



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-BIOFOTÔNICA

CLAUDIO TERUO KASSA

**Avanços na Terapia Fotodinâmica: Estudo Comparativo dos
Fotossensibilizadores Butil Azul de Toluidina, Azul de Toluidina e Azul
de Metileno na Viabilidade, Proliferação e Incorporação Celular de
Fibroblastos – Estudo *in vitro***

São Paulo, SP

2025



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-BIOFOTÔNICA

CLAUDIO TERUO KASSA

**Avanços na Terapia Fotodinâmica: Estudo Comparativo dos
Fotossensibilizadores Butil Azul de Toluidina, Azul de Toluidina e Azul
de Metileno na Viabilidade, Proliferação e Incorporação Celular de
Fibroblastos – Estudo *in vitro***

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2025

Kassa, Claudio Teruo.

Avanços na terapia fotodinâmica: estudo comparativo dos fotossensibilizadores butil azul de toluidina, azul de toluidina e azul de metileno na viabilidade, proliferação e incorporação celular de fibroblastos – estudo in vitro. / Claudio Teruo Kassa. 2025.

81 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. Sobrevivência celular. 2. Proliferação de células. 3. Corantes.
4. Fotoquimioterapia. 5. Fármacos fotossensibilizantes. 6. Células cultivadas.

I. Prates, Renato Araujo.

II. Título.

CDU 615.831



São Paulo, 11 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Claudio Teruo Kassa

Título da Tese: “Avanços na terapia fotodinâmica: estudo comparativo de fotossensibilizadores butil azul de toluidina, azul de toluidina e azul de metileno na viabilidade, proliferação e incorporação celular de fibroblastos – estudo *in vitro*”.

Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES

Membro: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI

Membro: PROF^a. DR^a. PATRICIA APARECIDA DA ANA

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

Membro: PROF^a. DR^a. ALESSANDRA BAPTISTA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Yuzaburo e Hatsuko Kassa, pelo amor incondicional, pelo exemplo de integridade e pela força silenciosa que sustentou cada etapa da minha trajetória. Tudo o que conquistei tem raízes no que me ensinaram.

A Wéder Torres, agradeço pela companhia contínua, pela paciência e pelo apoio dedicado nas fases mais difíceis, estando ao meu lado em cada vitória, incerteza e superação.

Aos amigos do laboratório de cultivo celular, Rosani Siqueira e Alessandra Martins, pela parceria diária, pela troca de conhecimentos e pela disposição permanente em colaborar. A convivência com vocês tornou o percurso mais leve e produtivo.

Estendo minha gratidão a todos os professores do Programa de Pós-Graduação, cujas contribuições científicas e humanas enriqueceram profundamente minha formação.

Agradeço também à minha secretária, Meire Munhoz, e a secretária do Programa Adriana Carvalho, pela dedicação, organização e auxílio constante, sempre garantindo que tudo funcionasse com eficiência.

À equipe técnica do laboratório, deixo meu sincero reconhecimento pelo suporte fundamental, pela competência e pela atenção com que auxiliaram cada etapa experimental.

Finalmente, manifesto minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Araujo Prates, por sua confiança, orientação, comprometimento científico e por todos os ensinamentos que ultrapassam as fronteiras desta tese. Sua orientação foi essencial para o amadurecimento deste trabalho e para meu crescimento acadêmico.

A todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta pesquisa, deixo o meu mais sincero agradecimento.

FINANCIAMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio:

- Universidade Nove de Julho (UNINOVE) - Programa de Bolsas para a Formação do Pesquisador.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – processo: 88887.976664/2024-00.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo: 2017/20989-9.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo: 304734/2024-1.

RESUMO

Introdução: A terapia fotodinâmica antimicrobiana destaca-se como abordagem coadjuvante no controle de infecções, utilizando fotossensibilizadores que, quando ativados pela luz, geram espécies reativas de oxigênio capazes de promover dano microbiano por mecanismos não específicos, com baixa probabilidade de indução de resistência. Embora o azul de toluidina O e o azul de metileno sejam amplamente utilizados, o derivado butil azul de toluidina O apresenta maior lipofilicidade, menor citotoxicidade e maior potencial de geração de oxigênio singlete. Neste estudo, comparam-se os efeitos desses três fotossensibilizadores sobre a viabilidade, a proliferação e a incorporação celular em fibroblastos, no escuro e após a irradiação fotodinâmica.

Metodologia: A relação concentração–resposta dos fotossensibilizadores BuTBO, TBO e MB foi previamente determinada a fim de padronizar as condições experimentais e identificar as concentrações capazes de preservar a maior viabilidade e proliferação celular na ausência de luz. Para isso, células L929 foram expostas aos três corantes (0–100 μM) por 5 minutos, lavadas e analisadas no escuro, definindo-se a concentração de 25 μM para os experimentos subsequentes. Em seguida, essa concentração foi utilizada para avaliar a resposta após irradiação (660 nm, 2,4 J; 125 s). A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio de MTT e a proliferação pelo método de cristal violeta, sob as mesmas condições experimentais. A incorporação dos fotossensibilizadores (25 μM) foi analisada por fluorescência. Os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores (fotossensibilizador $\times$ concentração) e à ANOVA de uma via (fotossensibilizador), ambas seguidas do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Resultados: A exposição de 5 minutos aos fotossensibilizadores (0–100 μM) não alterou a viabilidade celular (MTT) nem a proliferação (Cristal Violeta) em 0 h e 24 h ($p > 0,05$). Após a PDT, todos os grupos apresentaram redução significativa da viabilidade em relação ao controle ($p < 0,05$). O Butil Azul de Toluidina O apresentou a menor densidade óptica ($\text{DO} \approx 0,63$) no ensaio de MTT, indicando o maior efeito citotóxico sob irradiação, enquanto o Azul de Toluidina O e o Azul de Metileno exibiram valores intermediários ($\text{DO} \approx 0,77$ e $0,80$). Não foram observadas diferenças significativas na proliferação celular entre os grupos ($p > 0,05$).

A microscopia de fluorescência evidenciou incorporação citoplasmática do BuTBO em fibroblastos L929, com padrão difuso no escuro e distribuição mais granular após a irradiação, sugerindo redistribuição intracelular. Alterações morfológicas discretas ocorreram sem perda de adesão celular, em consonância com a maior redução da atividade metabólica observada no ensaio de MTT, indicando efeito citotóxico predominantemente intracelular.

Conclusões: Após a PDT, o butil azul de toluidina O apresentou a maior redução da viabilidade metabólica em fibroblastos L929 em comparação aos demais fotossensibilizadores, mantendo a proliferação celular preservada. A detecção intracelular por microscopia de fluorescência reforça seu efeito fotodinâmico superior e seu potencial para aplicações futuras.

Descritores: sobrevivência celular, proliferação de células, corantes, fotoquimioterapia, fármacos fotossensibilizantes, células cultivadas.

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial photodynamic therapy has emerged as an adjunctive approach for infection control, employing photosensitizers that, when activated by light, generate reactive oxygen species capable of inducing microbial damage through non-specific mechanisms, with a low probability of resistance development. Although toluidine blue O and methylene blue are widely used, the butyl toluidine blue O derivative exhibits higher lipophilicity, lower cytotoxicity, and greater potential for singlet oxygen generation. This study compares the effects of these three photosensitizers on cell viability, proliferation, and cellular uptake in fibroblasts, under dark conditions and after photodynamic irradiation. **Methodology:** The concentration–response relationship of the photosensitizers BuTBO, TBO, and MB was previously determined to standardize the experimental conditions and identify concentrations capable of preserving cell viability and proliferation in the absence of light. L929 cells were exposed to the three dyes (0–100 μM) for 5 minutes, washed, and analyzed in the dark, defining 25 μM as the concentration for subsequent experiments. This concentration was then used to evaluate the response after irradiation (660 nm, 2.4 J; 125 s). Cell viability was quantified by the MTT assay and proliferation by the crystal violet method, under the same experimental conditions. Photosensitizer uptake (25 μM) was analyzed by fluorescence microscopy. Data were analyzed using two-way ANOVA (photosensitizer $\times$ concentration) and one-way ANOVA (photosensitizer), both followed by Bonferroni post hoc tests ($p < 0.05$). **Results:** A 5-minute exposure to the photosensitizers (0–100 μM) did not alter cell viability (MTT) or proliferation (crystal violet) at 0 h and 24 h ($p > 0.05$). After PDT, all groups showed a significant reduction in viability compared with the control ($p < 0.05$). Butyl toluidine blue O exhibited the lowest optical density ($\text{OD} \approx 0.63$) in the MTT assay, indicating the highest cytotoxic effect under irradiation, whereas toluidine blue O and methylene blue showed intermediate values ($\text{OD} \approx 0.77$ and 0.80). No significant differences in cell proliferation were observed among groups ($p > 0.05$). Fluorescence microscopy demonstrated cytoplasmic incorporation of BuTBO in L929 fibroblasts, with a diffuse pattern in the dark and a more granular distribution after irradiation, suggesting intracellular redistribution. Morphological changes occurred without loss of cell adhesion, consistent with the greater reduction in metabolic activity observed in the MTT assay, indicating a predominantly intracellular cytotoxic effect. **Conclusions:** After PDT, butyl toluidine blue O produced the greatest reduction in metabolic viability in L929 fibroblasts compared with the other photosensitizers, while preserving cell proliferation. Intracellular detection by fluorescence microscopy reinforces its superior photodynamic effect and its potential for future applications.

Descriptors: cell survival, cell proliferation, dyes, photochemotherapy, photosensitizing drugs, cultured cells.

DESTAQUES

O butil azul de toluidina O é um novo fotossensibilizador derivado do azul de toluidina O, com desempenho superior em comparação direta com o azul de metileno e o azul de toluidina.

O butil azul de toluidina O manteve alta citocompatibilidade e efeito fotooxidativo em concentrações clinicamente relevantes.

O butil azul de toluidina combina eficácia antimicrobiana e citocompatibilidade, consolidando sua relevância para a terapia fotodinâmica.

Os achados destacam o butil azul de toluidina O como candidato promissor para aplicações clínicas na terapia fotodinâmica antimicrobiana.

HIGHLIGHTS

Butyl toluidine blue O is a new photosensitizer derived from toluidine blue O, with superior performance in direct comparison to methylene blue and toluidine blue.

Butyl toluidine blue O maintained high cytocompatibility and photodynamic activity at clinically relevant concentrations.

Butyl toluidine blue O combines antimicrobial efficacy and cytocompatibility, merging its relevance for photodynamic therapy.

These findings highlight BuTBO as a promising candidate for clinical applications in antimicrobial photodynamic therapy.

RESUMO PARA LEIGOS

As infecções causadas por microrganismos estão ficando cada vez mais difíceis de tratar, e por isso novas estratégias vêm sendo estudadas. Uma delas é a *terapia fotodinâmica*, que combina um corante especial com luz para enfraquecer ou eliminar micróbios. Esses corantes são chamados de fotossensibilizadores.

Dois deles — o azul de metileno e o azul de toluidina — já são bastante usados há muitos anos e cada um deles é tem as suas particularidades durante o seu uso.: o azul de metileno penetra mais, age mais profundamente e gera mais efeito com a luz, enquanto o TBO atua mais superficialmente, mas ainda assim é útil em muitas aplicações. Eles têm como vantagem serem baratos, fáceis de encontrar e considerados seguros. Porém, eles também têm limitações: entram pouco dentro das células, podem se acumular mais na superfície e nem sempre atingem o efeito desejado em todas as situações clínicas. Por isso, um novo derivado chamado butil azul de toluidina O foi desenvolvido, com a ideia de torná-lo mais “gorduroso” (lipofílico) e facilitar sua entrada nas células, o que poderia aumentar sua eficiência.

Neste estudo, comparamos esses três corantes em células de laboratório para entender se são seguros e como reagem quando expostos à luz, já que isso é essencial para prever como poderiam funcionar no corpo humano.

Sem luz, todos eles mostraram ser seguros para as células, mesmo em concentrações muito altas. Quando aplicamos a luz, o butil azul de toluidina O teve o efeito mais forte sobre as células, mas sem prejudicar a capacidade delas de permanecerem firmes e unidas, o que é um sinal importante de segurança. Além disso, ele foi o único corante que conseguimos visualizar dentro das células usando um microscópio especial, o que confirma que entra melhor nelas.

