79433	323594	60256	295121	32359	281838	0	67608
10471	23442	0	91201	26915	38019	0	208930	20893	0	36308	50119	58884	35481	58884	75858	0	123027	13183	85114	0	61660
11749	17783	0	97724	17783	41687	0	144544	20893	10965	40738	43652	60256	37154	33884	77625	32359	144544	16982	218776	114815	46774
12589	28184	0	141254	21878	44668	0	204174	19055	0	39811	53703	58884	33884	35481	85114	75858	186209	16596	144544	0	60256
13804	38905	0	95499	31623	39811	0	204174	22387	20893	34674	61660	47863	40738	30903	66069	37154	134896	16218	158489	0	72444
10233	25704	0	112202	22909	42658	0	213796	28184	11482	33884	61660	61660	37154	33884	64565	37154	112202	18621	165959	0	60256
11749	25119	0	89125	26303	41687	0	138038	23988	10471	33113	58884	61660	29512	30903	61660	23442	169824	21878	165959	0	70795
14791	23988	0	190546	24547	43652	0	199526	25119	12303	38905	54954	67608	50119	26303	63096	24547	138038	12589	190546	0	74131
15849	26915	0	107152	25704	45709	0	275423	30200	12882	51286	52481	72444	38019	26915	67608	26915	151356	16218	147911	0	48978
18621	33113	0	204174	36308	61660	0	295121	36308	23442	60256	77625	79433	35481	28840	87096	26915	181970	22387	229087	0	66069
21380	30200	0	288403	45709	67608	0	426580	56234	50119	45709	75858	81283	38905	28184	85114	51286	181970	22909	102329	0	64565
23442	19498	0	83176	26915	41687	0	204174	60256	30200	40738	58884	56234	19953	30200	69183	0	125893	15136	123027	0	54954
19953	27542	0	123027	27542	46774	0	165959	50119	33884	43652	77625	77625	25704	33884	69183	29512	186209	23442	134896	0	72444
28184	34674	0	223872	48978	57544	0	199526	63096	34674	64565	75858	95499	35481	34674	114815	41687	194984	21380	95499	0	63096
25119	36308	0	165959	38905	54954	66069	158489	54954	38019	61660	79433	107152	29512	40738	85114	39811	165959	26915	151356	0	72444
25119	33113	0	95499	35481	46774	0	186209	66069	35481	48978	85114	102329	29512	46774	77625	52481	208930	25704	75858	0	79433
25704	43652	0	549541	85114	69183	85114	489779	85114	37154	48978	77625	89125	43652	39811	83176	199526	181970	20893	107152	0	57544
23442	37154	0	239883	70795	48978	0	331131	72444	41687	53703	64565	93325	30200	46774	72444	77625	144544	24547	64565	0	66069
22909	30200	0	131826	37154	45709	0	147911	56234	42658	44668	74131	95499	26303	47863	69183	45709	144544	20417	138038	72444	87096
21380	50119	97724	562341	72444	75858	72444	380189	64565	50119	48978	79433	85114	36308	42658	79433	165959	112202	23442	123027	0	75858
23988	33884	0	134896	33884	47863	69183	181970	67608	48978	79433	70795	89125	27542	38019	79433	43652	107152	23988	66069	0	64565
26303	48978	0	323594	30200	45709	0	194984	42658	28184	52481	58884	109648	26303	57544	69183	50119	114815	23988	77625	0	51286
26915	39811	0	380189	44668	52481	102329	331131	63096	32359	61660	64565	95499	38019	41687	93325	56234	102329	25704	93325	70795	56234
27542	42658	102329	204174	47863	53703	85114	213796	61660	39811	52481	81283	107152	38905	50119	77625	48978	107152	28840	77625	0	83176

		A.naesslundii	S.constellatus	E.nodatum	P.gingivalis	A.a	F.nuc.viceni	C.rectus	T.socranski	E.saburreum	P.micros	V.pavula	A.viscosus	S.anginosus	S.aanguis	A.geregeri	S.oralis	C.chroacia	A.israelii
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-		70795	70795	33113	70795	50119	81283	0		47863	69183	1E+06	194984	97724	61660	162181	177828	275423	0
	1A	40738	56234	25119	41687	40738	52481	0		22387	39811	933254	131826	53703	42658	112202	81283	57544	0
	1B	53703	64565	28840	28840	34674	42658	0		32359	53703	1E+06	165959	56234	48978	97724	190546	66069	0
	1C	54954	58884	31623	33113	39811	57544	0		34674	46774	1E+06	213796	52481	39811	120226	117490	69183	0
L-D+	2A	53703	64565	32359	56234	34674	69183	0		30200	47863	1E+06	158489	61660	44668	123027	158489	151356	0
	2B	64565	72444	31623	40738	44668	69183	0		39811	43652	1E+06	169824	52481	42658	97724	229087	64565	0
	2C	53703	64565	32359	32359	32359	33113	0		32359	42658	1E+06	346737	50119	36308	89125	85114	61660	0
	2D	54954	83176	27542	44668	25119	69183	0		38905	43652	1E+06	181970	77625	41687	97724	208930	42658	0
L+D-	3A	63096	81283	29512	32359	41687	38019	0		38905	44668	1E+06	380189	72444	56234	102329	229087	48978	0
	3B	40738	69183	26303	25704	48978	37154	0		23988	40738	1E+06	213796	48978	38905	79433	89125	47863	0
	3C	50119	67608	29512	24547	29512	39811	0		31623	48978	1E+06	147911	48978	42658	72444	89125	52481	0
	3D	46774	89125	29512	30200	34674	69183	0		43652	47863	1E+06	154882	77625	51286	125893	331131	40738	0
L+D+	4A	48978	77625	47863	53703	34674	53703	0		41687	67608	1E+06	177828	79433	43652	100000	204174	51286	0
	4B	61660	83176	74131	52481	37154	52481	0		48978	58884	1E+06	128825	66069	48978	109648	331131	43652	0
	4C	51286	87096	43652	66069	40738	47863	0		42658	57544	1E+06	549541	63096	40738	120226	173780	64565	0
	4D	46774	79433	28184	42658	35481	39811	0		39811	42658	1E+06	117490	60256	45709	120226	281838	40738	0
L-D+	5A	56234	95499	70795	32359	33884	47863	0		45709	57544	1E+06	151356	61660	39811	173780	234423	45709	0
	5B	54954	85114	60256	83176	40738	42658	0		44668	53703	1E+06	123027	72444	40738	107152	213796	32359	0
	5C	52481	512861	30200	30903	30200	43652	0		48978	69183	1E+06	138038	588844	77625	144544	660693	51286	0
	5D	58884	74131	48978	53703	31623	46774	0		60256	58884	1E+06	162181	56234	44668	147911	102329	57544	0
L+D+	6A	57544	91201	48978	77625	42658	69183	0		53703	69183	1E+06	123027	63096	52481	114815	295121	72444	0
	6B	60256	89125	33884	51286	42658	61660	0		61660	61660	1E+06	218776	63096	72444	123027	218776	53703	0
	6C	46774	75858	40738	56234	33884	43652	0		47863	52481	1E+06	112202	70795	57544	125893	251189	66069	0
	6D	53703	74131	37154	46774	28840	38019	0		52481	53703	1E+06	114815	54954	45709	131826	52481	19055	0

S.intermedia	T.denticola	P.nigrescens	A.odontolyticus	F.nucopolym	C.shawae	F.periodont	N.mucosa	F.nucruc	C.gingivalis	S.gordonii	T.forsythia	S.noxia	P.acne	P.melanogen	S.mitis	E.corrodens	G.morbillitor	C.spuligena	L.buccalis	C.gracilis	P.intermedia
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
147911	22387	0	37154	75858	45709	95499	28840	79433	218776	301995	38019	467735	79433	87096	275423	60256	281838	60256	97724	61660	48978
63096	0	0	30903	47863	28184	0	25119	46774	60256	57544	5849	87096	0	48978	97724	44668	91201	46774	51286	0	52481
60256	0	0	22387	28184	25704	0	44668	42658	69183	72444	10233	69183	72444	34674	89125	41687	72444	35481	47863	0	38019
44668	0	0	38905	28840	28184	0	46774	23988	57544	50119	16218	74131	85114	42658	79433	38905	77625	26915	35481	0	54954
46774	0	0	38905	23442	22909	0	56234	26303	38905	69183	15488	67608	64565	51286	81283	35481	67608	23442	38905	0	53703
50119	0	0	40738	30903	25704	0	46774	31623	42658	61660	14125	66069	0	47863	85114	33113	74131	23442	36308	0	46774
44668	0	0	42658	26915	23442	0	43652	25704	48978	53703	21878	64565	158489	51286	58884	39811	91201	26303	43652	0	64565
50119	0	0	39811	30903	24547	0	58884	26303	39811	64565	28184	70795	0	47863	79433	39811	83176	28840	56234	50119	66069
57544	0	0	35481	35481	23442	0	72444	29512	42658	93325	16596	85114	81283	29512	83176	32359	79433	28915	53703	0	31623
42658	0	0	30903	30903	15136	0	51286	19055	26303	45709	85114	53703	0	32359	63096	27542	63096	18621	33884	0	26303
42658	0	0	25119	33884	18197	0	97724	32359	38019	57544	95499	67608	0	23988	75858	33113	64565	22909	39804	0	20893
60256	0	0	31623	35481	18197	0	83176	33884	52481	93325	12589	61660	0	27542	95499	35481	89125	25119	60256	0	33884
46774	0	0	46774	36308	23442	0	158489	31113	85114	87096	21878	70795	58884	54954	75858	43652	72444	33884	60256	0	74131
61660	16596	0	52481	83176	23442	0	245471	63660	69183	75858	26303	74131	57544	85114	95499	60256	75858	28184	46774	0	97724
47863	0	0	35481	40738	26303	0	128825	38019	52481	81283	24547	79433	0	52481	79433	50119	91201	25119	45709	0	63096
40738	0	0	48978	54954	29512	0	311826	24547	36308	74131	20893	72444	91201	48978	77625	38905	89125	32000	66069	0	67608
45709	16218	0	34674	38905	26915	0	109648	46774	48978	67608	10233	64565	0	39811	74131	33884	64565	19953	38905	64565	63096
47863	0	0	47863	47863	26308	138038	194984	54565	51286	64565	21380	61660	0	38905	75858	38905	61660	17783	63096	0	48978
158489	23442	0	42658	57099	26303	123027	100000	54954	31754	288403	17783	57544	69183	48978	269153	34674	75858	18197	48978	64565	56234
46774	15849	0	42658	48978	30200	0	346737	104713	54954	53703	25704	79433	0	47863	66069	38019	75858	23442	50119	0	72444
54954	19055	0	42658	72444	24547	93325	223872	67608	75858	57946	30200	74131	0	70795	87096	30200	75858	40738	66069	75858	89125
57544	28840	0	47863	58884	37154	0	190546	47863	51286	57544	30200	77625	63096	50119	95499	60256	89125	21878	63096	0	52481
70795	38019	0	48978	48978	23988	91201	177828	64565	64565	199526	16596	67608	0	48978	91201	34674	74131	21380	48978	0	50119
32359	22909	0	40738	36562	17378	0	95499	48978	42658	64565	22909	58884	0	44668	74131	36562	81283	21380	72444	0	56234