Esses resultados mostram que o butil azul de toluidina O reúne características desejáveis - efeito mais potente e sinais de segurança - e, por isso, pode ser considerado um candidato promissor para estudos futuros e, quem sabe, para novas aplicações na área da saúde.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Curva de absorbância	20
Figura 2 Radical butila	21
Figura 3 Base molecular comum.	24
Figura 4 Imagens de fibroblastos L929.	28
Figura 5 Fluxograma do delineamento experimental.....	32
Figura 6 Ensaio de viabilidade (MTT) em placa de 96 poços.	34
Figura 7 Led Box.	36
Figura 8 Efeito da PDT sobre a viabilidade.....	38
Figura 9 Curva concentração-resposta no escuro.....	44
Figura 10 Proliferação celular sem irradiação.....	46
Figura 11 Viabilidade e proliferação após irradiação.....	49
Figura 12 Incorporação celular sem irradiação.....	52
Figura 13 Incorporação celular pós-irradiação.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características fotoquímicas e biológicas de MB, TBO e BuTBO.....	22
Tabela 2 Parâmetros dosimétricos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (ordem alfabética)

µg - micrograma

µM - micromolar

¹O₂ -oxigênio singlete

aPDT - terapia fotodinâmica antimicrobiana

ATCC - *American Type Culture Collection*

BuTBO - butil azul de toluidina O

cm² - centímetros quadrados

CV - cristal violeta

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - dimetilsulfóxido

DO - densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - espécies reativas de oxigênio

H0 - hipótese nula

J - joule

LED - diodo emissor de luz

MB - azul de metileno

mL - mililitro

MRONJ - osteonecrose da mandíbula relacionada a medicamentos

MTT - 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

mW - miliwatt

NCTC - *Nationla Collection of Type Cultures*

nm - nanometro

nM - nanomolar

PBS - solução salina tamponada com fosfato

pH - potencial hidrogeniônico

PS - Fotossensibilizador

s - segundo

TBO - azul de toluidina O

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

1. Contextualização	14
1.1. Terapia fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	14
1.2. Requisitos do fotossensibilizador ideal	16
2.3. Os fotossensibilizadores tradicionais e suas limitações	17
2.4. Características do Butil Azul de Toluidina O	19
1.6 Justificativa.....	23
2. Objetivo.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Metodologia.....	26
3.1 Desfecho primário	26
3.2 Desfechos secundários	26
3.3 Linhagem celular L929.....	26
3.4 Cultivo celular.....	28
3.5 Fotossensibilizador.....	29
3.6 Grupos experimentais.....	30
3.5 Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores sobre a viabilidade celular – Ensaio MTT.....	32
3.7 Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores sobre a proliferação celular – Ensaio Cristal Violeta.	35
3.8 Irradiação com luz.....	35
3.9 Microscopia de fluorescência	39
3.10 Análise estatística	40
4. Resultados	41
4.1 Curva concentração-resposta.....	41

4.2 Citocompatibilidade no escuro	45
4.3 Efeitos citotóxicos	47
4.4 Incorporação intracelular	50
5. Discussão	55
6. Conclusão.....	61
ANEXO I – Dados brutos	68
ANEXO II.....	73
Artigos publicados	73
Artigos submetidos.....	74
ANEXO III CRIS - Lista de Verificação para Relato de Estudos <i>In Vitro</i>	75
ANEXO IV. Manual de Experimentos em Cultura Celular 2023	77

1. Contextualização

A Terapia Fotodinâmica (PDT) constitui uma abordagem terapêutica inovadora que na presença de oxigênio o fotossensibilizador (PS) é ativado por luz de comprimento de onda específico, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na consequente destruição de células-alvo. Embora suas origens remontem à helioterapia na antiguidade, o conceito moderno de TFD emergiu no início do século XX, com os estudos de Raab e von Tappeiner, que demonstraram o “efeito fotodinâmico” de corantes em microrganismos sob exposição luminosa [1].

O desenvolvimento clínico da PDT avançou significativamente a partir da década de 1970, quando Dougherty e colaboradores demonstraram o acúmulo seletivo de porfirinas em tumores e relataram tratamentos bem-sucedidos em pacientes com câncer de pele [2, 3]. A comprovação do mecanismo citotóxico, mediado pelo oxigênio singlete, consolidou a relevância da TFD como modalidade terapêutica[4]. Subsequentemente, o desenvolvimento e a regulamentação de fotossensibilizadores como Photofrin® e Verteporfino® ampliaram a aplicação da técnica para oncologia, oftalmologia e dermatologia [1].

Atualmente, a PDT é reconhecida como um campo promissor, com pesquisas voltadas para novos PS que combinem eficácia fototóxica e segurança biológica. Nesse contexto, parâmetros como citocompatibilidade, comprovação da fototoxicidade e confirmação da incorporação intracelular são fundamentais para a caracterização de novos fotossensibilizadores e futura translação para ensaios clínicos randomizados e controlados.

1.1. Terapia fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é um tratamento que utiliza um fotossensibilizador, ativado por luz em um comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular, para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS são altamente citotóxicas e causam danos oxidativos a células-alvo, como células tumorais ou microrganismos, levando à sua

eliminação ou morte. É utilizada para tratar diversas condições, incluindo câncer e doenças infecciosas [5–7].

O Diagrama de Jablonski o explica como a energia luminosa é absorvida, transformada e liberada por uma molécula do fotossensibilizador - sendo essencial para compreender o mecanismo fotoquímico da terapia fotodinâmica. Inicialmente, um fotossensibilizador se liga ou se aproxima da célula-alvo. Quando essa célula marcada é exposta a uma fonte de luz, o fotossensibilizador absorve a energia luminosa e passa do seu estado fundamental para um estado excitado. Em seguida, parte dessas moléculas excitadas evolui para o estado tripleto, que pode seguir dois caminhos principais:

1. Reação Tipo I – o fotossensibilizador transfere elétrons – reação de redução - ou hidrogênios para moléculas próximas, gerando espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2\cdot^-$ (peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radical ânion superóxido respectivamente).
2. Reação Tipo II– ocorre transferência de energia diretamente para o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$).

Ambos os caminhos levam ao dano e morte celular [8].

1.2. Requisitos do fotossensibilizador ideal

O fotossensibilizador (PS) ideal, um agente essencial na terapia fotodinâmica (PDT) [9], deve apresentar diversas características otimizadas para garantir a eficácia terapêutica com segurança [10, 11].

Em termos de propriedades fotoquímicas, é essencial que o PS apresente um alto coeficiente de absorção[12], na região vermelha do espectro (630–750 nm) [13], correspondente à chamada janela terapêutica[9]. Nessa faixa espectral, os coeficientes de absorção e espalhamento dos principais constituintes teciduais, como hemoglobinas, melanina e água, são relativamente baixos, resultando em menor atenuação óptica da luz incidente. Como consequência, a irradiância que atinge o tecido é preservada ao longo de maiores profundidades, permitindo que uma fração mais significativa da energia luminosa seja absorvida pelas moléculas do fotossensibilizador presentes no tecido-alvo. Assim, o conceito de janela terapêutica não implica um aumento intrínseco da capacidade de penetração da luz, mas sim uma redução das perdas ópticas teciduais, favorecendo uma distribuição mais eficiente da energia luminosa absorvida pelo fotossensibilizador. Essa condição é fundamental para a otimização da eficácia clínica da aPDT [14].

Além disso, para maximizar a ação fotodinâmica, o PS deve apresentar um alto rendimento quântico do estado tripleto, assegurando a formação eficiente do fármaco ativado [11]. Isso se traduz em um elevado rendimento quântico de geração de oxigênio singleto ($\Phi\Delta$)[9–11], a principal espécie reativa responsável pela morte celular [9, 13]. Além disso, o PS deve ser fotoestável [11, 12] e possua um estado tripleto duradouro com energia adequada[12], condições essenciais para a produção eficaz de espécies reativas e a manutenção da atividade fotodinâmica ao longo do tratamento.

No que se refere à ação biológica e segurança, o fotossensibilizador ideal deve apresentar eficácia contra diferentes tipos de microrganismos e alta afinidade de ligação pelas células-alvo, garantindo que a ativação luminosa produza espécies reativas de oxigênio predominantemente nos patógenos. Ao mesmo tempo, o PS deve apresentar baixa toxicidade química e baixa afinidade por células eucarióticas, preservando os tecidos saudáveis. Esse equilíbrio define uma janela terapêutica estreita, caracterizada pela alta

seletividade do PS: pequenas variações na dose de luz ou na concentração do PS ainda permitem a inativação eficiente dos microrganismos, com mínimo risco para os tecidos do hospedeiro. Além disso, é desejável que o fotossensibilizador não apresente atividade mutagênica, assegurando segurança a longo prazo em aplicações clínicas [10, 11].

Embora nenhum composto atualmente reúna todas essas propriedades, avanços contínuos têm procurado superar essas limitações[15–17] e ampliar o uso clínico da terapia fotodinâmica.

1.3. Os fotossensibilizadores tradicionais e suas limitações

O azul de metileno (MB) e a azul de toluidina O (TBO) são fotossensibilizadores amplamente utilizados em terapia fotodinâmica (TFD), com eficácia clínica bem estabelecida. Ambos apresentam estrutura molecular plana que aumenta a tendência à agregação em solução e lipofilicidade moderada[17], características que podem modular a distribuição tecidual e a eficiência na geração de oxigênio singleto [18–20]. Apesar de compartilharem a estrutura fenotiazínica, esses corantes apresentam diferenças relevantes em seu comportamento fotoquímico e farmacocinético.

Embora o MB seja amplamente utilizado em PDT, sua eficácia em tecidos vivos e em microambientes confinados, como biofilmes, pode apresentar variabilidade [21]. A eficiência fotoquímica do MB depende de sua localização no tecido ou célula, uma vez que a distribuição do sensibilizador pode influenciar suas propriedades tanto na forma estável da molécula (estado fundamental) quanto após a absorção de luz (estado excitado) [21].

Apesar de ambos os compostos compartilharem a capacidade de induzir estresse oxidativo — considerando que TBO e MB atuam predominantemente como fotossensibilizadores do Tipo II e como geradores de espécies reativas via mecanismos redutivos - suas ações intracelulares apresentam distinções mecanísticas relevantes. Conforme descrito por Wainwright et al. (1998; 1999), o azul de metileno destaca-se por sua capacidade de intercalar-se ao DNA, promovendo quebras nas fitas decorrentes da oxidação de resíduos de guanossina [22]. Em contraste, o azul de toluidina tem sido mais frequentemente associado ao comprometimento da integridade de membranas bacterianas e à

sua localização preferencial em mitocôndrias, especialmente relatada em determinados modelos de células tumorais [22]. Embora tanto o dano ao DNA quanto o comprometimento de membranas ou mitocôndrias resultem em morte celular, a escolha entre essas vias depende da seletividade desejada e do tipo de organismo alvo. O MB, ao atuar diretamente no DNA, promove uma letalidade definitiva, sendo especialmente eficaz na inativação viral e na desinfecção de hemoderivados. Em contraste, o TBO exerce ação preferencial sobre membranas e mitocôndrias, induzindo rápida desorganização estrutural e colapso bioenergético. Assim, MB e TBO, apesar de estruturalmente relacionados, apresentam locais de ação primária distintos que orientam sua aplicação na PDT conforme o contexto biológico [22, 23].

Estudos *in vitro* demonstraram que o azul de metileno (MB) e o azul de toluidina O (TBO), mesmo na ausência de luz, apresentaram efeito antimicrobiano [24, 25]. Wilson et al. (1993) observaram que o azul de metileno (MB) apresentou maior eficácia do que a azul de toluidina O (TBO) contra *Fusobacterium nucleatum* [25], enquanto Usacheva et al. (2001) relataram que o MB exibiu atividade fotobactericida superior à do TBO contra *Staphylococcus aureus* 6538 [24]. Esses achados evidenciam diferenças na atividade antimicrobiana e na eficiência fotoquímica entre esses fotossensibilizadores.

A geração de oxigênio singlete pelo azul de metileno é altamente eficiente, apresentando um elevado rendimento quântico ($\Phi_{\Delta} \approx 0,5$) em solução isotrópica [21]. Diversos estudos relatam que o MB é um fotossensibilizador mais eficaz na produção de $^1\text{O}_2$ do que o azul de toluidina O (TBO), em diferentes formulações *in vitro* [26].

O azul de toluidina O (TBO) e outros corantes catiônicos da classe das fenotiazinas, como o MB, tendem a formar agregados moleculares, como dímeros, devido à sua estrutura planar como citado anteriormente. Essa agregação é evidenciada no espectro de absorção aquoso pela presença de uma banda secundária, ou ombro (Fig. 1), em comprimentos de onda menores que o λ_{max} – pico máximo de luz, indicativa de espécies agregadas [27].

Kömerik et al. (2022) investigaram a distribuição do TBO em aplicação tópica na mucosa de ratos e demonstraram intensa fluorescência do corante no epitélio, a qual diminuía progressivamente em direção às camadas mais

profundas, não sendo observada fluorescência no tecido conjuntivo subjacente. Mesmo com o aumento do tempo de contato do TBO com a mucosa, não houve penetração significativa em toda a espessura epitelial, evidenciando limitações na difusão do corante em tecidos mais profundos. [28].

A síntese química de novos compostos análogos a fotossensibilizadores clássicos, como o azul de metileno e o azul de toluidina O, é relativamente simples e economicamente viável, configurando uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas moléculas com propriedades fotofísicas e fotobiológicas aprimoradas [27]. Esse enfoque permite explorar modificações estruturais que podem otimizar a viabilidade, a incorporação tecidual e a eficiência fotoquímica, superando limitações observadas nos corantes convencionais [15, 16].