L-D-	1A	26302.68	36307.81	24547.09	35481.34	26302.68	169824.4	16595.87	39810.72	29512.09	39810.72	812830.5	40738.03	54954.09	36307.81	56234.13	102329.3	30199.52	21379.62
	1B	18197.01	19952.62	7413.102	24177.38	11748.98	7413.102	0	39810.72	10964.78	15135.61	17782.79	19952.62	40738.03	12882.5	32359.37	38804.51	24547.09	13499.63
	1C	26302.68	36307.81	12022.64	20177.62	14454.4	56234.13	0	39810.72	12882.5	16595.87	524807.5	37153.52	46465.82	14791.08	30902.95	28940.52	19952.62	12589.25
	1D	26302.68	38904.51	14454.4	20892.96	13182.57	52480.75	0	0	18197.01	21877.62	151356.1	27542.29	61659.5	15135.61	33884.42	33884.42	15135.61	13499.63
L-D+	2A	12589.25	29512.09	7585.776	11481.54	9332.543	60609.34	0	0	14125.38	11481.54	87096.36	22908.68	47825.01	10715.19	29512.09	22367.21	23877.62	13182.57
50 µg/ml	2B	13803.84	48977.88	13313.11	14454.4	12302.68	7413.102	0	0	39802.42	32539.37	32539.37	32539.37	7585.776	15848.19	37153.52	52480.75	20892.96	15477.17
	2C	22387.21	57303.18	16218.1	17782.79	18620.87	91201.08	0	0	2187.62	3313.11	72436	48977.88	19162.09	25703.96	48977.88	7313.8	25703.96	17782.79
	2D	25118.86	51286.14	16982.44	25118.86	20892.96	151356.1	12589.25	0	0	22387.21	60609.34	380189.4	45708.82	93325.43	22908.68	46773.51	70794.58	26915.35
L-D+	3A	30902.95	72443.6	20892.96	27542.29	25118.86	251188.6	15848.93	0	0	28183.83	77624.71	954992.6	67608.3	199526.2	28183.83	60255.96	48977.88	30199.52
	3B	33113.11	64565.42	27542.29	32359.37	28183.83	20173.8	16218.1	27542.29	33113.11	70794.58	812830.5	58884.37	16218.1	31622.78	67608.3	97723.72	38018.94	26915.35
	3C	35481.34	77624.71	21877.62	30491.34	26915.35	16218.1	16218.1	0	0	31622.78	114195.4	630957.3	54954.09	22387.21	28183.83	57303.18	52480.75	28183.83
	3D	28840.32	69183.1	20417.38	15186.2	26302.68	324422.9	15135.61	25118.86	28183.83	30199.52	812830.5	48977.88	85113.8	26915.35	52480.75	54954.09	19054.61	20892.96
L-D+	4A	30902.95	69183.1	16595.87	23988.33	18197.01	95499.26	11481.54	0	0	25118.86	34673.69	194984.5	39810.72	181970.1	23442.29	37153.52	45708.82	32359.37
50 µg/ml	4B	37153.52	38018.94	27542.29	31622.78	34673.69	190546.1	20417.38	0	0	34673.69	3313.11	1479108	77624.71	41686.94	37153.52	57543.99	10867.02	26915.35
	4C	30902.95	58884.37	17378.01	24547.09	21379.62	109647.8	13182.57	0	0	24547.09	26302.68	263026.8	30199.52	93325.43	19952.62	39810.72	44668.36	33884.42
	4D	26302.68	57303.18	15488.17	30902.95	23442.29	154881.7	12589.25	0	0	21379.62	36307.81	36307.81	28183.83	7724.71	20892.96	36307.81	39810.72	15135.61
L-D+	5A	42657.76	77624.71	26915.35	36307.81	30199.52	380189.4	19952.62	0	0	36307.81	95499.26	1096478	74131.02	7723.72	28183.83	67608.3	57543.99	28840.32
25 µg/ml	5B	42657.76	57303.18	20892.															

Cochracea	A. israeli	S. intermedius	T. denticola	P. nigrescens	A. odontolyticus	F. nuc. polyo	C. shawae	P. periodonticus	N. mucosa	F. nuc. nuc	C. gingivitis	S. gordoni	T. forsythia	S. noxia	P. acne	P. melanogenes	S. mitis	E. comitens	C. morbillosus	C. apigenens	L. buccalis	C. gracilis	P. intermedia
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
66069.34	17376.01	25703.96	36307.81	61659.5	34673.69	93325.43	25703.96	380189.4	97723.72	524807.5	53703.18	25118.86	21379.62	36307.81	15135.61	28183.83	21877.62	38904.51	51286.14	14791.08	57543.99	22908.68	30199.52
34673.69	17376.01	21379.62	12302.69	39810.72	30902.95	91201.08	20892.96	199526.2	67608.3	301995.2	21379.62	23442.29	11748.98	42657.95	14791.08	16218.1	16595.87	19054.61	23988.33	11481.54	36307.81	19498.45	23988.33
58884.37	13182.57	18197.01	11481.54	72443.6	25703.96	97723.72	14125.38	269153.5	63095.73	245470.9	27542.29	15848.93	20417.38	37153.52	16982.44	13863.84	15135.61	15848.93	19052.62	7585.776	26915.35	15182.57	24547.09
35481.34	10222.64	15135.61	5317.635	44668.36	21379.62	60255.96	12302.69	85113.8	36307.81	53176.38	16982.44	12569.25	12569.25	40738.03	16982.44	12862.5	14454.4	17882.79	19054.61	6165.95	15135.61	19498.45	19498.45
24547.09	12302.69	16595.87	7943.282	28183.83	22387.21	57543.99	17782.79	97723.72	43651.58	245470.9	53703.18	18620.87	8912.509	36307.81	0	7244.36	16595.87	17782.79	23442.29	4897.788	18197.01	10715.19	10964.78
54954.09	10715.19	14454.4	7244.36	44668.36	22387.21	52480.75	15848.93	85113.8	35481.34	77624.71	16955.87	14791.08	22387.21	32359.37	13489.63	8511.38	12302.69	14454.4	52480.75	15848.93	10222.63	14125.38	14125.38
72443.6	10964.78	16982.44	9120.108	42657.95	39810.72	47863.01	11748.98	74131.02	43651.58	58884.37	37153.52	16595.87	18620.87	37153.52	0	9332.543	12302.69	16982.44	16595.87	6918.31	14125.38	8912.509	13489.63
53703.18	12862.5	19498.45	10471.29	47863.01	29512.09	75857.76	14454.4	14454.4	46773.51	147910.8	24547.09	18620.87	17378.01	37153.52	0	12569.25	16982.44	16595.87	19498.45	8128.305	18197.01	11220.18	13803.84
28840.32	13182.57	19952.62	10471.29	46773.51	30902.95	58884.37	58884.37	15488.17	233883.3	50118.72	123026.9	22908.68	16218.1	38018.94	14454.4	17782.79	16982.44	22387.21	23442.29	9120.108	20892.96	13182.57	14454.4
32359.37	14791.08	20892.96	11748.98	67608.3	30199.52	70794.58	13489.63	102229.3	46773.51	95499.26	23442.29	19952.62	17378.01	47863.01	13489.63	22908.68	19498.45	22387.21	24547.09	7585.776	22387.21	14791.08	15848.93
42657.95	14791.08	19498.45	13489.63	57543.99	30199.52	81283.05	14454.4	229086.8	66069.34	213796.2	25703.96	21379.62	16595.87	38904.51	14791.08	15848.93	18197.01	25703.96	20012.09	8709.638	31622.78	13803.84	16982.44
30902.95	19498.45	29512.09	16982.44	51286.14	37153.52	56234.13	30902.95	229086.8	74131.02	77624.71	30902.95	25703.96	20892.96	56234.13	20417.38	12882.5	23442.29	23988.33	30002.95	11748.98	27542.29	42657.95	19952.62
34673.69	14791.08	20417.38	11748.98	45708.82	32359.37	87096.36	15848.93	22387.21	58884.37	263028.8	30902.95	23442.29	13803.84	52480.75	15135.61	15488.17	21877.62	26915.35	30902.95	10000	30199.52	14454.4	18620.87
32359.37	15848.93	26915.35	14454.4	53703.18	30199.52	169824.4	14454.4	363078.1	58884.37	426579.5	25703.96	25703.96	12862.5	51286.14	14454.4	14125.38	22908.68	24547.09	33884.42	9120.108	32359.37	25703.96	25118.86
60255.96	15135.61	24547.09	16218.1	50118.72	37153.52	17782.79	16982.44	436515.8	51286.14	316227.8	33113.11	26302.68	19952.62	44668.36	16982.44	32359.37	26915.35	28840.32	28840.32	12589.25	39810.72	20417.38	28183.83
23988.33	21379.62	30902.95	14125.38	52480.75	38018.94	97723.72	17782.79	33884.42	56234.13	575439.9	28183.83	20908.68	18197.01	56234.13	15135.61	15848.93	24547.09	25703.96	31622.78	15135.61	36307.81	23988.33	30199.52
31622.78	16595.87	29512.09	16218.1	52480.75	41686.94	72443.6	15848.17	186208.7	165952.96	169824.4	36307.81	30199.52	19952.62	56234.13	15488.17	19498.45	26302.68	27542.29	31622.78	9772.372	32359.37	25703.96	28183.83
34673.69	18197.01	22908.68	10471.29	74131.02	33884.42	85113.8	12589.25	245470.9	53703.18	245470.9	28840.32	32359.37	19952.62	41686.94	18197.01	20417.38	23442.29	29512.09	33113.11	10000	43651.58	26302.68	32359.37
75857.76	15488.17	36307.81	15135.61	63095.73	42657.95	19054.61	16218.1	181970.1	66069.34	275422.9	40738.03	33884.42	25118.86	54954.09	17782.79	22387.21	28183.83	30199.52	44668.36	15135.61	38018.94	28183.83	35481.34
38015.94	16595.87	32359.37	15488.17	67608.3	38904.51	79432.82	194984.5	87096.36	269153.5	42657.95	32359.37	36307.81	52480.75	14791.08	28183.83	32359.37	35481.34	41686.94	16218.1	44668.36	28183.83	44668.36	44668.36
32359.37	17782.79	26302.68	15848.93	61659.5	36307.81	77624.71	19952.62	117489.8	46773.51	95499.26	35481.34	28840.32	28183.83	52480.75	15135.61	25118.86	33113.11	35481.34	46773.51	14454.4	33884.42	25118.86	35481.34
25118.86	26302.68	28840.32	18620.87	61659.5	38904.51	147910.8	18197.01	208929.6	60255.96	33113.11	30902.95	34673.69	23988.33	54954.09	15848.93	29512.09	33884.42	22387.21	28183.83	30199.52	32359.37	32359.37	32359.37
31622.78	19054.61	26915.35	19498.45	45708.82	38904.51	97723.72	20892.96	234422.9	54954.09	363078.1	46773.51	27542.29	19952.62	53703.18	18620.87	23988.33	34673.69	33113.11	45708.82	14791.08	45708.82	28840.32	31622.78
48977.88	33884.42	45708.82	27542.29	41686.94	60255.96	75857.76	48977.88	169824.4	89125.09	91201.08	57543.99	50118.72	18620.87	158489.3	38018.94	21379.62	46773.51	63095.73	23988.33	51286.14	58884.37	35481.34	35481.34

		A.naeslundii	S.conetolensis	E.nodatum	P.gingivitis	A.a	F.nuc.vici	C.rectus	T.saccarans	E.saburreum	P.micros	V.parvula	A.viscosus	S.sanguinosus	S.sanguis	A.gemencensis	S.oralis	C.ochracea	A.israeli
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-D-	1A	28840.32	70794.58	34673.69	72443.6	53703.18	87096.36	46773.51	43651.58	35481.34	457088.2	1047129	93325.43	93325.43	39810.72	54954.09	47863.01	51286.14	44668.36
	1B	29512.09	91201.08	16595.87	35481.34	43651.58	138038.4	46773.51	0	39810.72	891250.9	1071519	87096.36	263026.8	33884.42	39810.72	39810.72	33113.11	40738.03
	1C	25118.86	79432.82	14454.4	39810.72	29512.09	95499.26	27542.29	0	29512.09	501187.2	1071519	83176.38	93325.43	32359.37	37153.52	37153.52	24547.09	47863.01
	1D	18620.87	75857.76	15848.93	32359.37	26302.68	66069.34	21877.62	0	25118.86	478630.1	1096478	64565.42	89125.09	26840.32	35481.34	31622.78	22387.21	38018.94
L-D+ 50 µg/ml	2A	22908.68	66069.34	23442.29	39810.72	33113.11	151356.1	0	0	31622.78	158489.3	1120218	81283.05	83176.38	32359.37	40738.03	30199.52	21877.62	44668.36
	2B	19054.61	44668.36	15488.17	30902.95	34673.69	48977.88	29512.09	0	28183.83	295120.9	1202264	114815.4	77624.71	25118.86	40738.03	32359.37	27542.29	45708.82
	2C	22387.21	69183.1	19952.62	33113.11	37153.52	77624.71	0	0	33884.42	446683.6	1174898	77624.71	81283.05	31622.78	38018.94	37153.52	26302.68	46773.51
	2D	20892.96	42657.95	19952.62	30199.52	34673.69	70794.58	0	0	37153.52	194984.5	1348963	97723.72	51286.14	26302.68	38904.51	33884.42	26302.68	44668.36
L-D+	3A	22908.68	50118.72	19054.61	35481.34	34673.69	234422.9	39810.72	0	29512.09	416869.4	1148154	91201.08	66069.34	30199.52	37153.52	30199.52	28840.32	47863.01
	3B	29512.09	26915.35	19498.45	44668.36	44668.36	436515.8	39810.72	0	32359.37	67608.3	1380384	83176.38	38018.94	26302.68	47863.01	42657.95	30902.95	47863.01
	3C	20892.96	39810.72	16595.87	42657.95	35481.34	223872.1	28183.83	0	32359.37	60255.96	1174898	72443.6	57543.99	30902.95	39810.72	41686.94	26915.35	41686.94
	3D	22908.68	30902.95	20892.96	40738.03	38904.51	331131.1	0	0	28183.83	51286.14	1318257	75857.76	46773.51	25118.86	41686.94	39810.72	32359.37	37153.52
L-D+ 50 µg/ml	4A	21379.62	45708.82	16982.44	31622.78	31622.78	81283.05	36307.81	0	28840.32	676083	1148154	60255.96	57543.99	22908.68	33884.42	29512.09	20892.96	34673.69
	4B	21379.62	52480.75	19952.62	35481.34	33884.42	79432.82	30199.52	0	25703.96	724436	1258925	75857.76	72443.6	25118.86	32359.37	34673.69	21877.62	34673.69
	4C	31622.78	57543.99	22908.68	48977.88	34673.69	83176.38	34673.69	0	34673.69	851138	1096478	44668.36	58884.37	27542.29	32359.37	34673.69	25118.86	32359.37
	4D	22908.68	60255.96	18620.87	43651.58	32359.37	112201.8	38018.94	0	30902.95	812830.5	1258925	58884.37	56234.13	27542.29	34673.69	28183.83	26302.68	33884.42
L-D+ 5A	5A	36307.81	81283.05	38018.94	43651.58	39810.72	63096.73	0	0	32359.37	331831.7	1174898	91201.08	18496.38	34673.69	43651.58	38018.94	26915.35	46773.51
	5B	43651.58	81283.05	29888.33	61659.5	53703.18	104712.9	0	19952.62	44668.36	588843.7	1380384	83176.38	37096.36	43651.58	44668.36	36267.95	29512.09	56234.13
	5C	37153.52	69183.1	28183.83	39810.72	50118.72	380189.4	28183.83	25118.86	41686.94	812830.5	1454450	97023.72	93325.43	37153.52	48977.88	29512.09	30902.95	57543.99
	5D	47863.01	204173.8	29512.09	48977.88	61659.5	223872.1	30199.52	0	40738.03	676240.1	1288250	190546.1	204173.8	44668.36	56234.13	51286.14	29512.09	72443.6
L-D+ 25 µg/ml	6A	32359.37	77624.71	28018.94	42657.95	46773.51	91201.08	22908.68	25703.96	33884.42	794328.2	1148154	67808.3	87094.58	30199.52	34673.69	33884.42	24547.09	53703.18
	6B	41686.94	77624.71	21877.62	67808.3	47863.01	371535.2	35481.34	0	44668.36	1047129	1258925	107151.9	107151.9	40738.03	50118.72	52480.75	36307.81	64565.42
	6C	36307.81	56234.13	29703.95	54954.09	50118.72	151356.1	30199.52	0	42657.95	53703.18	1258925	57543.99	64565.42	35481.34	44668.36	31622.78	27542.29	64565.42
	6D	37153.52	23442.29	25988.33	61659.5	46773.51	346736.9	36307.81	0	40738.03	63096.73	1513561	977232.73	34815.4	29512.09	56234.13	31131.11	29512.09	69183.1

Planctônica 30J/cm ²	L-D-	L+D+	Sobrev.(%)	Redução(%)	
<i>A.naeslundii</i>	54532.87	54531.11	99.99677	0.00323	0%
<i>S.constellatus</i>	117296.3	66924.46	57.0559	42.9441	43%
<i>E.nodatum</i>	24520.77	21965.16	89.57777	10.42223	10%
<i>P.gingivalis</i>	78684.04	23992.73	30.4925	69.5075	69%
<i>A.a</i>	38772.26	23437.63	60.44948	39.55052	39%
<i>F.nuc vican</i>	314434.3	111563.5	35.4807	64.5193	64%
<i>C.rectus</i>	52116.93	12987.02	24.919	75.081	75%
<i>T.socranskii</i>	16967.12	28640.68	168.8011	-68.8011	-
<i>E.saburreum</i>	38153.06	17574.51	46.06317	53.93683	54%
<i>P.micros</i>	206825.4	74779.76	36.15598	63.84402	64%
<i>V.parvula</i>	1101563	587142.5	53.30086	46.69914	46%
<i>A.viscosus</i>	313971	213270.3	67.92675	32.07325	32%
<i>S.anginosus</i>	159164.9	106434.7	66.87071	33.12929	33%
<i>S.sanguis</i>	116219.5	78586.33	67.61888	32.38112	32%
<i>A.gerencseriae</i>	145976.8	107110.4	73.37495	26.62505	26%
<i>S.oralis</i>	351685.2	311826.9	88.66648	11.33352	11%
<i>C.ochracea</i>	34136.91	22954.5	67.24247	32.75753	32%
<i>A.israelii</i>	26961.87	17702.41	65.6572	34.3428	34%
<i>S.intermedius</i>	61826.06	45130.97	72.99668	27.00332	27%
<i>T.denticola</i>	10569.88	722.7199	6.83754	93.16246	93%
<i>P.nigrescens</i>	47726.68	19717.6	41.31358	58.68642	58%
<i>A.odontolyticus</i>	121722.2	47670.41	39.16328	60.83672	60%
<i>F.nuc polymo</i>	138478.6	95162.24	68.71982	31.28018	31%
<i>C.showae</i>	64736	35027.67	54.10849	45.89151	45%
<i>F.periodonticum</i>	125797.5	78449.94	62.36208	37.63792	37%
<i>N.mucosa</i>	140380	68171.96	48.56244	51.43756	51%
<i>F.nucnuc</i>	263447.8	96627.43	36.67802	63.32198	63%
<i>C.gingivalis</i>	78612.61	60369.83	76.79408	23.20592	23%
<i>S.gordonii</i>	413708.9	215251.5	52.0297	47.9703	47%
<i>T.forsythia</i>	18464.95	11780.87	63.80126	36.19874	36%
<i>S.noxia</i>	124285.7	60533.3	48.70496	51.29504	51%
<i>P.acne</i>	9098.504	6871.851	75.52726	24.47274	24%
<i>P.melaninogenica</i>	74594.25	35565.76	47.67896	52.32104	52%
<i>S.mitis</i>	197608.2	227983.3	115.3714	-15.3714	-
<i>E.corrodens</i>	73236.58	30853.28	42.12824	57.87176	57%
<i>G.morbilliorium</i>	273465.7	186336.6	68.13893	31.86107	31%
<i>C.sputigena</i>	76772.71	13725.44	17.87802	82.12198	82%
<i>L.buccalis</i>	102470	61810.16	60.32025	39.67975	39%
<i>C.gracilis</i>	176041.7	40154.03	22.80939	77.19061	77%
<i>P.intermedia</i>	81592.29	130054.7	159.3958	-59.3958	-