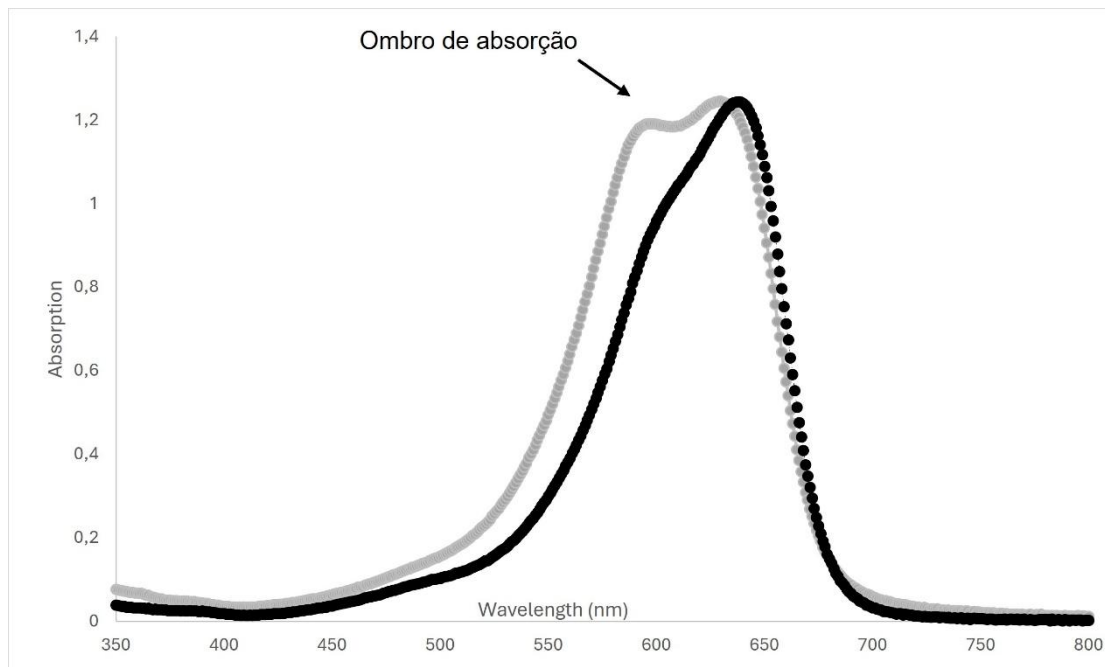
1.4. Características do Butil Azul de Toluidina O

A partir dessas buscas, foi desenvolvido o butil azul de toluidina O (BuTBO). O BuTBO é um fotossensibilizador da família das fenotiazinas, desenvolvido por meio de modificações físico-químicas na estrutura do azul de toluidina O (TBO). Nessa modificação, o grupo metil ($-\text{CH}_3$) presente na posição 2 do cromóforo foi substituído por um grupo terciário butil ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$). Essa alteração foi realizada pelo processo de síntese, no qual a 2-metilanilina utilizada na síntese convencional do TBO foi substituída por 2-(tert-butil)anilina [27].

A estrutura molecular do BuTBO apresenta alterações significativas em relação ao TBO, como aumento do comprimento de onda de absorção na região visível – 637 nm (Fig. 1) – e redução da agregação molecular, atribuída ao volumoso grupo substituinte terciário butil (Fig. 2). A molécula resultante exibiu propriedades fotodinâmicas aprimoradas, incluindo maior produção de oxigênio singlete, essencial para a eficácia da aPDT. Além disso, demonstrou atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) e atividade antifúngica contra *Candida albicans* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 μM [27].

Figura 1 Curva de absorbância

Curvas de absorbância dos fotossensibilizadores BuTBO (linha preta) e TBO (linha cinza). Observa-se no TBO a presença de um ombro de absorção na região de 600–630 nm, característico de bandas secundárias que acompanham o pico principal.

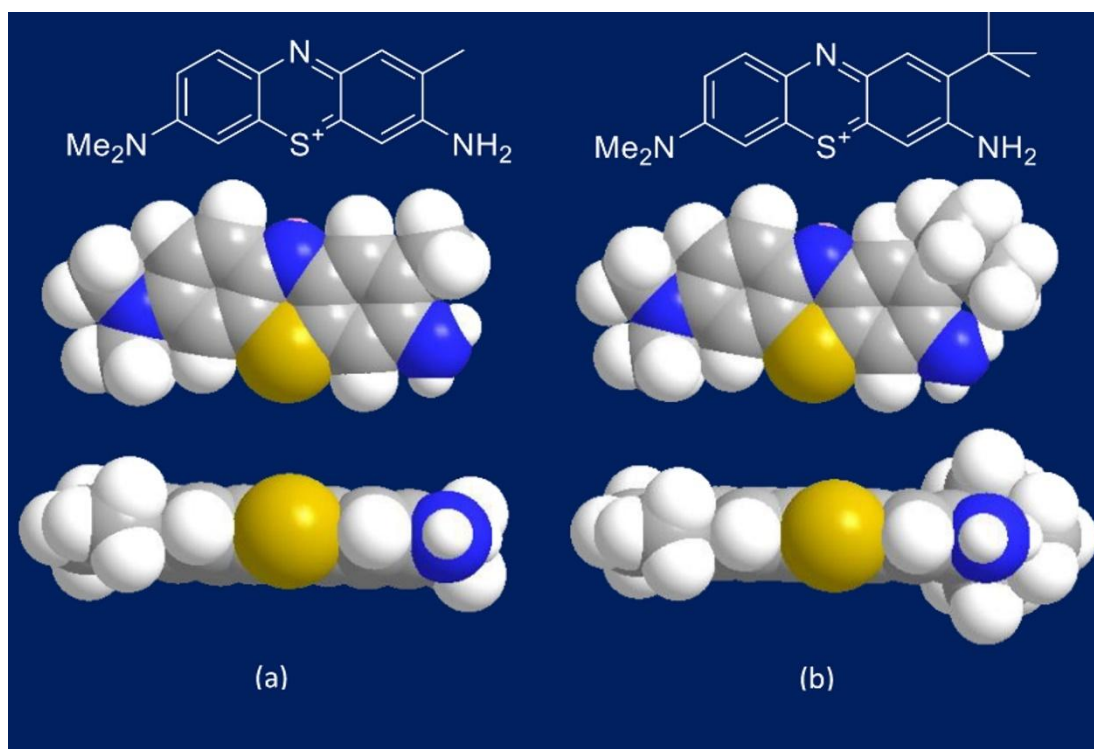


Adaptado de Wainwright, 2016

O BuTBO também se mostrou eficaz como agente antisséptico de uso tópico, apresentando atividade superior a compostos convencionais, como clorexidina, cetilpiridínio e triclosan. Esse desempenho superior é atribuído ao aumento da lipofilicidade e à menor tendência das moléculas à agregação, decorrentes de sua estrutura molecular, que minimiza a dimerização do fotossensibilizador (Fig. 2). Essa característica evita o bloqueio da passagem de luz, permitindo uma conversão mais eficiente da energia luminosa em efeito fotooxidativo. [27].

Figura 2 Radical butila

O radical butila do BuTBO aumentou assimetricamente o volume da molécula (b) em comparação a molécula do TBO (a)



Fonte: Wainwright, 2016

A introdução de um radical butila na estrutura fenotiazínica aumenta substancialmente a lipofilicidade da molécula, conferindo propriedades farmacológicas relevantes em comparação ao TBO e ao MB (Tabela 1). A lipofilicidade elevada favorece a interação com membranas biológicas, ampliando a capacidade de atravessamento da membrana plasmática e o

acúmulo intracelular - um fator determinante tanto para a eficiência fotodinâmica quanto para a toxicidade intrínseca. Enquanto o TBO e o MB apresentam log P negativos (-0,21 e -0,10, respectivamente) [22], indicando caráter predominantemente hidrofílico, o BuTBO exibe log P positivo (+0,84) [27], refletindo afinidade muito maior por ambientes lipídico. Essa característica facilita o acesso do fotossensibilizador a compartimentos subcelulares críticos, como mitocôndrias, onde a geração de espécies reativas de oxigênio exerce impacto biológico mais profundo. Assim, fotossensibilizadores mais lipofílicos tendem a agir de forma mais concentrada nos locais onde se acumulam - geralmente regiões ricas em membranas — o que resulta em um efeito mais direcionado após a irradiação [22]. Além disso, costumam apresentar uma diferença mais pronunciada entre o efeito observado com luz e o efeito observado no escuro, isto é, tornam-se muito mais ativos quando irradiados do que quando permanecem sem luz, característica desejável para maximizar a ação terapêutica e minimizar efeitos indesejados. Assim, a maior lipofilicidade do BuTBO não apenas diferencia sua distribuição celular em relação ao TBO e ao MB, mas também pode explicar, em parte, seu comportamento fotodinâmico superior e sua capacidade de incorporação detectável nas condições experimentais avaliadas.

Tabela 1 Características fotoquímicas e biológicas de MB, TBO e BuTBO

Característica	MB	TBO	BuTBO	Referência
Comprimento de Onda de Absorção Máxima (λ_{max})	655 nm (em etanol)	627 nm (em etanol)	637 nm (em metanol)	Bacellar, 2013; Wainwright, 2019; Wainwright, 2016
Lipofilicidade (log P)	-0,10	-0,21	+0,84	Bacellar, 2013; Wainwright, 1999; Wainwright, 2016
Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete	0,52 (em etanol)	0,44 (em etanol)	0,78 (aprox.)	Bacellar, 2013; Wainwright, 2016
Tendência a agregação	Apresenta agregação, formando dímeros do tipo H. Relação M/A de 2.0 (em água).	Apresenta agregação, exibindo metacromasia	Agregação diminuída em comparação com o TBO devido ao substituinte terc-butila volumoso.	Bacellar, 2013; Wainwright, 2016
Toxicidade em Células MDR (sem luz, IC 50)	72,0 μ M	30,0 μ M	8,5 μ M	Wainwright, 1999
Eficácia Fotobactericida (MBC) (Ex: <i>P. aeruginosa</i>)	25 μ M	7,36 μ M	0,39 μ M	Wainwright, 2016

Nuernberg (2019) avaliou diferentes concentrações de BuTBO em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) para otimizar a resposta inflamatória e o reparo tecidual em periodontite experimental em ratos, concluindo que 1.200 μM proporcionou os melhores resultados. Theodoro *et al.* (2021) compararam aPDT mediada por BuTBO, azul de metileno e azul de toluidina, todos a 1.200 μM , no controle da perda óssea alveolar e da inflamação em ratos Wistar machos, observando superioridade do BuTBO. Ervolino *et al.* (2022) demonstraram que aPDT mediada por BuTBO a 1.200 μM preveniu lesões de osteonecrose relacionadas a medicamentos após extrações dentárias em ratas fêmeas senis. Coletivamente, esses estudos evidenciam o potencial do BuTBO em terapias odontológicas para melhorar a cicatrização e reduzir a inflamação em condições desafiadoras [10, 29, 30].

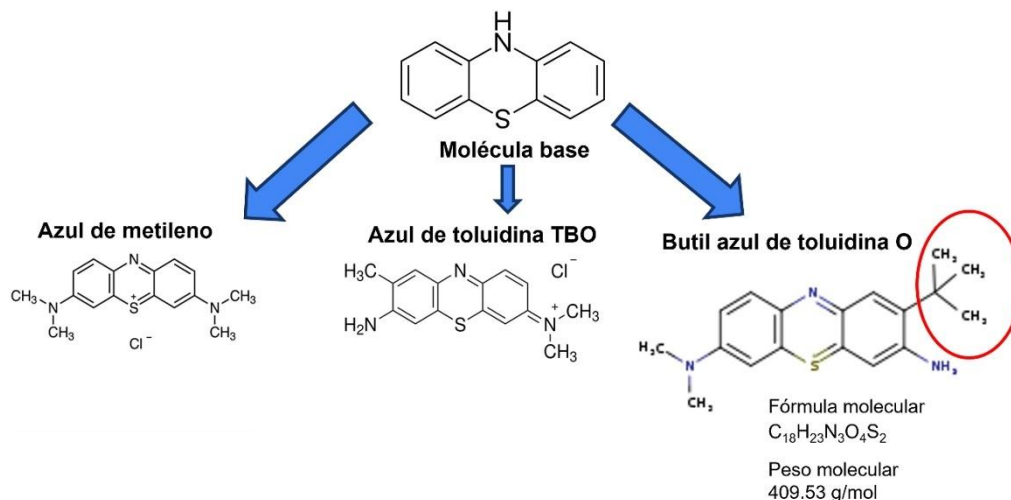
1.6 Justificativa

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de eliminar microrganismos resistentes sem comprometer tecidos saudáveis representa um desafio central na odontologia e na medicina [6]. Os fotossensibilizadores desempenham papel crucial na terapia fotodinâmica, determinando seletividade, penetração tecidual e eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio.

O butil azul de toluidina O, derivado do azul de toluidina O, apresenta maior lipofilicidade, tendência reduzida à agregação quando em solução e potencial aumentado de geração de oxigênio singlete, atributos que podem ampliar sua eficácia fotodinâmica; embora MB e TBO pertençam à mesma família fenotiazínica (Fig. 3), cada um possui particularidades em sua ação fotoquímica e antimicrobiana, tornando o estudo comparativo mais amplo e abrangente ao utilizar ambos como referência.