Planctônica 60J/cm ²	L-D-	L+D+	Sobrev.(%)	Redução(%)	
<i>A.naeslundii</i>	59478.2	43956.14	73.90294	26.09706	26%
<i>S.constellatus</i>	158566.7	184718.6	116.4927	-16.4927	-
<i>E.nodatum</i>	28093.1	14205.5	50.5658	49.4342	49%
<i>P.gingivalis</i>	41130.73	10228.11	24.86732	75.13268	75%
<i>A.a</i>	27216.48	5762.097	21.17135	78.82865	78%
<i>F.nuc vican</i>	147503	19209.29	13.02298	86.97702	87%
<i>C.rectus</i>	78049.65	6831.007	8.75213	91.24787	91%
<i>T.socranskii</i>	41081.37	12361.88	30.09121	69.90879	70%
<i>E.saburreum</i>	27512.32	35530.41	129.1436	-29.1436	-
<i>P.micros</i>	143473.8	81544.42	56.83576	43.16424	43%
<i>V.parvula</i>	1274469	354531.7	27.81799	72.18201	72%
<i>A.viscosus</i>	244113.7	207348.5	84.93931	15.06069	15%
<i>S.anginosus</i>	231532.6	239675.9	103.5171	-3.51713	-
<i>S.sanguis</i>	97623.08	138211.9	141.5771	-41.5771	-
<i>A.gerencseriae</i>	155436.1	102004.5	65.62472	34.37528	34%
<i>S.oralis</i>	594523.4	343927.2	57.84923	42.15077	42%
<i>C.ochracea</i>	51015.43	16637.05	32.6118	67.3882	67%
<i>A.israelii</i>	43981.16	32888.82	74.77934	25.22066	25%
<i>S.intermedius</i>	115995.8	138736.2	119.6045	-19.6045	-
<i>T.denticola</i>	25833.35	6811.772	26.36813	73.63187	73%
<i>P.nigrescens</i>	93983.23	9024.098	9.60182	90.39818	90%
<i>A.odontolyticus</i>	76951.66	66499.95	86.41782	13.58218	13%
<i>F.nuc polymo</i>	150891.5	32639.24	21.63093	78.36907	78%
<i>C.showae</i>	50089.63	6084.911	12.14805	87.85195	87%
<i>F.periodonticum</i>	186519.5	28989.32	15.54225	84.45775	84%
<i>N.mucosa</i>	119058.7	82567.99	69.35066	30.64934	30%
<i>F.nucnuc</i>	250147.8	91031.15	36.39095	63.60905	63%
<i>C.gingivalis</i>	61026.69	105655.7	173.1303	-73.1303	-
<i>S.gordonii</i>	321068.6	296819.4	92.44735	7.55265	7%
<i>T.forsythia</i>	13325.6	9310.026	69.86572	30.13428	30%
<i>S.noxia</i>	52585.88	37604.88	71.51136	28.48864	28%
<i>P.acne</i>	25711.24	14563.49	56.6425	43.3575	43%
<i>P.melaninogenica</i>	93221.5	62326.42	66.85842	33.14158	33%
<i>S.mitis</i>	387681.4	264741.4	68.28839	31.71161	31%
<i>E.corrodens</i>	32422.08	23615.14	72.8366	27.1634	27%
<i>G.morbillorium</i>	265900.3	372939.9	140.2555	-40.2555	-
<i>C.sputigena</i>	16570.52	14287.51	86.22246	13.77754	13%
<i>L.buccalis</i>	64274.97	101067.4	157.2422	-57.2422	-
<i>C.gracilis</i>	261097.3	27016.54	10.34731	89.65269	89%
<i>P.intermedia</i>	65552.07	44904.25	68.50165	31.49835	31%

Biofilme 30J/cm ²	L-D-	L+D+	Sobrev.(%)	Redução(%)	
<i>A.naeslundii</i>	92287.43	93409.45	101.21579	-1.21579	-
<i>S.constellatus</i>	198371.4	197488.4	99.55488	0.44512	0.4
<i>E.nodatum</i>	31611.4	33431.15	105.75663	-5.75663	-
<i>P.gingivalis</i>	41706.41	49729.39	119.2368	-19.2368	-
<i>A.a</i>	63423.36	48141.44	75.9049	24.0951	24%
<i>F.nuc vican</i>	124904.4	154647.3	123.81253	-23.81253	-
<i>C.rectus</i>	17328.43	15801.34	91.18737	8.81263	8%
<i>T.socranskii</i>	18400.45	12291.01	66.79733	33.20267	33%
<i>E.saburreum</i>	40654.38	41287.87	101.55823	-1.55823	-
<i>P.micros</i>	290258.2	337753.9	116.36326	-16.36326	-
<i>V.parvula</i>	1.13186E6	1.25395E6	110.78657	-10.78657	-
<i>A.viscosus</i>	369486.4	333149.9	90.16567	9.83433	9.8%
<i>S.anginosus</i>	168434.6	202705.6	120.34677	-20.34677	-
<i>S.sanguis</i>	145153.7	144097.2	99.27215	0.72785	-
<i>A.gerencseriae</i>	53776.5	64536.23	120.00824	-20.00824	-
<i>S.oralis</i>	203607.1	234326.1	115.08739	-15.08739	-
<i>C.ochracea</i>	25754.91	33087.3	128.46987	-28.46987	-
<i>A.israelii</i>	32256.15	30462.13	94.43821	5.56179	5.5%
<i>S.intermedius</i>	122015.5	100552.6	82.40969	17.59031	17.6%
<i>T.denticola</i>	11893.48	13014.34	109.42416	-9.42416	-
<i>P.nigrescens</i>	36108.96	32023.61	88.68605	11.31395	11.3%
<i>A.odontolyticus</i>	64265.1	50017.45	77.82988	22.17012	22.1%
<i>F.nuc polymo</i>	66153.54	108333	163.75994	-63.75994	-
<i>C.showae</i>	20184.76	21644.77	107.23323	-7.23323	-
<i>F.periodonticum</i>	40786.3	59687.39	146.34176	-46.34176	-
<i>N.mucosa</i>	119574.6	111794.2	93.49327	6.50673	6.5%
<i>F.nucnuc</i>	68874.46	119453.5	173.43657	-73.43657	-
<i>C.gingivalis</i>	17591.47	24230.07	137.73761	-37.73761	-
<i>S.gordonii</i>	440208.5	396020.2	89.96196	10.03804	10%
<i>T.forsythia</i>	17371.29	21632.62	124.53088	-24.53088	-
<i>S.noxia</i>	55006.24	67296.19	122.34283	-22.34283	-
<i>P.acne</i>	8785.119	6010.474	68.41653	31.58347	31.5%
<i>P.melaninogenica</i>	37207.46	39703.09	106.70734	-6.70734	-
<i>S.mitis</i>	100106.4	92846.72	92.74804	7.25196	7.2%
<i>E.corrodens</i>	27482.93	29439.62	107.11966	-7.11966	-
<i>G.morbilliorium</i>	79963.07	140152.1	175.27103	-75.27103	-
<i>C.sputigena</i>	22061.41	25353.73	114.92343	-14.92343	-
<i>L.buccalis</i>	78370.94	68104.73	86.90049	13.09951	13%
<i>C.gracilis</i>	5740.768	13336.1	232.30515	-132.305	-
<i>P.intermedia</i>	75962.58	100158.8	131.85281	-31.85281	-

Biofilme 60J/cm ²	L-D-	L+D+	Sobrev.(%)	Redução(%)	
<i>A.naeslundii</i>	34948.92	35937.49	102.8286	-2.82861	-
<i>S.constellatus</i>	58269.79	63592.45	109.1345	-9.13451	-
<i>E.nodatum</i>	21558.77	29108.2	135.0179	-35.0179	-
<i>P.gingivalis</i>	37766.6	40475.5	107.1727	-7.17274	-
<i>A.a</i>	32016.61	31523.29	98.45917	1.54083	1.5%
<i>F.nuc vican</i>	81111.62	91710.55	113.0671	-13.0671	-
<i>C.rectus</i>	13296.9	16382.01	123.2017	-23.2017	-
<i>T.socranskii</i>	13590.31	0	0	100	100%
<i>E.saburreum</i>	28230.22	33247.81	117.7738	-17.7738	-
<i>P.micros</i>	219286.1	285131.6	130.0272	-30.0272	-
<i>V.parvula</i>	871475.9	987399.2	113.302	-13.302	-
<i>A.viscosus</i>	96676.26	115764.1	119.7441	-19.7441	-
<i>S.anginosus</i>	85071.8	75713.93	89.00003	10.99997	11%
<i>S.sanguis</i>	33926.49	31969.15	94.23064	5.76936	5.7%
<i>A.gerencseriae</i>	67759.46	62849.46	92.75378	7.24622	7.2%
<i>S.oralis</i>	77296.28	137344.8	177.6862	-77.6862	-
<i>C.ochracea</i>	57448.97	33372.91	58.0914	41.9086	42%
<i>A.israelii</i>	19353.04	17674.31	91.32576	8.67424	8.6%
<i>S.intermedius</i>	58541.21	46259.07	79.01967	20.98033	21%
<i>T.denticola</i>	10518.09	9858.808	93.73192	6.26808	6.2%
<i>P.nigrescens</i>	48538.51	42641.08	87.85	12.15	12%
<i>A.odontolyticus</i>	34880.78	40115.38	115.0071	-15.0071	-
<i>F.nuc polymo</i>	44707.2	54823.04	122.6269	-22.6269	-
<i>C.showae</i>	28486.65	26806.36	94.10148	5.89852	5.8%
<i>F.periodonticum</i>	43993.98	40989.41	93.1705	6.8295	6.8%
<i>N.mucosa</i>	59478.13	88924.91	149.5086	-49.5086	-
<i>F.nucnuc</i>	109667.7	100733.7	91.85357	8.14643	8%
<i>C.gingivalis</i>	65317.14	44774.17	68.54888	31.45112	31.4%
<i>S.gordonii</i>	65398.13	50393.3	77.05618	22.94382	23%
<i>T.forsythia</i>	17129.27	18436.21	107.6299	-7.62986	-
<i>S.noxia</i>	94684.58	52175.28	55.10431	44.89569	44.8%
<i>P.acne</i>	24762.23	18890.34	76.28691	23.71309	23.7%
<i>P.melaninogenica</i>	37176.8	37836.13	101.7735	-1.7735	-
<i>S.mitis</i>	72033.82	56871.43	78.95101	21.04899	21%
<i>E.corrodens</i>	80365.81	40052.09	49.83723	50.16277	50%
<i>G.morbilliorium</i>	102733.2	61972.03	60.32327	39.67673	39.6%
<i>C.sputigena</i>	30056.28	22268.65	74.08984	25.91016	26%
<i>L.buccalis</i>	64993.59	53180.69	81.82452	18.17548	18%
<i>C.gracilis</i>	58695.67	35645.71	60.72971	39.27029	39%
<i>P.intermedia</i>	44062.73	55797.86	126.6328	-26.6328	-