Figura 3 Base molecular comum.

Os três fotossensibilizadores compartilhando da mesma base molecular. O grupo butila em destaca no círculo vermelho



Fonte: Wainwright, 2016 (modificado)

O estudo do BuTBO se justifica pela necessidade de desenvolver fotossensibilizadores mais eficientes do que os corantes fenotiazínicos atualmente disponíveis, cuja eficácia é limitada por baixa lipofilicidade, alta agregação e rendimento fotodinâmico subótimo. Modificações estruturais como as presentes no BuTBO têm potencial para aumentar a captação celular, reduzir a agregação e melhorar a produção de oxigênio singlete, resultando em maior desempenho antimicrobiano, especialmente frente a patógenos de maior resistência. Assim, o BuTBO representa uma alternativa promissora para superar as limitações do MB e do TBO, justificando plenamente sua investigação como candidato a fotossensibilizador de nova geração.

Apesar de estudos prévios avaliarem a atividade antimicrobiana e efeitos modulatórios sobre o processo inflamatório *in vivo* da terapia fotodinâmica mediada pelo BuTBO [26, 29], ainda não há dados sobre sua interação com células eucarióticas.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo comparar a viabilidade, a proliferação e a incorporação celular em fibroblastos L929 expostos a BuTBO, TBO e MB, tanto em condições de escuro quanto após ativação com LED vermelho.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Comparar os efeitos dos fotossensibilizadores butil azul de toluidina O (BuTBO), azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (MB) sobre a viabilidade, proliferação e incorporação em fibroblastos L929 no escuro e sob irradiação de luz.

2.2. Objetivos específicos

Determinar a relação concentração–resposta dos fotossensibilizadores BuTBO, TBO e MB na ausência de luz, identificando as condições que preservem a maior viabilidade e proliferação celular.

Avaliar os efeitos fotooxidativo dos fotossensibilizadores sob irradiação luminosa, através dos ensaios de MTT e cristal violeta, na concentração previamente definidas como citocompatíveis.

Analisar, por microscopia de fluorescência, a incorporação dos fotossensibilizadores nos fibroblastos.

3. Metodologia

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do Manual para Elaboração de Experimentação em Cultura Celular (2023) do Programa de Pós-graduação em Medicina-Biofotônica da Universidade Nove de Julho (Anexo III) e em conformidade com o *Checklist for Reporting In-Vitro Studies* (CRIS – Anexo IV), a fim de garantir padronização, transparência e reprodutibilidade dos dados [39].

3.1 Desfecho primário

Variação das densidades ópticas obtidas nos ensaios de viabilidade celular (MTT) e proliferação (cristal violeta) após o contato dos fibroblastos L929 com os fotossensibilizadores BuTBO, TBO e MB, tanto antes quanto após a ativação dos mesmos pela irradiação com LED vermelho.

3.2 Desfechos secundários

A concentração de cada fotossensibilizador associada à maior viabilidade e proliferação celular na ausência de luz (citocompatibilidade).

Avaliar a eficácia dos fotossensibilizadores em causar redução da viabilidade e proliferação celular após irradiação, expressa em relação ao grupo controle, permitindo determinar o potencial citotóxico

Identificar, qualitativamente, a incorporação dos fotossensibilizadores pelos fibroblastos por microscopia de fluorescência.

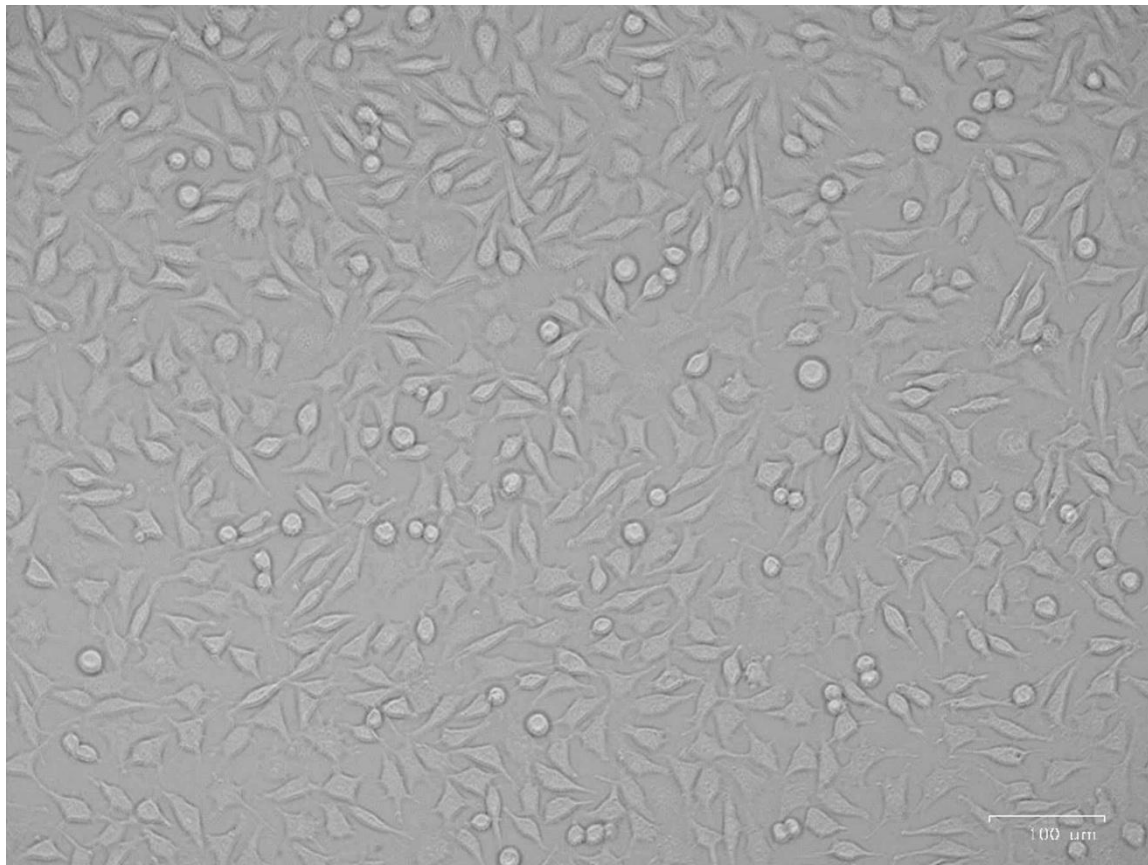
3.3 Linhagem celular L929

Foi utilizada a linhagem NCTC clone 929 (L cell, L-929) (Fig.4), derivada do tecido conjuntivo de camundongo (*Mus musculus*), considerada o primeiro clone estabelecido a partir da linhagem L e uma das primeiras linhagens celulares mantidas em cultura contínua [31–34] e referências em normas internacionais [35]. Essa linhagem é amplamente empregada em estudos de citotoxicidade e avaliação de efeitos fotodinâmicos devido à sua estabilidade, reprodutibilidade e capacidade de representar fibroblastos de tecidos

saudáveis, permitindo análise controlada da citocompatibilidade, efeito fotoxidativo e incorporação de fotossensibilizadores.

O estudo com células L929, tanto no escuro quanto sob irradiação, se justifica principalmente por complementar os dados *in vivo* de trabalhos anteriores [10, 29, 30], fornecendo evidências adicionais da segurança e dos efeitos celulares dos fotossensibilizadores observados nos tecidos (14). Permite ainda a avaliação direta da resposta celular, medindo de forma controlada a viabilidade, proliferação e incorporação intracelular induzidas por BuTBO, TBO e MB. Além disso, os fibroblastos L929 serve como modelo de células saudáveis, representando fibroblastos semelhantes aos tecidos avaliados *in vivo*, e oferece reprodutibilidade, sendo uma linhagem homogênea e bem caracterizada para estudos de compatibilidade celular, garantindo consistência nos experimentos (14–18).

Figura 4 Imagens de fibroblastos L929. Confluência de 80% alcançada após 24h de incubação em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino. Escala 100 µM.



Fonte: acervo pessoal

3.4 Cultivo celular

As células foram cultivadas de acordo com as orientações da ATCC e do Manual para elaboração de estudos pré-clínicos – UNINOVE 2023. Parte das células estão estocadas em ambiente à -80°C e outra estão congeladas em nitrogênio líquido. Um tubo criogênico contendo 1×10^{-6} células foi descongelado previamente em banho-maria a 37°C por 1 min, as células assim descongeladas foram transferidas para um tubo cônico plástico contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementadas a 10% com soro fetal bovino (*Hyclone*, Thermo Scientific, Logan, Ut, EUA) para neutralização da substância crioprotetora (dimetilsulfóxido – DMSO) e centrifugadas a 284 g por 5 min em temperatura ambiente [40].

O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótico-antimicótica (penicilina-estreptomicina a 10 nM e 2,5 µg de anfotericina-B) e pH= 7,4. As células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm² com 15 mL de meio de cultura e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até alcançarem confluência de 80 a 90%. O tempo de confluência para as células L-929 foi em torno de 48 h [41] .

Para o subcultivo celular, o meio foi removido e as células aderentes em monocamada foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1 X -140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,4) sem cálcio e magnésio. Foi adicionado 4 mL de tripsina e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil) por 5 min a 37°C para remoção das células. Após esse período, procedeu-se à agitação suave do frasco de cultivo e à verificação da desadesão celular ao microscópio invertido. Para a neutralização da tripsina as células foram colocadas em tubo cônico plástico com 5 mL de meio suplementado com soro fetal bovino e centrifugadas a 285 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 1 mL do meio foi adicionado, as células em suspensão foram divididas e semeadas em garrafas de cultivo celular (75 cm²), que foram previamente colocadas na incubadora. Para que a viabilidade das células fosse preservada, a troca de meio de cultura dos frascos foi realizada a cada dois dias. Alíquotas dessa cultura foram congeladas e mantidas primeiramente em ambiente a -80°C e após alguns dias transferidas para o tambor com nitrogênio líquido para manter estoque da linhagem [32, 42].

Antes de cada ensaio, a viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,5%) em hemocitômetro sendo utilizadas nos ensaios somente as culturas com viabilidade maior que 95% [42, 43].

3.5 Fotossensibilizador

O butil azul de toluidina, em sua forma pura, foi obtido conforme procedimento de síntese previamente descrito por Wainwright, 2016 [27]. O azul de metileno e o azul de toluidina foram adquiridos em grau analítico provenientes da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Para os três

fotossensibilizadores, preparou-se inicialmente uma solução-estoque a 10 mM em água deionizada estéril, previamente filtrada em membrana de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil), acondicionada em microtubos protegidos da luz. Para uso experimental, 10 µL da solução-estoque foram diluídos em 990 µL de PBS (pH 7,2), originando as soluções a 100 µM. Para os ensaios conduzidos a 25 µM, a diluição foi realizada imediatamente antes da aplicação: 250 µL da solução a 100 µM foram diluídas em 750 µL de PBS (pH 7,2), obtendo-se 1,0 mL do fotossensibilizador a 25 µM. Esse mesmo procedimento foi aplicado aos três fotossensibilizadores, assegurando que as soluções nas concentrações de 100 µM e 25 µM fossem preparadas de forma padronizada para todos os ensaios.

3.6 Grupos experimentais

O fluxograma da Figura 5 sintetiza o delineamento adotado para investigar a citocompatibilidade, a citotoxicidade e a incorporação dos fotossensibilizadores BuTBO, TBO e MB em fibroblastos murinas L929. As células foram inicialmente semeadas em densidade de 2×10^4 células por poço e mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, assegurando condições adequadas de proliferação celular antes da exposição aos corantes.

Após o período de 24 h após a semedura, as células aderidas foram tratadas com BuTBO, TBO ou MB e mantidas em contato com cada fotossensibilizador por 5 minutos, seguido da remoção completa do sobrenadante e três lavagens sucessivas com PBS. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicatas independentes.

O delineamento foi estruturado em duas fases experimentais distintas: fase sem irradiação, destinada à caracterização da citocompatibilidade; e fase com irradiação, conduzida para avaliar a fototoxicidade após a ativação fotodinâmica e em ambas foi verificada a incorporação dos fotossensibilizadores pelos fibroblastos.

Na fase sem irradiação, foram investigados os efeitos diretos dos fotossensibilizadores sobre a viabilidade e a proliferação das células. Três abordagens principais foram conduzidas:

1. Curva concentração–resposta (0–100 μM): quantificação da viabilidade celular por MTT imediatamente após o contato com os fotossensibilizadores e 24 h após a remoção do sobrenadante, lavagem com PBS e recolocação de meio de cultura suplementado fresco.
2. Proliferação celular (0–100 μM): avaliação complementar pelo ensaio de cristal violeta para identificar potenciais efeitos citostáticos, quantificando alterações na aderência e na densidade celular após a exposição aos fotossensibilizadores.
3. Incorporação intracelular (25 μM): análise por microscopia de fluorescência, utilizada por permitir a visualização direta da captação e da distribuição intracelular, confirmando a presença do composto no interior das células no momento da avaliação.