Apêndice 3 – Análise estatística dos experimentos em fase planctônica no parâmetro de 30J/cm²

Experimento em fase Planctônica (30 J/cm²)
Média de Sobrevivência (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.L-D-	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
2.L-D+	5	91.8880	33.42588	14.94851	50.3843	133.3917	57.83	135.00
3.L+D-	5	98.7180	35.83160	16.02438	54.2272	143.2088	66.01	154.41
4. L+D+	5	29.4800	27.48419	12.29130	-4.6461	63.6061	.85	67.56
5.L-D+(₂₅)	5	41.1840	14.30252	6.39628	23.4251	58.9429	23.71	54.41
Total	25	72.2540	39.10335	7.82067	56.1129	88.3951	.85	154.41

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	23253.189	4	5813.297	8.648
Within Groups	13444.543	20	672.227	
Total	36697.732	24		

In one-way ANOVA, the total variation is partitioned into two components.

1. Between Groups: represents variation of the group means around the overall mean.

2. Within Groups represents variation of the individual scores around their respective group means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sobrevivência

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Grupos	(J) Grupos	Lower Bound				Upper Bound	
Tukey HSD	1.00	2.00	8.11200	16.39789	.987	-40.9566	57.1806
		3.00	1.28200	16.39789	1.000	-47.7866	50.3506
		4.00	70.52000*	16.39789	.003	21.4514	119.5886
		5.00	58.81600*	16.39789	.014	9.7474	107.8846
	2.00	1.00	-8.11200	16.39789	.987	-57.1806	40.9566
		3.00	-6.83000	16.39789	.993	-55.8986	42.2386
		4.00	62.40800*	16.39789	.009	13.3394	111.4766
		5.00	50.70400*	16.39789	.041	1.6354	99.7726
	3.00	1.00	-1.28200	16.39789	1.000	-50.3506	47.7866
		2.00	6.83000	16.39789	.993	-42.2386	55.8986
		4.00	69.23800*	16.39789	.003	20.1694	118.3066
		5.00	57.53400*	16.39789	.017	8.4654	106.6026
	4.00	1.00	-70.52000*	16.39789	.003	-119.5886	-21.4514
		2.00	-62.40800*	16.39789	.009	-111.4766	-13.3394
		3.00	-69.23800*	16.39789	.003	-118.3066	-20.1694
		5.00	-11.70400	16.39789	.951	-60.7726	37.3646
	5.00	1.00	-58.81600*	16.39789	.014	-107.8846	-9.7474
		2.00	-50.70400*	16.39789	.041	-99.7726	-1.6354
		3.00	-57.53400*	16.39789	.017	-106.6026	-8.4654
		4.00	11.70400	16.39789	.951	-37.3646	60.7726
Bonferroni	1.00	2.00	8.11200	16.39789	1.000	-43.5971	59.8211
		3.00	1.28200	16.39789	1.000	-50.4271	52.9911
		4.00	70.52000*	16.39789	.003	18.8109	122.2291
		5.00	58.81600*	16.39789	.018	7.1069	110.5251
	2.00	1.00	-8.11200	16.39789	1.000	-59.8211	43.5971
		3.00	-6.83000	16.39789	1.000	-58.5391	44.8791
		4.00	62.40800*	16.39789	.011	10.6989	114.1171
		5.00	50.70400	16.39789	.057	-1.0051	102.4131
	3.00	1.00	-1.28200	16.39789	1.000	-52.9911	50.4271
		2.00	6.83000	16.39789	1.000	-44.8791	58.5391
		4.00	69.23800*	16.39789	.004	17.5289	120.9471
		5.00	57.53400*	16.39789	.022	5.8249	109.2431
	4.00	1.00	-70.52000*	16.39789	.003	-122.2291	-18.8109
		2.00	-62.40800*	16.39789	.011	-114.1171	-10.6989
		3.00	-69.23800*	16.39789	.004	-120.9471	-17.5289
		5.00	-11.70400	16.39789	1.000	-63.4131	40.0051
	5.00	1.00	-58.81600*	16.39789	.018	-110.5251	-7.1069
		2.00	-50.70400	16.39789	.057	-102.4131	1.0051
		3.00	-57.53400*	16.39789	.022	-109.2431	-5.8249
		4.00	11.70400	16.39789	1.000	-40.0051	63.4131

*. The mean difference is significant at the .05 level.

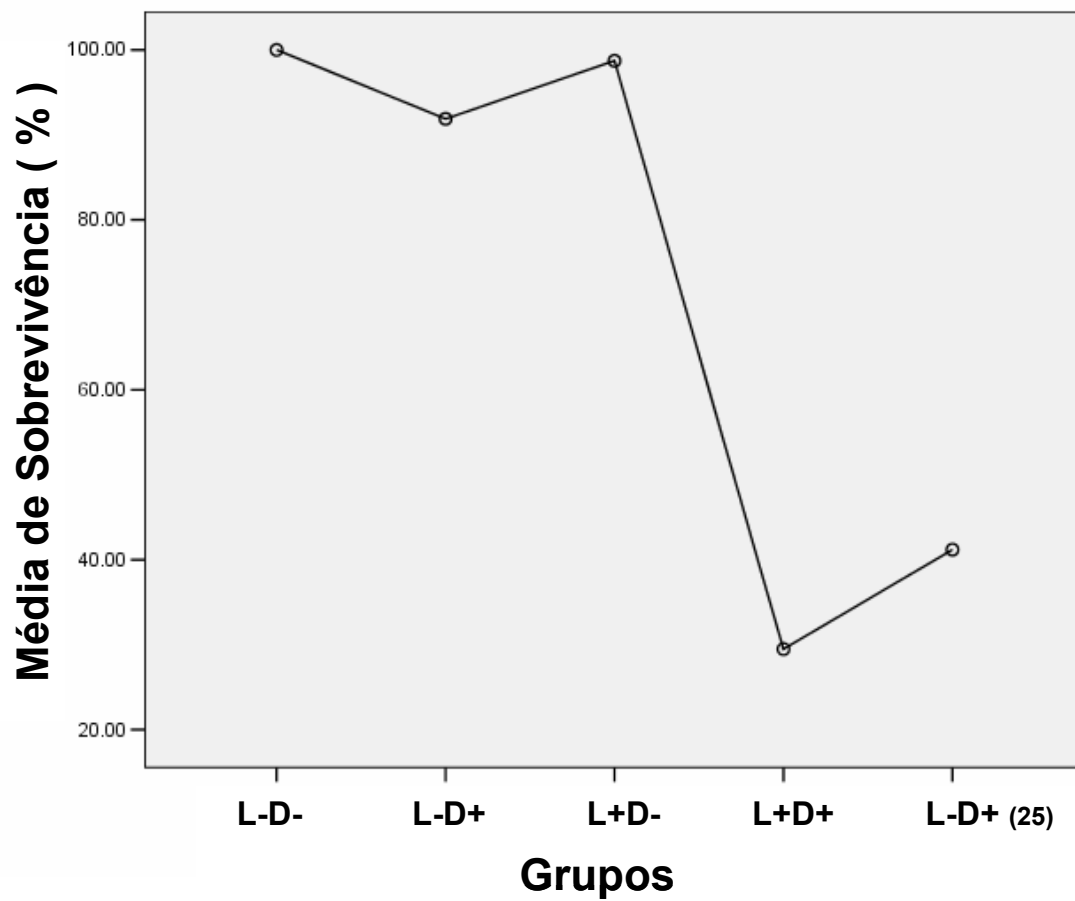
Homogeneous Subsets

Sobrevivência

Grupos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a 4.00	5	29.4800	
5.00	5	41.1840	
2.00	5		91.8880
3.00	5		98.7180
1.00	5		100.0000
Sig.		.951	.987

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.



Fase planctônica utilizando a fluência de 30 J/cm²

Apêndice 4 – Análise estatística dos experimentos em fase planctônica no parâmetro de 60J/cm²

Experimento em fase Planctônica (60 J/cm²)
Média de Sobrevivência (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.L-D-	7	100.0000	.000000	.000000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
2.L-D+	7	69.3571	31.18568	11.78708	40.5152	98.1991	16.64	115.27
3.L+D-	7	75.8100	16.53284	6.24883	60.5197	91.1003	43.20	90.64
4. L+D+	7	19.7829	11.89119	4.49445	8.7853	30.7804	4.65	36.11
5.L-D+(25)	7	30.1071	16.79911	6.34947	14.5706	45.6437	7.01	54.29
Total	35	59.0114	34.77759	5.87849	47.0649	70.9579	4.65	115.27

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	31105.391	4	7776.348	23.290
Within Groups	10016.950	30	333.898	
Total	41122.341	34		

In one-way ANOVA, the total variation is partitioned into two components.

1. Between Groups: represents variation of the group means around the overall mean.

2. Within Groups represents variation of the individual scores around their respective group means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sobrevivência

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Grupos	(J) Grupos	Lower Bound				Upper Bound	
Tukey HSD	1.00	2.00	30.64286*	9.76727	.029	2.3118	58.9739
		3.00	24.19000	9.76727	.123	-4.1410	52.5210
		4.00	80.21714*	9.76727	.000	51.8861	108.5482
		5.00	69.89286*	9.76727	.000	41.5618	98.2239
	2.00	1.00	-30.64286*	9.76727	.029	-58.9739	-2.3118
		3.00	-6.45286	9.76727	.963	-34.7839	21.8782
		4.00	49.57429*	9.76727	.000	21.2433	77.9053
		5.00	39.25000*	9.76727	.003	10.9190	67.5810
	3.00	1.00	-24.19000	9.76727	.123	-52.5210	4.1410
		2.00	6.45286	9.76727	.963	-21.8782	34.7839
		4.00	56.02714*	9.76727	.000	27.6961	84.3582
		5.00	45.70286*	9.76727	.001	17.3718	74.0339
	4.00	1.00	-80.21714*	9.76727	.000	-108.5482	-51.8861
		2.00	-49.57429*	9.76727	.000	-77.9053	-21.2433
		3.00	-56.02714*	9.76727	.000	-84.3582	-27.6961
		5.00	-10.32429	9.76727	.827	-38.6553	18.0067
	5.00	1.00	-69.89286*	9.76727	.000	-98.2239	-41.5618
		2.00	-39.25000*	9.76727	.003	-67.5810	-10.9190
		3.00	-45.70286*	9.76727	.001	-74.0339	-17.3718
		4.00	10.32429	9.76727	.827	-18.0067	38.6553
Bonferroni	1.00	2.00	30.64286*	9.76727	.038	1.0500	60.2357
		3.00	24.19000	9.76727	.191	-5.4029	53.7829
		4.00	80.21714*	9.76727	.000	50.6243	109.8100
		5.00	69.89286*	9.76727	.000	40.3000	99.4857
	2.00	1.00	-30.64286*	9.76727	.038	-60.2357	-1.0500
		3.00	-6.45286	9.76727	1.000	-36.0457	23.1400
		4.00	49.57429*	9.76727	.000	19.9814	79.1671
		5.00	39.25000*	9.76727	.004	9.6571	68.8429
	3.00	1.00	-24.19000	9.76727	.191	-53.7829	5.4029
		2.00	6.45286	9.76727	1.000	-23.1400	36.0457
		4.00	56.02714*	9.76727	.000	26.4343	85.6200
		5.00	45.70286*	9.76727	.001	16.1100	75.2957
	4.00	1.00	-80.21714*	9.76727	.000	-109.8100	-50.6243
		2.00	-49.57429*	9.76727	.000	-79.1671	-19.9814
		3.00	-56.02714*	9.76727	.000	-85.6200	-26.4343
		5.00	-10.32429	9.76727	1.000	-39.9171	19.2686
	5.00	1.00	-69.89286*	9.76727	.000	-99.4857	-40.3000
		2.00	-39.25000*	9.76727	.004	-68.8429	-9.6571
		3.00	-45.70286*	9.76727	.001	-75.2957	-16.1100
		4.00	10.32429	9.76727	1.000	-19.2686	39.9171

*. The mean difference is significant at the .05 level.

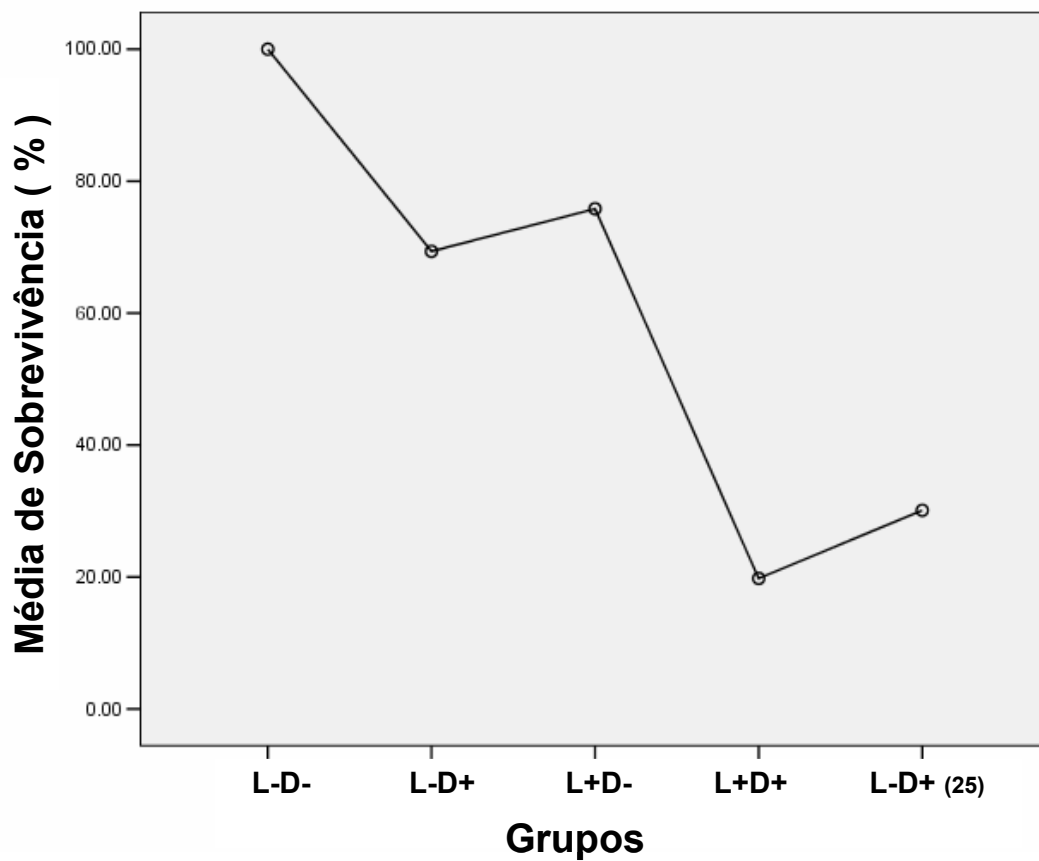
Homogeneous Subsets

Sobrevivência

	Grupos	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	4.00	7	19.7829		
	5.00	7	30.1071		
	2.00	7		69.3571	
	3.00	7		75.8100	75.8100
	1.00	7			100.0000
	Sig.		.827	.963	.123

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.



Fase planctônica utilizando a fluência de 60 J/cm²

Apêndice 5 – Análise estatística dos experimentos em biofilme no parâmetro de 30 J/cm²

Experimento em Biofilme (30 J/cm²)
Média de Sobrevivência (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.L-D-	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
2.L-D+	5	88.2240	14.18334	6.34298	70.6131	105.8349	69.73	101.84
3.L+D-	5	103.2740	11.67222	5.21997	88.7810	117.7670	91.26	116.00
4. L+D+	5	72.9880	26.21075	11.72180	40.4431	105.5329	45.54	112.90
5.L-D ⁺ ₍₂₅₎	5	96.1480	8.35978	3.73861	85.7680	106.5280	83.42	106.77
6.L+D ⁺ ₍₂₅₎	5	91.6860	9.57327	4.28130	79.7992	103.5728	80.49	104.76
Total	30	92.0533	16.25689	2.96809	85.9829	98.1238	45.54	116.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2920.524	5	584.105	2.955	.032
Within Groups	4743.779	24	197.657		
Total	7664.303	29			

In one-way ANOVA, the total variation is partitioned into two components.

1. Between Groups: represents variation of the group means around the overall mean.

2. Within Groups represents variation of the individual scores around their respective group means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sobrevivência

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Grupos	(J) Grupos	Lower Bound				Upper Bound	
Tukey HSD	1.00	2.00	11.77600	8.89174	.769	-15.7166	39.2686
		3.00	-3.27400	8.89174	.999	-30.7666	24.2186
		4.00	27.01200	8.89174	.056	-.4806	54.5046
		5.00	3.85200	8.89174	.998	-23.6406	31.3446
		6.00	8.31400	8.89174	.933	-19.1786	35.8066
	2.00	1.00	-11.77600	8.89174	.769	-39.2686	15.7166
		3.00	-15.05000	8.89174	.549	-42.5426	12.4426
		4.00	15.23600	8.89174	.537	-12.2566	42.7286
		5.00	-7.92400	8.89174	.945	-35.4166	19.5686
		6.00	-3.46200	8.89174	.999	-30.9546	24.0306
	3.00	1.00	3.27400	8.89174	.999	-24.2186	30.7666
		2.00	15.05000	8.89174	.549	-12.4426	42.5426
		4.00	30.28600*	8.89174	.025	2.7934	57.7786
		5.00	7.12600	8.89174	.964	-20.3666	34.6186
		6.00	11.58800	8.89174	.780	-15.9046	39.0806
	4.00	1.00	-27.01200	8.89174	.056	-54.5046	.4806
		2.00	-15.23600	8.89174	.537	-42.7286	12.2566
		3.00	-30.28600*	8.89174	.025	-57.7786	-2.7934
		5.00	-23.16000	8.89174	.135	-50.6526	4.3326
		6.00	-18.69800	8.89174	.319	-46.1906	8.7946
	5.00	1.00	-3.85200	8.89174	.998	-31.3446	23.6406
		2.00	7.92400	8.89174	.945	-19.5686	35.4166
		3.00	-7.12600	8.89174	.964	-34.6186	20.3666
		4.00	23.16000	8.89174	.135	-4.3326	50.6526
		6.00	4.46200	8.89174	.996	-23.0306	31.9546
	6.00	1.00	-8.31400	8.89174	.933	-35.8066	19.1786
		2.00	3.46200	8.89174	.999	-24.0306	30.9546
		3.00	-11.58800	8.89174	.780	-39.0806	15.9046
		4.00	18.69800	8.89174	.319	-8.7946	46.1906
		5.00	-4.46200	8.89174	.996	-31.9546	23.0306