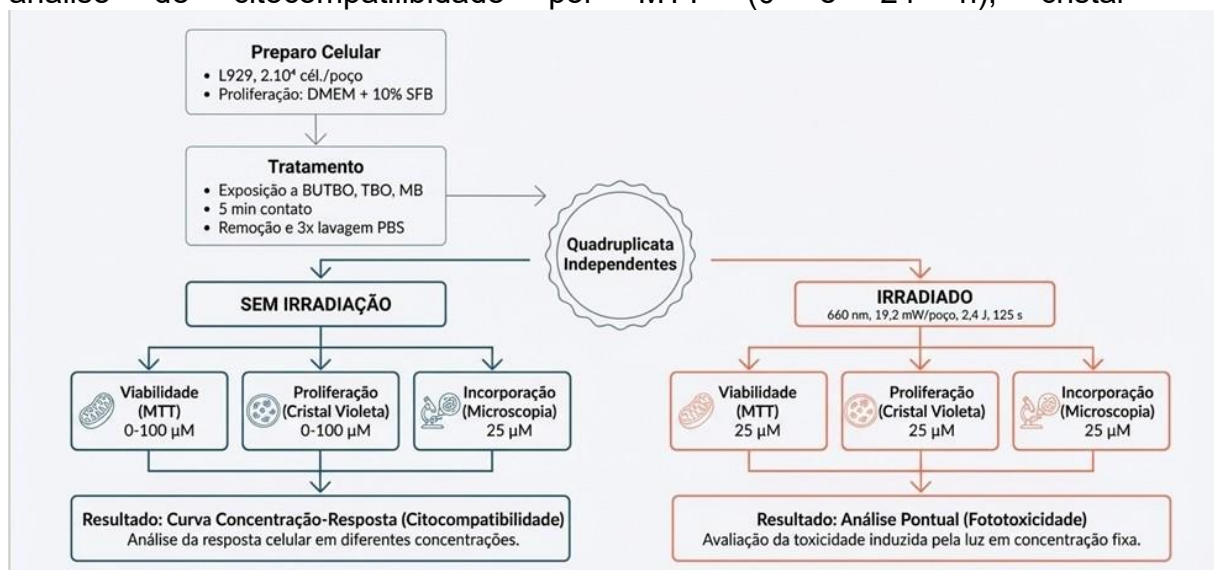
Na fase com irradiação, após o contato com os fotossensibilizadores, as placas foram submetidas à iluminação com LED com comprimento de onda de 660 nm, aplicando-se 19,2 mW por poço, totalizando 2,4 J durante 125 segundos. Essa fase foi estruturada para caracterizar o efeito fotodinâmico dos corantes sobre as células L929.

Foram realizadas três análises:

1. Viabilidade (25 μM): quantificada por MTT para determinar a citotoxicidade induzida pela ativação luminosa.
2. Proliferação (25 μM): avaliação da capacidade proliferativa após o estresse fotodinâmico quantificada pelo ensaio do cristal violeta.
3. Incorporação intracelular (25 μM): confirmação da presença dos fotossensibilizadores no momento da irradiação por microscopia de fluorescência.

Figura 5 Fluxograma do delineamento experimental

Células L929 (2×10^4 /poço) foram expostas aos fotossensibilizadores por 5 min, lavadas e distribuídas em duas fases experimentais: sem irradiação, com análise de citocompatibilidade por MTT (0 e 24 h), cristal



3.5 Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores sobre a viabilidade celular – Ensaio MTT

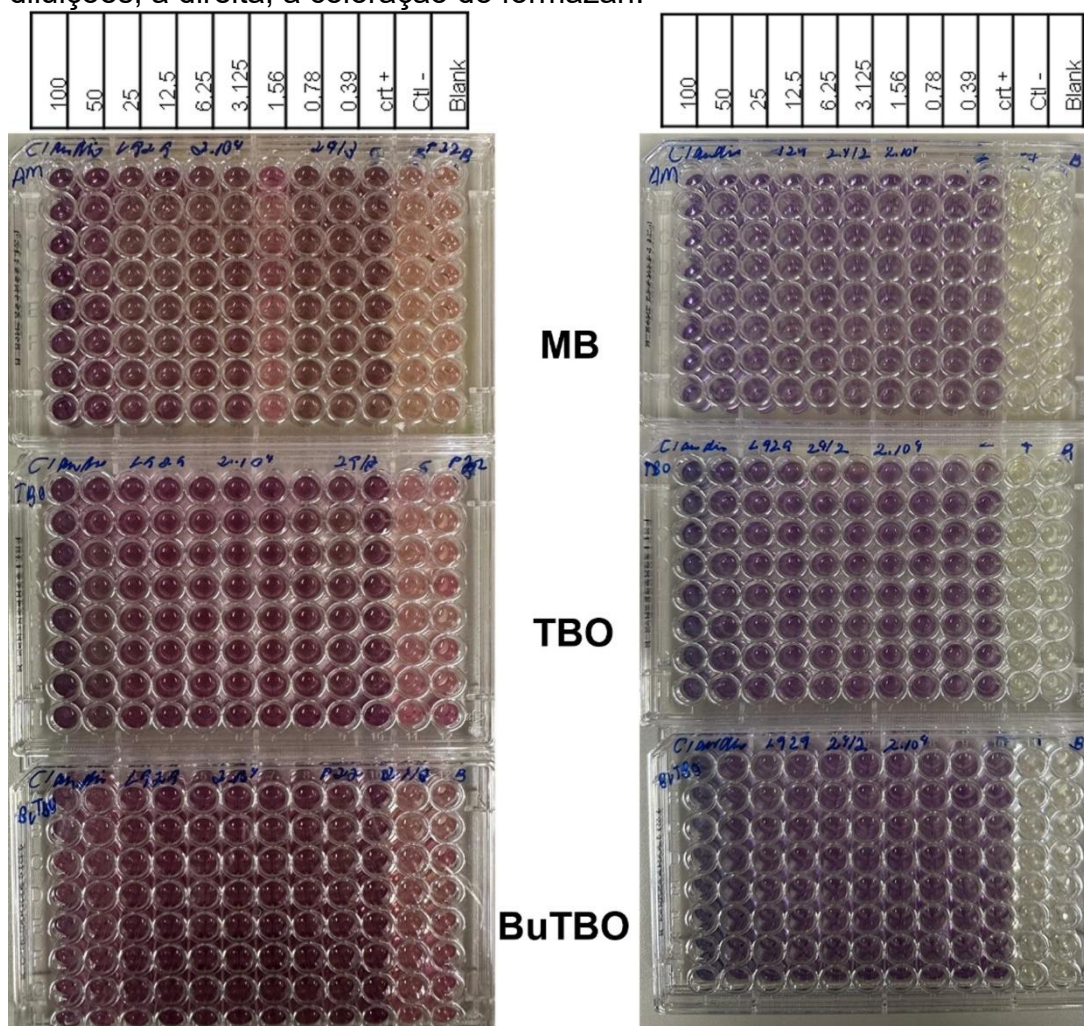
O ensaio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular através da atividade metabólica mitocondrial [40, 44–46]. O MTT é um sal hidrossolúvel, de cor amarela, que quando em contato com células viáveis é convertido em cristais de formazan, principalmente pela ação da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias. Como os cristais são azuis escuros, sua dissolução gera uma coloração que pode ser mensurada em espectrofotômetro.

Para este ensaio foi utilizado 2×10^4 células em cada um dos poços da placa de 96 poços [32, 40], que permaneceram incubadas a 37°C em um ambiente úmido com 5% de CO_2 por 24 h quando atingiam a confluência de 80 a 90%.

O volume de 20 μL do fotossensibilizador foi diluído nos poços da coluna 1, onde previamente foram adicionados 80 μL de DMEM aos 100 μL iniciais tomando o cuidado para não desaderir as células. Em seguida, uma diluição seriada de 1:2 foi realizada aspirando-se 100 μL dos poços da coluna 1 e transferindo para os poços da coluna 2 e assim sucessivamente até a coluna

9, de onde foi aspirado 100 μ L de cada poço da coluna para se manter o volume original em todos os poços. A coluna 10 foi destinada para o controle negativo (células + meio de cultura); a coluna 11 para o controle positivo (células + meio + SDS 1%) e a coluna 12 foi o Blank (meio) (Fig. 6).

Figura 6 Ensaio de viabilidade (MTT) em placa de 96 poços. Placas preparadas com diluições seriadas (100–0,39 μ M) de cada fotossensibilizador, avaliadas no escuro com controles. À esquerda, as diluições; à direita, a coloração do formazan.



Fonte: Arquivo pessoal

Após o tempo de contato, removeu-se o sobrenadante e 100 μ L de PBS 1x foi usado para lavar cada poço. Removeu-se então o PBS e em seguida adicionou-se 50 μ L de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em cada poço na concentração de 0,5mg/mL e encubadas no mesmo ambiente de cultivo por 3 h, durante as quais ocorreu a precipitação dos cristais de formazan. Após este intervalo, 100 μ L de isopropanol foram utilizadas para a completa solubilização dos cristais. As densidades ópticas das amostras foram lidas no espectrofotômetro de microplacas Epoch (*BioTek instruments, Winooski, EUA*) no comprimento de onda de 540 /560/ 570 nm. A razão de viabilidade foi determinada para cada diluição utilizando a seguinte fórmula: (DO do poço experimental) / (Média das DO do grupo controle negativo).

Este experimento foi realizado em quadruplicata em dias independentes [42, 43].

3.7 Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores sobre a proliferação celular – Ensaio Cristal Violeta.

O ensaio de cristal violeta quantifica a proliferação celular por meio da coloração das células aderidas. O corante se liga às proteínas celulares, permitindo que a intensidade da absorbância medida no espectrofotômetro seja proporcional ao número de células que permaneceram aderidas ao final do experimento [47–49].

Para este ensaio as células L929 foram contadas e semeadas na concentração de 2×10^4 por poço. Foram mantidas em estufa à 37 °C, em ambiente úmido com 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, quando as células já se encontravam adequadamente aderidas ao fundo dos poços, eram expostas aos fotossensibilizadores por 5 minutos. Concluído este intervalo, as placas foram lavadas com 100 µL de PBS por poço, e coradas com 40 µL de solução de cristal violeta a 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em 20% de metanol por 15 min, em temperatura ambiente, sendo lavadas 2 vezes com água destilada após esse período. O cristal violeta foi solubilizado com a adição de 100 µL de metanol por poço. A absorbância foi medida pelo espectrofotômetro de microplacas Epoch (*BioTek instruments, Winooski, EUA*) no comprimento de onda de 540/560/ 570 nm. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata em dias independentes [18, 37, 50].

3.8 Irradiação com luz

Foi utilizado um dispositivo de irradiação para grandes amostras utilizada em pesquisas de Biofotônica (LED Box, BioLambda, São Paulo, Brasil) (Fig. 7), que permite a irradiação simultânea da placa utilizada nos experimentos, configurado para emissão vertical de cima para baixo. A distribuição da luz foi avaliada pelo fator de Petri (Bolton & Linden, 2003) [51], assegurando homogeneidade superior a 90 %. Foram verificados a irradiância em múltiplos pontos do plano da amostra, a uniformidade do feixe e o comprimento de onda de 660 nm, todos adequados para assegurar a precisão dos parâmetros

dosimétricos, detalhados na Tabela 2. A determinação da exposição radiante baseou-se no trabalho de Campos Chaves Lamarque *et al.* (2020). [45].

Figura 7 Led Box.

Fonte luminosa utilizada para irradiação da luz led. A imagem C, mostra o local de colocação da placa onde se faz a irradiação após o fechamento da parte superior, onde estão o *cluster* de leds.



Fonte: acervo pessoal

Tabela 2 Parâmetros dosimétricos

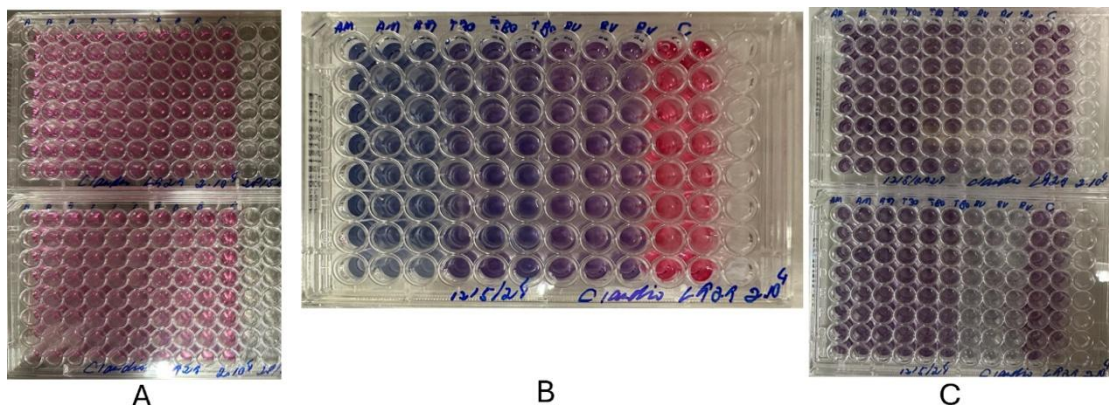
Parâmetros	Valores/ Tratamento
Comprimento de onda (nm)	660
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante no poço (mW)	19,2
Polarização	Não polarizada
Área do feixe no equipamento (cm ²)	163
Área do feixe no poço (cm ²)	0,32
Irradiância no poço (W/cm ²)	0,06
Tempo de exposição (s)	125
Exposição radiante (J/cm ²)	7,5
Energia radiante (J)	2,4
Técnica de aplicação	n/a
Número de sessões	Única
Número pontos	n/a

A Figura 8 apresenta o desenho experimental das placas de 96 poços utilizado para avaliar o efeito citotóxicos dos fotossensibilizadores sobre a viabilidade celular, por meio do ensaio de MTT na concentração de 25 μ M. As células L929 foram semeadas em densidade de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de 96 poços contendo três colunas para cada fotossensibilizador (azul de metileno - AM, azul de toluidina O - TBO e butil azul de toluidina O - BuTBO), além de duas colunas destinadas ao controle negativo (células + meio). Após a exposição aos fotossensibilizadores e posterior irradiação, observou-se a formação dos cristais de formazan, evidenciado pela coloração violeta nos poços com atividade metabólica preservada, enquanto a ausência ou redução da coloração indicou diminuição da viabilidade.