Bonferroni	1.00	2.00	11.77600	8.89174	1.000	-17.1967	40.7487
		3.00	-3.27400	8.89174	1.000	-32.2467	25.6987
		4.00	27.01200	8.89174	.085	-1.9607	55.9847
		5.00	3.85200	8.89174	1.000	-25.1207	32.8247
		6.00	8.31400	8.89174	1.000	-20.6587	37.2867
	2.00	1.00	-11.77600	8.89174	1.000	-40.7487	17.1967
		3.00	-15.05000	8.89174	1.000	-44.0227	13.9227
		4.00	15.23600	8.89174	1.000	-13.7367	44.2087
		5.00	-7.92400	8.89174	1.000	-36.8967	21.0487
		6.00	-3.46200	8.89174	1.000	-32.4347	25.5107
	3.00	1.00	3.27400	8.89174	1.000	-25.6987	32.2467
		2.00	15.05000	8.89174	1.000	-13.9227	44.0227
		4.00	30.28600*	8.89174	.035	1.3133	59.2587
		5.00	7.12600	8.89174	1.000	-21.8467	36.0987
		6.00	11.58800	8.89174	1.000	-17.3847	40.5607
	4.00	1.00	-27.01200	8.89174	.085	-55.9847	1.9607
		2.00	-15.23600	8.89174	1.000	-44.2087	13.7367
		3.00	-30.28600*	8.89174	.035	-59.2587	-1.3133
		5.00	-23.16000	8.89174	.233	-52.1327	5.8127
		6.00	-18.69800	8.89174	.692	-47.6707	10.2747
	5.00	1.00	-3.85200	8.89174	1.000	-32.8247	25.1207
		2.00	7.92400	8.89174	1.000	-21.0487	36.8967
		3.00	-7.12600	8.89174	1.000	-36.0987	21.8467
		4.00	23.16000	8.89174	.233	-5.8127	52.1327
		6.00	4.46200	8.89174	1.000	-24.5107	33.4347
	6.00	1.00	-8.31400	8.89174	1.000	-37.2867	20.6587
		2.00	3.46200	8.89174	1.000	-25.5107	32.4347
		3.00	-11.58800	8.89174	1.000	-40.5607	17.3847
		4.00	18.69800	8.89174	.692	-10.2747	47.6707
		5.00	-4.46200	8.89174	1.000	-33.4347	24.5107

*. The mean difference is significant at the .05 level.

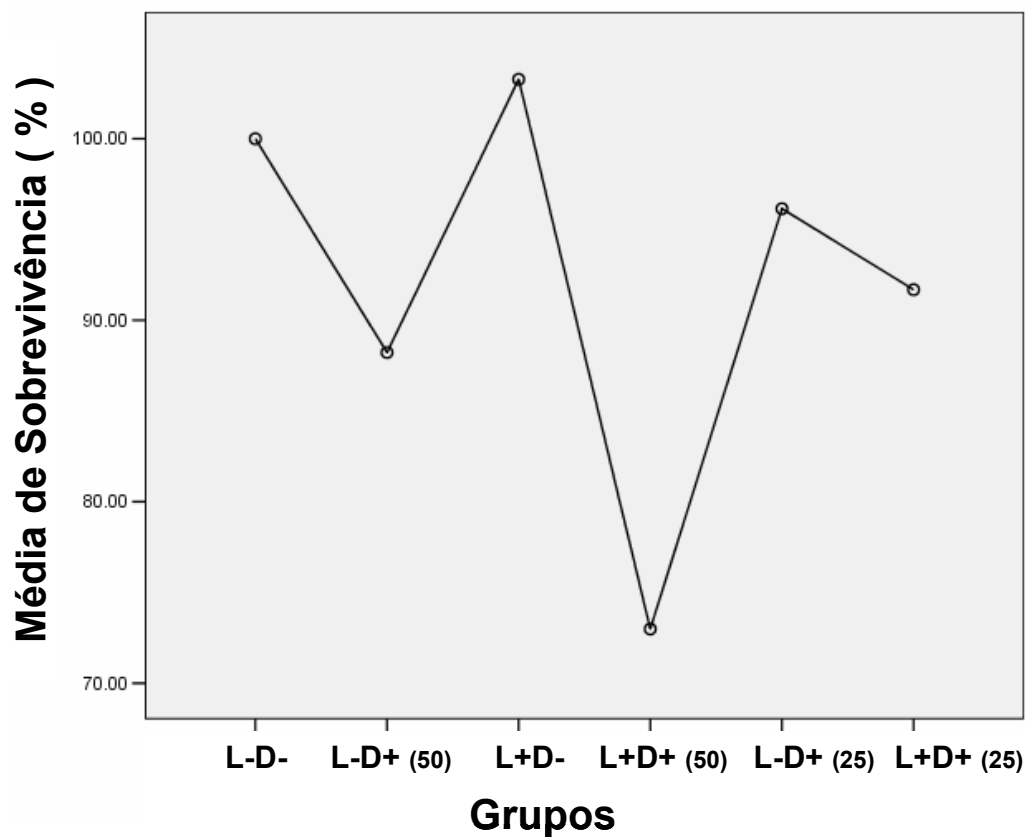
Homogeneous Subsets

Sobrevivência

Grupos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a 4.00	5	72.9880	
2.00	5	88.2240	88.2240
6.00	5	91.6860	91.6860
5.00	5	96.1480	96.1480
1.00	5	100.0000	100.0000
3.00	5		103.2740
Sig.		.056	.549

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.



Experimento em Biofilme utilizando a fluência de 30 J/cm²

Apêndice 6 – Análise estatística dos experimentos em biofilme no parâmetro de 60 J/cm²

Experimento em Biofilme (60 J/cm²)
Média de Sobrevivência (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.L-D-	4	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
2.L-D+	4	77.9125	11.19438	5.59719	60.0997	95.7253	66.11	90.20
3.L-D-	4	84.5225	33.26252	16.63126	31.5944	137.4506	62.05	134.00
4. L-D+	4	59.5800	14.72457	7.36229	36.1499	83.0101	42.34	77.70
5.L-D ⁺ ₍₂₅₎	4	87.8600	13.10373	6.55187	67.0090	108.7110	72.71	102.00
6.L-D ⁺ ₍₂₅₎	4	71.5750	15.75489	7.87745	46.5054	96.6446	55.50	87.39
Total	24	80.2417	20.32575	4.14898	71.6589	88.8245	42.34	134.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3896.787	5	779.357	2.503	.069
Within Groups	5605.340	18	311.408		
Total	9502.128	23			

In one-way ANOVA, the total variation is partitioned into two components.

1. Between Groups: represents variation of the group means around the overall mean.

2. Within Groups represents variation of the individual scores around their respective group means.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sobrevivência

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	2.00	22.08750	12.47814	.507	-17.5685	61.7435
		3.00	15.47750	12.47814	.812	-24.1785	55.1335
		4.00	40.42000*	12.47814	.044	.7640	80.0760
		5.00	12.14000	12.47814	.921	-27.5160	51.7960
		6.00	28.42500	12.47814	.253	-11.2310	68.0810
	2.00	1.00	-22.08750	12.47814	.507	-61.7435	17.5685
		3.00	-6.61000	12.47814	.994	-46.2660	33.0460
		4.00	18.33250	12.47814	.687	-21.3235	57.9885
		5.00	-9.94750	12.47814	.964	-49.6035	29.7085
		6.00	6.33750	12.47814	.995	-33.3185	45.9935
	3.00	1.00	-15.47750	12.47814	.812	-55.1335	24.1785
		2.00	6.61000	12.47814	.994	-33.0460	46.2660
		4.00	24.94250	12.47814	.380	-14.7135	64.5985
		5.00	-3.33750	12.47814	1.000	-42.9935	36.3185
		6.00	12.94750	12.47814	.899	-26.7085	52.6035
	4.00	1.00	-40.42000*	12.47814	.044	-80.0760	-.7640
		2.00	-18.33250	12.47814	.687	-57.9885	21.3235
		3.00	-24.94250	12.47814	.380	-64.5985	14.7135
		5.00	-28.28000	12.47814	.257	-67.9360	11.3760
		6.00	-11.99500	12.47814	.924	-51.6510	27.6610
	5.00	1.00	-12.14000	12.47814	.921	-51.7960	27.5160
		2.00	9.94750	12.47814	.964	-29.7085	49.6035
		3.00	3.33750	12.47814	1.000	-36.3185	42.9935
		4.00	28.28000	12.47814	.257	-11.3760	67.9360
		6.00	16.28500	12.47814	.779	-23.3710	55.9410
	6.00	1.00	-28.42500	12.47814	.253	-68.0810	11.2310
		2.00	-6.33750	12.47814	.995	-45.9935	33.3185
		3.00	-12.94750	12.47814	.899	-52.6035	26.7085
		4.00	11.99500	12.47814	.924	-27.6610	51.6510
		5.00	-16.28500	12.47814	.779	-55.9410	23.3710

Bonferroni	1.00	2.00	22.08750	12.47814	1.000	-20.0931	64.2681
		3.00	15.47750	12.47814	1.000	-26.7031	57.6581
		4.00	40.42000	12.47814	.068	-1.7606	82.6006
		5.00	12.14000	12.47814	1.000	-30.0406	54.3206
		6.00	28.42500	12.47814	.527	-13.7556	70.6056
	2.00	1.00	-22.08750	12.47814	1.000	-64.2681	20.0931
		3.00	-6.61000	12.47814	1.000	-48.7906	35.5706
		4.00	18.33250	12.47814	1.000	-23.8481	60.5131
		5.00	-9.94750	12.47814	1.000	-52.1281	32.2331
		6.00	6.33750	12.47814	1.000	-35.8431	48.5181
	3.00	1.00	-15.47750	12.47814	1.000	-57.6581	26.7031
		2.00	6.61000	12.47814	1.000	-35.5706	48.7906
		4.00	24.94250	12.47814	.914	-17.2381	67.1231
		5.00	-3.33750	12.47814	1.000	-45.5181	38.8431
		6.00	12.94750	12.47814	1.000	-29.2331	55.1281
	4.00	1.00	-40.42000	12.47814	.068	-82.6006	1.7606
		2.00	-18.33250	12.47814	1.000	-60.5131	23.8481
		3.00	-24.94250	12.47814	.914	-67.1231	17.2381
		5.00	-28.28000	12.47814	.540	-70.4606	13.9006
		6.00	-11.99500	12.47814	1.000	-54.1756	30.1856
	5.00	1.00	-12.14000	12.47814	1.000	-54.3206	30.0406
		2.00	9.94750	12.47814	1.000	-32.2331	52.1281
		3.00	3.33750	12.47814	1.000	-38.8431	45.5181
		4.00	28.28000	12.47814	.540	-13.9006	70.4606
		6.00	16.28500	12.47814	1.000	-25.8956	58.4656
	6.00	1.00	-28.42500	12.47814	.527	-70.6056	13.7556
		2.00	-6.33750	12.47814	1.000	-48.5181	35.8431
		3.00	-12.94750	12.47814	1.000	-55.1281	29.2331
		4.00	11.99500	12.47814	1.000	-30.1856	54.1756
		5.00	-16.28500	12.47814	1.000	-58.4656	25.8956

*. The mean difference is significant at the .05 level.