Importante destacar que esta mesma distribuição experimental - incluindo a alocação das colunas para cada fotossensibilizador (MB, TBO e BuTBO) e a manutenção das colunas de controle negativo - foi rigorosamente preservada nos ensaios de proliferação celular conduzidos com o método de coloração por cristal violeta. Essa padronização assegura paralelismo metodológico entre os ensaios, possibilitando comparações diretas e aumentando a robustez interpretativa dos resultados obtidos tanto para a viabilidade metabólica quanto para a proliferação celular.

Figura 8 Efeito da PDT sobre a viabilidade.

Avaliação do efeito da PDT sobre a viabilidade dos fibroblastos expostos aos fotossensibilizadores a 25 μ M. Placa de 96 poços com três colunas para cada fotossensibilizador (AM azul de metileno, TBO – azul de toluidina e Bu – butil azul de toluidina) e duas colunas de controle negativo (C). (A) Fibroblastos semeados a 2×10^4 células/poço; (B) poços com fotossensibilizadores e grupo controle; (C) cristais de formazan (azul/ roxo) indicando viabilidade e coloração amarela associada à ausência de atividade



Fonte: acervo pessoal

3.9 Microscopia de fluorescência

Os fibroblastos L929 foram preparados conforme previamente descrito e expostos aos fotossensibilizadores a 25 μM por 5 minutos, empregando-se a mesma densidade celular dos demais ensaios (2×10^4 células/poço). Após incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS (pH 7,2) para eliminação do fotossensibilizador presente no sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 100 μL PBS por poço.

As análises foram conduzidas em duas condições: no escuro (ausência de irradiação) e sob irradiação, seguindo rigorosamente os mesmos parâmetros dosimétricos apresentados na Tabela 1. Em todas as placas experimentais havia um poço contendo apenas L929 em PBS, atuando como controle negativo para referência de autofluorescência de fluoróforos endógenos dos fibroblastos L929.

A análise de fluorescência foi realizada no sistema ZOE *Fluorescent Cell Imager* (BIO-RAD Laboratories, CA, USA), adequado para captura de imagens de fluoróforos em culturas celulares, permitindo visualização intracelular e comparação de intensidades relativas entre grupos. Os parâmetros de aquisição (brilho, tempo de exposição e ganho) foram mantidos constantes entre os grupos sempre que tecnicamente factível, preservando comparabilidade direta dos sinais.

Os picos espectrais considerados foram: azul de metileno - $\lambda_{\text{abs}} \approx 664 \text{ nm}$ [52]; $\lambda_{\text{em}} \approx 686 \text{ nm}$ ($\Delta S \approx 22 \text{ nm}$) [52, 53]; azul de toluidina - $\lambda_{\text{abs}} \approx 631 \text{ nm}$ [52, 54]; $\lambda_{\text{em}} \approx 654 \text{ nm}$ ($\Delta S \approx 23 \text{ nm}$) [54]. Para o BuTBO, com pico de absorção relatado em $\approx 637 \text{ nm}$ [27], adotou-se um deslocamento de Stokes equivalente ao reportado para o TBO ($\approx 23 \text{ nm}$), projetando-se um pico de emissão próximo de $\approx 660 \text{ nm}$. A faixa de detecção óptica foi estabelecida com base nesta diferença intrínseca entre absorção e emissão – o deslocamento de Stokes – no qual o fóton emitido apresenta maior comprimento de onda em relação ao fóton incidente, conforme descrito por Lakowicz (2006) [55].

Deste modo, o emprego do LED verde (520-550 nm) configurou-se apropriado, pois sua faixa de excitação permaneceu suficientemente separada da janela de emissão adquirida, preservando relação sinal/ruído adequada para a detecção intracelular.

Para cada fotossensibilizador, três poços foram analisados, e seis campos microscópicos aleatórios foram registrados por poço, assegurando uma amostragem representativa da distribuição da fluorescência intracelular.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos para a determinação da curva concentração-resposta foram analisados por ANOVA de dois fatores, considerando como variáveis independentes o fotossensibilizador (BuTBO, TBO e MB) e a concentração (100 a 0,39 μM), e como variável dependente a densidade óptica (DO) medida pelos ensaios de MTT e cristal violeta. Essa análise permitiu avaliar os efeitos de cada fator, bem como a interação entre fotossensibilizador e concentração. Para a avaliação dos efeitos da PDT sobre os fibroblastos, em que todos os fotossensibilizadores foram testados em 25 μM , foi realizada ANOVA de uma via, considerando o fotossensibilizador como único fator e a densidade óptica como variável dependente, tanto para os ensaios de viabilidade celular – ensaio de MTT - quanto para a proliferação celular – ensaio do cristal violeta. Em ambas as análises, as densidades ópticas foram normalizadas pelo grupo controle, e os testes *post hoc* de Bonferroni foram aplicados, adotando nível de significância de 5% e poder do teste de 90%. Todos os dados foram arquivados em planilhas do Excel (MICROSOFT. Microsoft Excel, versão 365, 2024) e analisados pelo Origin 8 (ORIGINLAB. Origin, versão 8. Northampton, MA, 2007).

4. Resultados

4.1 Curva concentração-resposta

Os gráficos apresentados na figura 9 sintetizam, de forma comparativa, o comportamento citotóxico dos três fotossensibilizadores avaliados - azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) e BuTBO - ao longo de uma faixa de concentrações que se estende de 0,39 a 100 μM , incluindo o grupo controle correspondente a 0 μM . No eixo Y, estão dispostas essas concentrações crescentes, permitindo visualizar a progressão do efeito dos compostos conforme aumenta a disponibilidade molecular do fotossensibilizador no meio. No eixo X, são expressos os valores de densidade óptica normalizada, resultantes do ensaio de viabilidade celular, que representam a proporção de células viáveis em relação ao controle negativo ($\approx 1,0$). Dessa forma, deslocamentos das barras em direção a valores menores indicam redução da viabilidade celular, enquanto valores mais próximos de 1,0 refletem maior preservação da atividade metabólica.

As barras horizontais exibem a média da DO normalizada observada para cada concentração, utilizando padrões gráficos distintos que permitem diferenciar os três compostos: barras mais claras para MB, hachuradas para TBO e barras de tom cinza sólido para BuTBO. Essa distinção facilita a comparação direta entre os fotossensibilizadores dentro da mesma concentração e evidencia tendências específicas associadas a cada molécula. Complementando essa visualização, as linhas de erro situadas sobre cada barra representam o desvio-padrão das replicatas experimentais, revelando o grau de variabilidade intrínseca aos dados. Amplitudes menores indicam maior consistência entre as medições, enquanto desvios mais largos sugerem maior dispersão ou sensibilidade experimental naquela condição.

No tempo inicial (0 h), as densidades ópticas normalizadas permaneceram próximas a 1,0 em todas as concentrações avaliadas (0,39–100 μM). Em concentrações baixas, como 0,39 μM , MB apresentou valor praticamente idêntico ao controle (1,045; SD 0,310), assim como o TBO (0,845; SD 0,189), enquanto o BuTBO mostrou leve redução (1,001; SD 0,186). Esse comportamento manteve-se em 0,78 μM , com MB novamente próximo ao

controle (0,977; SD 0,158), TBO estável (0,901; SD 0,223) e BuTBO levemente inferior (0,994; SD 0,203). Em 1,56 μM , MB apresentou 0,927 (SD 0,197), TBO 0,927 (SD 0,212) e BuTBO 0,998 (SD 0,170), mantendo-se todos próximos à viabilidade máxima. Em concentrações médias, como 3,12 μM , MB registrou 0,953 (SD 0,271), TBO 0,903 (SD 0,279) e BuTBO 0,996 (SD 0,198), demonstrando pequenas oscilações entre os compostos.

Após 24 horas de crescimento, as densidades ópticas normalizadas permaneceram próximas ao valor de referência ($\sim 1,0$) ao longo da faixa de concentrações testadas (0,39–100 μM), com pequenas variações entre os fotossensibilizadores. Nas concentrações mais baixas, como 0,39 μM , MB apresentou valor próximo ao controle (0,868; SD 0,179), TBO manteve-se estável (0,837; SD 0,223), enquanto o BuTBO exibiu leve redução (0,958; SD 0,147). Comportamento semelhante foi observado em 0,78 μM , em que MB (0,886; SD 0,169), TBO (0,871; SD 0,177) e BuTBO (0,997; SD 0,115) mantiveram valores compatíveis com viabilidade elevada.

Em concentrações intermediárias, como 1,56 e 3,12 μM , observou-se estabilidade geral entre os três compostos. Em 1,56 μM , MB registrou 0,722 (SD 0,238), TBO marcou 0,909 (SD 0,227) e BuTBO apresentou 1,033 (SD 0,137). Já em 3,12 μM , MB atingiu 1,089 (SD 0,197), TBO apresentou 0,968 (SD 0,223) e BuTBO mostrou 0,990 (SD 0,142), sem reduções expressivas em relação ao controle.

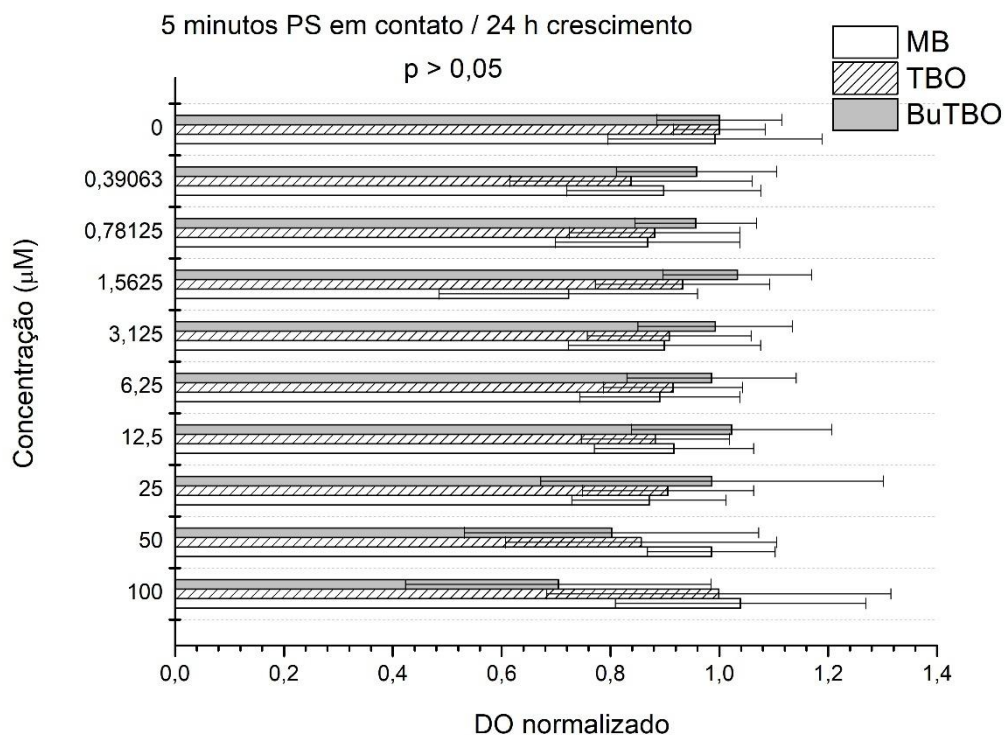
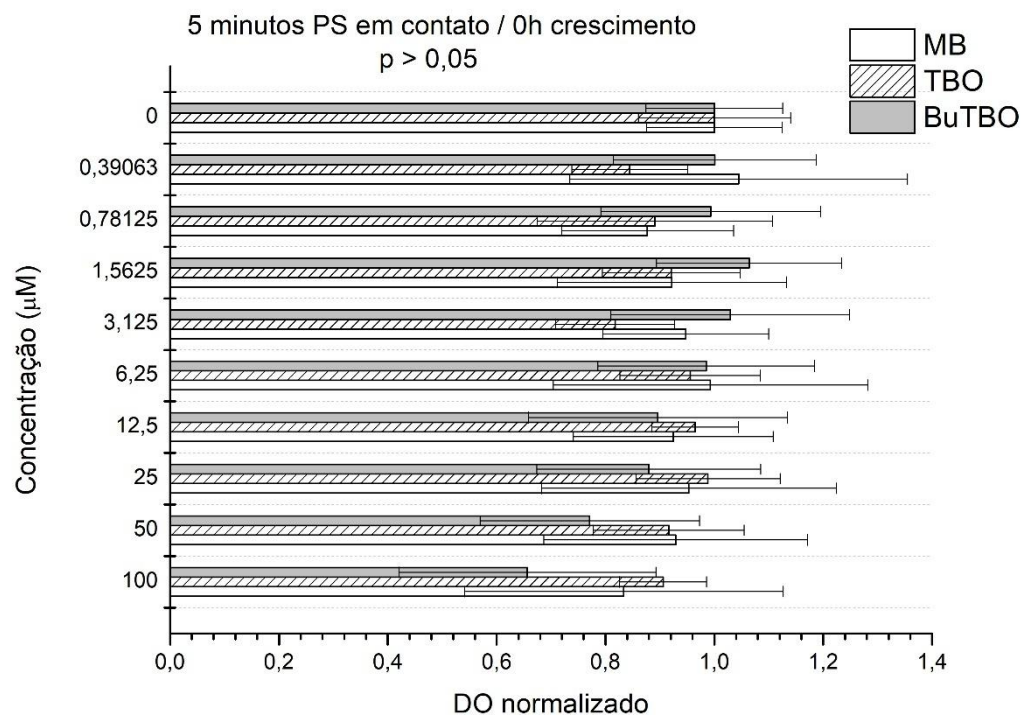
Esse padrão de comportamento persistiu também nas concentrações mais elevadas. Em 6,25 μM , MB registrou 0,891 (SD 0,147), TBO marcou 0,915 (SD 0,128) e BuTBO apresentou 0,986 (SD 0,156). Em 12,5 μM , os valores permaneceram altos: MB atingiu 0,917 (SD 0,146), TBO 0,882 (SD 0,136) e BuTBO 1,023 (SD 0,184). Na concentração de 25 μM , observou-se MB com 0,874 (SD 0,142), TBO com 0,906 (SD 0,157) e BuTBO com 0,986 (SD 0,315). Finalmente, nas maiores concentrações, 50 e 100 μM , ocorreu pequena dispersão entre os compostos, mas novamente sem reduções significativas: MB registrou 0,985 (SD 0,117) e 1,039 (SD 0,230), TBO apresentou 0,856 (SD 0,250) e 0,999 (SD 0,316), enquanto BuTBO marcou 0,802 (SD 0,271) e 0,704 (SD 0,281), respectivamente.

Apesar das pequenas flutuações observadas entre os fotossensibilizadores após 24 horas, nenhuma das diferenças apresentou significância estatística em relação ao controle negativo ($p > 0,05$), indicando ausência de citotoxicidade relevante no período avaliado.

Nos dois tempos avaliados (0 h e 24 h), observou-se que o BuTBO apresentou leve redução de viabilidade apenas nas concentrações mais altas (100–50 μM), mantendo valores próximos ou iguais a 1,0 nas concentrações intermediárias e baixas. O TBO também manteve viabilidade próxima de 1,0 na maior parte das concentrações, com discreta queda apenas em níveis elevados. O azul de metileno apresentou comportamento semelhante, com médias próximas de 1,0 em quase todas as concentrações testadas. Em geral, nenhum dos fotossensibilizadores demonstrou redução expressiva da viabilidade celular nos dois tempos de coleta, com pequenas variações compatíveis com flutuações experimentais.

Figura 9 Curva concentração-resposta no escuro

Curvas concentração–resposta dos fotossensibilizadores BuTBO, TBO e MB em células L929 avaliadas por MTT nos tempos 0 h e 24 h. As barras representam o DO normalizado em função da concentração. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).



4.2 Citocompatibilidade no escuro

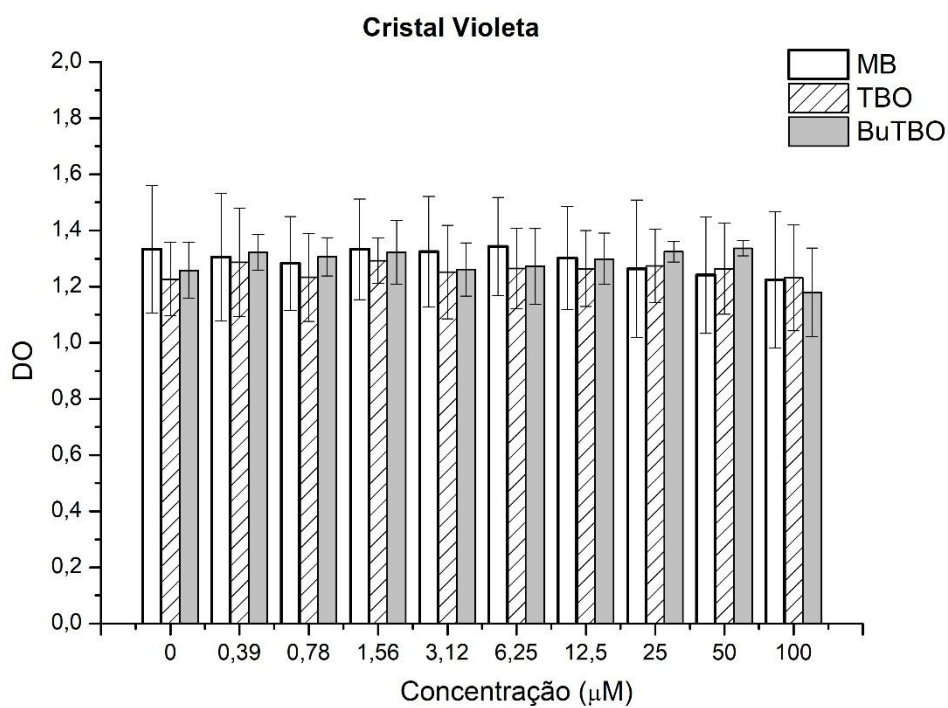
O gráfico representado na Figura 10, apresenta os resultados do ensaio de proliferação celular avaliado pelo método de cristal violeta em fibroblastos L929 expostos aos fotossensibilizadores azul de metileno (MB), azul de toluidina O (TBO) e butil azul de toluidina O (BuTBO) em concentrações variando de 0 a 100 μM . O eixo horizontal indica as concentrações testadas, enquanto o eixo vertical representa a densidade óptica (OD), normalizada em relação ao grupo controle (0 μM).

A avaliação de proliferação pelo cristal violeta foi realizada como método complementar ao ensaio de MTT previamente descrito, com o objetivo de aumentar a robustez e a consistência das análises relacionadas à citocompatibilidade. Assim como observado no MTT, as OD normalizadas permaneceram estáveis ao longo de todas as concentrações, sem redução significativa em comparação ao controle. Essa ausência de diferença entre os grupos é corroborada pela análise estatística ($p > 0,05$).

As barras de erro exibidas no gráfico correspondem aos desvios-padrão das médias, representando a variabilidade intrínseca do experimento - isto é, as flutuações naturais que ocorrem entre replicações independentes, decorrentes de diferenças biológicas entre poços, pequenas variações de manipulação e limites próprios das técnicas analíticas empregadas. A amplitude limitada desses desvios-padrão reforça a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados.

Figura 10 Proliferação celular sem irradiação.

Ensaio de cv para análise da proliferação através da biomassa aderida, realizados após 5 min de contato entre células e fotossensibilizadores no escuro.



4.3 Efeitos citotóxicos

O gráfico superior da Figura 11 apresenta a viabilidade celular, obtida pelo ensaio de MTT, de fibroblastos L929 submetidos à terapia fotodinâmica com os fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina O e butil azul de toluidina O, todos na concentração de 25 μ M. Os valores de densidade óptica foram normalizados em relação ao grupo controle, permitindo comparação direta entre os tratamentos. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão.

Observa-se que todos os fotossensibilizadores reduziram a viabilidade celular após a irradiação quando comparados ao controle não tratado. O grupo controle apresentou maior DO normalizada ($\sim 1,0$), indicando preservação da viabilidade, enquanto os grupos tratados exibiram reduções distintas. O MB e o TBO resultaram em níveis intermediários de DO ($\sim 0,80$ e $\sim 0,77$, respectivamente), sugerindo efeito fototóxico moderado. Em contraste, o BuTBO apresentou a menor OD ($\sim 0,63$), indicando maior efeito fotodinâmico entre os fotossensibilizadores avaliados.

As comparações estatísticas entre os grupos revelam diferenças altamente significativas. BuTBO apresentou redução estatisticamente maior em relação ao MB ($p = 9,25 \times 10^{-4}$) e ao TBO ($p = 7,26 \times 10^{-6}$). Tanto MB quanto TBO diferiram significativamente do controle ($p = 0,00144$ e $p = 5,57 \times 10^{-5}$, respectivamente). A diferença entre BuTBO e o controle foi ainda mais pronunciada ($p = 2,41 \times 10^{-11}$), reforçando sua maior capacidade fototóxica.

No conjunto, o gráfico demonstra que todos os fotossensibilizadores promoveram fototoxicidade significativa, mas o BuTBO apresentou o maior potencial de redução da viabilidade celular, seguido por TBO e MB, quando avaliados sob as mesmas condições de PDT.

O gráfico referente ao ensaio de cristal violeta (CV) apresentado abaixo do gráfico de MTT na figura 12, permitindo a visualização sequencial dos resultados obtidos por ambos os métodos e facilitando a comparação direta entre os efeitos da PDT sobre a viabilidade (MTT) e proliferação (CV).

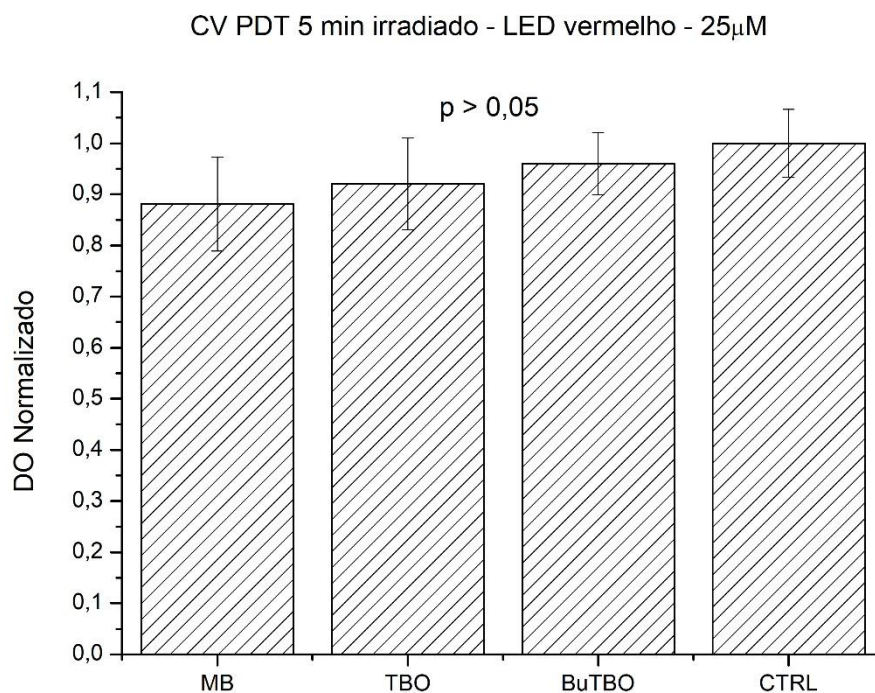
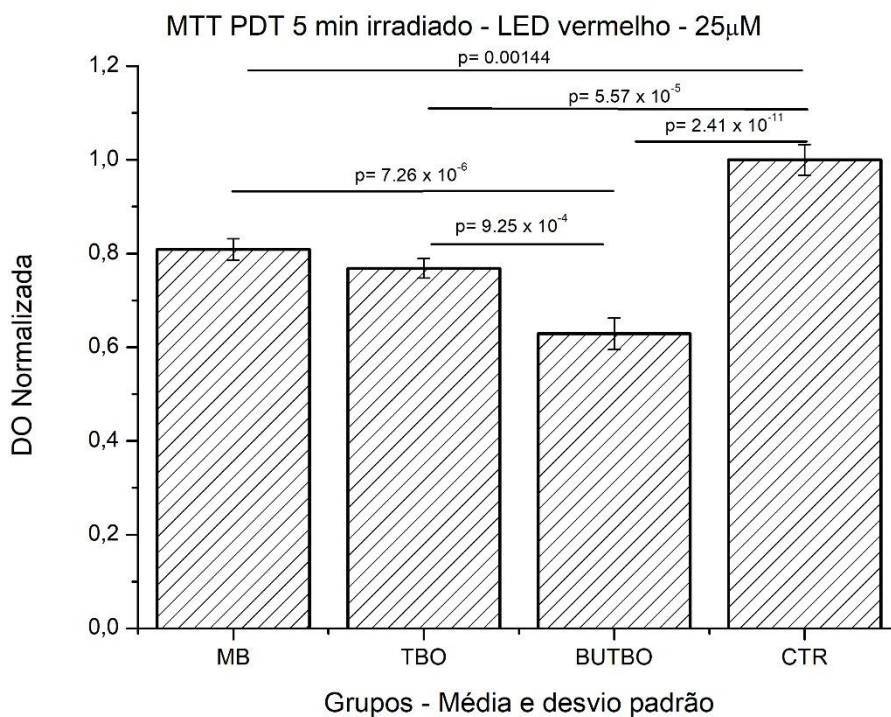
Este gráfico apresenta os resultados do ensaio de cristal violeta (CV) realizado após a terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelos fotossensibilizadores azul de metileno (MB), azul de toluidina O (TBO) e butil

azul de toluidina O (BuTBO), todos avaliados na concentração de 25 μ M. As densidades ópticas foram normalizadas em relação ao grupo controle não tratado, permitindo avaliação comparativa direta da biomassa celular aderida após o tratamento. Os dados são apresentados como média e desvio-padrão.