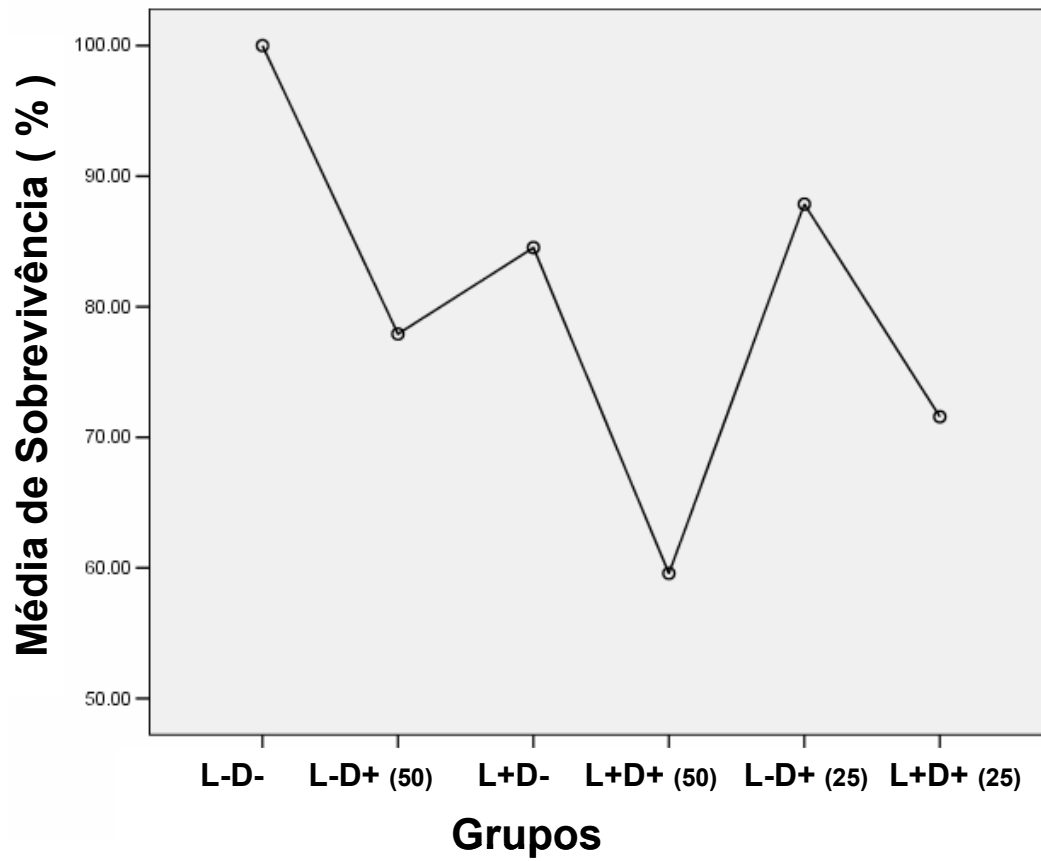
Homogeneous Subsets

Sobrevivência

Grupos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a 4.00	4	59.5800	
6.00	4	71.5750	71.5750
2.00	4	77.9125	77.9125
3.00	4	84.5225	84.5225
5.00	4	87.8600	87.8600
1.00	4		100.0000
Sig.		.257	.253

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Experimento em Biofilme utilizando a fluência de 60 J/cm²

Apêndice 7 - Forsyth Institutional Review Board approval



THE FORSYTH INSTITUTE

A World Force in Science and Health

W www.forsyth.org

Dr. Richard Pharo
Chair, Forsyth IRB
The Forsyth Institute
140 The Fenway
Boston, MA 02115

Dear Dr. Pharo:

I write regarding Forsyth Institutional Review Board (IRB) approval for a proposed research project entitled "Photoinactivation of dental plaque bacteria."

My intent is to investigate the effects of photodynamic therapy *in vitro* on the microbial composition of subgingival plaque samples obtained from subjects with chronic periodontitis. My hypothesis is that the combination of a photosensitizing drug and light will completely eradicate periodontopathogenic bacteria. The significance of these results is that photodynamic therapy may prove to be useful in preventing or treating periodontal disease.

Briefly, dental plaque samples will be obtained from patients and will be split in two parts. The first part will be used for testing the antibacterial effects of photodynamic therapy in planktonic phase. The second part will be used to make microbial biofilms (using a technique developed in my laboratory), which will undergo photodynamic treatment 6-7 days later. These experiments will define the appropriate drug and light parameters for bacterial inactivation in both planktonic and biofilm phase.

My intent for this project, if advisable, is to use the Forsyth Research Consent (attached). I will collect up to 10 subgingival plaque samples from patients with chronic periodontitis using standard clinical methods. All of the subjects will be enrolled in on-going Forsyth treatment studies. The plaque samples will be provided to my laboratory unaccompanied by any confidential patient information. At the bench, each sample will be divided into two parts. All of the laboratory analysis will use only numbers. During data analysis, subjects will be coded by number only. No identifying information that contains any protected health information will be provided to the laboratory or associated in any way with the laboratory work. Subjects will not be identified in any research publications.

The risk to all subjects is minimal. The taking of subgingival plaque samples is similar to routine procedures commonly used in dental practice for scaling and curettage and thus confers minimal risk. Inclusion criteria are the same for on-going studies of periodontitis in the Center for Periodontal Research. I do not anticipate any adverse effects on any on-going treatment studies from the collection of the subgingival plaque samples for this study. Care will be taken to minimize

F 617.262.4021

T 617.262.5200

140 The Fenway ■ Boston, Massachusetts 02115



THE FORSYTH INSTITUTE

A World Force in Science and Health

interference with all of the treatment regimes in these studies. Compensation will no be provided.

I look forward to answering any questions. As always, thank you kindly for the opportunity to insure the safety of my human subjects research.

Very Sincerely,

Nikos S. Soukos
Assisstant Member of the Staff

140 The Fenway ■ Boston, Massachusetts 02115
T 617.262.5200 F 617.262.4021 W www.forsyth.org

Apêndice 8 - Forsyth Institutional Review Board approval



THE FORSYTH INSTITUTE

Institutional Review Board

www.forsyth.org

W

F 617.262.4021

T 617.262.5200

140 The Fenway • Boston, Massachusetts 02115

October 17, 2005

Federal IRB Assurance Identification Number: FWA00000398

Dear Dr. Soukos,

Your submission to conduct research with human subjects in the study **"Photoinactivation of dental plaque bacteria"** is hereby approved. I see no issues requiring full board review.

You will have to report all plans to make changes in the research protocol and/or consent form to the IRB, and you are not to make changes without IRB approval. This requirement will be waived only if it becomes necessary for you to eliminate immediate risk to the subjects, and the IRB must be notified of these changes as quickly as possible.

The IRB would also like to remind you that subjects who do not speak English should be presented with a consent document written in a language understandable to them. Alternately, the consent form can be presented orally, with a written summary of what is orally communicated. If the form is presented orally, a translator who is fluent in both English and the language of the subject should sign the consent document.

The IRB must be advised immediately, within 5 days, of emergent problems in the use of human subjects, including significant hazards, contraindications, or side effects of procedures. The IRB will report problems and changes in protocol to Institutional, State, or Federal authorities, as necessary.

Should you decide to advertise for the purpose of recruiting subjects for this study, you will need to submit a copy of your proposed advertisement to the IRB for review and approval prior to distribution.

The last day of approval on this application is **October 16, 2006**. If this becomes an ongoing project, you must return an Annual Status Report indicating that this is a continuing project for renewed approval.

Sincerely yours,

Richard L. Pharo, ScD
Chair, Forsyth Institute IRB

Apêndice 9 - Consent Form



THE FORSYTH INSTITUTE

Principal Investigator Nikos Soukos, PhD Phone 617-892-8467
Co-Investigator Carla R. Fontana Phone 617-892-8204

Permission to use Standard Clinical Measurements and Samples for Research Subjects

CONSENT FORM

INVITATION TO PARTICIPATE You are being asked to participate in a research study called:

Photoinactivation of dental plaque bacteria

PROCEDURES You will be screened for the presence of gum disease conditions and will be asked to complete a medical and dental history form. All clinical measurements performed are those commonly used by dentists as diagnostic procedures for gum disease conditions.

Clinical Measurements and Laboratory Samples

The following clinical observations and laboratory samples **that have been marked with an X** will be taken as explained below:

- ☒ **Plaque Samples** Plaque samples will be taken from the surfaces of your teeth; this procedure uses the same instruments as are used for tooth cleaning and is generally not painful although it may feel like a little pinch.
- ☐ **Gingival Inflammation** A dental clinician will visually examine and record the extent to which your gums are red and/or swollen.
- ☐ **Gingival Fluid Samples** Fluid samples will be taken by gently inserting filter strips into the space between the gum and the tooth. This procedure is painless and the information derived from these samples will be used to identify inflammation.
- ☐ **Saliva Sample** This will be collected by spitting into a tube. The amount of saliva to be collected is ml.
- ☐ **Calculus** A dental clinician will visually assess the amount of hardened plaque that has accumulated on your teeth.
- ☐ **Stain Index** A dental clinician will visually determine the amount of stain on your teeth.
- ☐ **Plaque Index**
- ☐ **By visual examination** A study clinician will visually grade the amount of plaque adhered to the surface of your teeth. He or she may also use a dental instrument to gently scrape away some of this film.
 - ☐ **By disclosing solution** A dental clinician will ask you to either rinse with or will use a cotton swab to wipe a red solution across the surface of your teeth and then will visually grade the amount of plaque adhered to the surface of your teeth. This red solution is not permanent and is easily removed from the teeth by brushing.

Continued on next page

IRB Approved October 17, 2005
This consent form has been approved for enrollment
during the period from 10/17/05 to 10/16/06

Subject Initials