Observa-se que os valores de DO permaneceram próximos ao controle em todos os grupos, variando entre aproximadamente 0,87 (MB) e 1,0 (0 μ M). Tanto TBO quanto BuTBO apresentaram DO ligeiramente superiores às do MB, embora ainda muito próximas ao valor do controle, indicando ausência de redução na proliferação celular após a PDT. A sobreposição dos desvios-padrão indica ausência aparente de diferenças entre os grupos, o que foi confirmado pela análise estatística, cujo valor de $p > 0,05$ demonstrou não haver diferença significativa na proliferação ou aderência celular avaliada pelo ensaio de cristal violeta.

Figura 11 Viabilidade e proliferação após irradiação.

Resultados da PDT (25 μ M) em células L929 tratadas com AM, TBO e BuTBO, expressos como valores de média e desvio-padrão. MTT: todos os fotossensibilizadores apresentaram efeito fototóxico, reduzindo a viabilidade celular em relação ao controle, com o BuTBO exibindo a maior redução ($p < 0,001$). Cristal violeta: não houve diferença significativa na proliferação celular entre os grupos ($p > 0,05$). Irradiação: 660 nm, 2,4 J, 125 s.



4.4 Incorporação intracelular

Devido às limitações técnicas do microscópio de fluorescência ZOE (Bio-Rad), apenas o BuTBO apresentou sinal fluorescente detectável nas condições experimentais utilizadas. As emissões de fluorescência do azul de metileno e do azul de toluidina O não foram captadas pelo equipamento, impedindo sua análise comparativa. Portanto, a avaliação da incorporação intracelular pode ser realizada apenas para o BuTBO, tanto no escuro quanto após a PDT.

As Figura 12 e 13 representam os ensaios de incorporação dos fotossensibilizadores pelas células L929, tanto no escuro quanto após a PDT respectivamente, evidenciando que apenas o butil azul de toluidina O apresentou fluorescência detectável pelo microscópio ZOE (Bio-Rad).

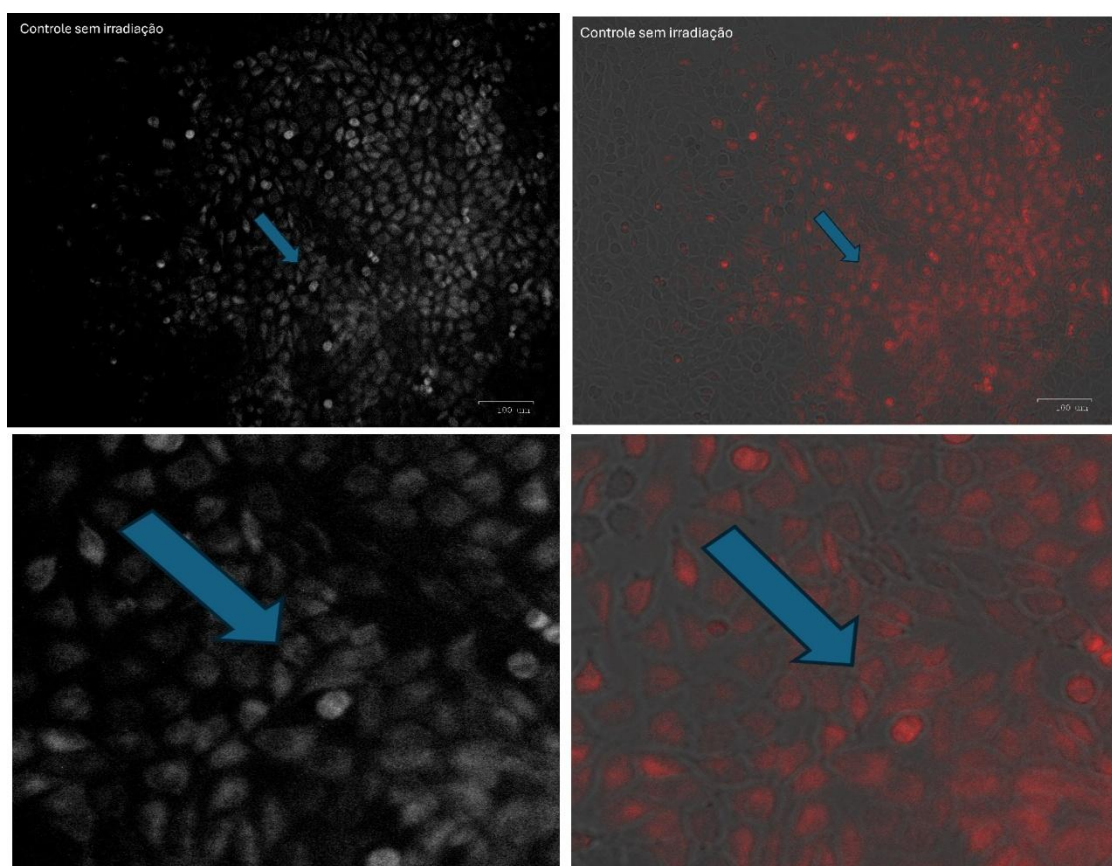
As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência ZOE (Bio-Rad) após o contato das células L929 com o fotossensibilizador por 5 minutos, seguido de remoção e tripla lavagem com PBS. As micrografias superiores apresentam o campo amplo original, enquanto as inferiores correspondem a ampliações digitais das regiões destacadas pelas setas.

Nas imagens da figura 12, em escala de cinza, o ZOE utiliza o canal de fluorescência isolado, o que aumenta o contraste e realça a distribuição do sinal, facilitando a visualização de diferenças de intensidade e de contornos celulares. Já as imagens da direita apresentam o modo campo claro sobreposto à fluorescência (*Brightfield merged with fluorescence*), recurso no qual o sinal fluorescente é sobreposto ao campo claro para permitir a identificação simultânea da morfologia celular e da localização intracelular da fluorescência. Tomando como referência a sequência da figura 13 (sem irradiação), observa-se inicialmente, no campo amplo, uma monocamada de células L929 com densidade homogênea e espaçamento intercelular reduzido, consistente com adesão estável ao fundo do poço. Na ampliação digital, a seta indica uma célula representativa, permitindo visualizar de forma mais nítida os elementos estruturais: o contorno celular definido por uma borda em tons de cinza uniforme, sugerindo integridade da membrana plasmática; uma região central menos intensa que corresponde, de forma compatível, ao núcleo; e padrão fluorescente difuso no citoplasma, em tons de cinza mais claro, sugerindo

acúmulo intracelular do fotossensibilizador sem formação de agregados definidos.

Figura 12 Incorporação celular sem irradiação

Imagens de fluorescência obtidas no microscópio ZOE (Bio-Rad) mostrando a incorporação do butil azul de toluidina O (BuTBO) por células L929. As imagens superiores apresentam o campo amplo, enquanto as inferiores correspondem a ampliações digitais das regiões indicadas pelas setas. À esquerda, o canal de fluorescência isolado em escala de cinza realçando o contraste e a distribuição do sinal; à direita, o modo campo claro mesclado à fluorescência permite visualizar simultaneamente morfologia e fluorescência. As setas indicam uma célula representativa, evidenciando membrana plasmática íntegra, núcleo discernível e padrão fluorescente citoplasmático difuso, compatível com acúmulo intracelular do fotossensibilizador. A barra de escala corresponde a 100 μ M



As imagens da Figura 13 foram obtidas no microscópio de fluorescência ZOE (Bio-Rad) após a irradiação das células L929 sob os mesmos parâmetros dosimétricos utilizados nos ensaios de fototoxicidade (660 nm, 19,2 mW/poço, 2,4 J, 125 s). Assim como na Figura 12, as imagens superiores correspondem ao campo amplo, enquanto as inferiores apresentam ampliações digitais das regiões indicadas pelas setas.

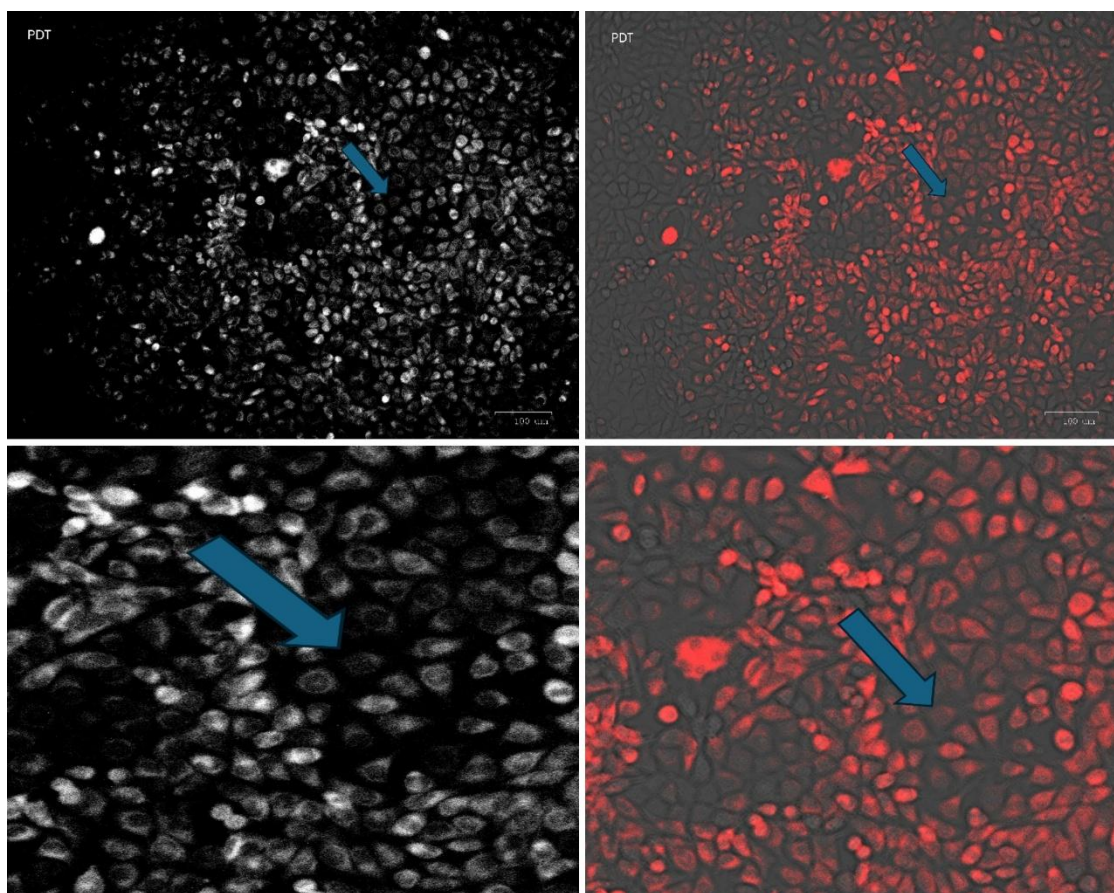
No campo amplo, observa-se uma monocamada de células L929 submetidas à PDT, com aumento perceptível do espaçamento intercelular, sugerindo redução da coesão lateral entre as células. Apesar disso, a distribuição geral ainda indica adesão ao fundo do poço da placa de 96, compatível com a manutenção parcial da integridade estrutural após a irradiação. A intensidade geral da fluorescência é maior do que a observada na figura 12, resultando em um tom de vermelho mais intenso nas imagens fusionadas (campo claro + fluorescência).

Na ampliação digital, as setas destacam células representativas, permitindo detalhar o padrão morfológico pós-PDT. Os contornos celulares exibem bordas mais irregulares e discretamente espiculadas, sugestivas de alterações oxidativas da membrana plasmática — porém sem evidências de descolamento, indicando que a adesão basal ainda está preservada. O citoplasma apresenta agora um padrão fluorescente granular, substituindo a distribuição difusa observada na figura anterior; esse aspecto granular é compatível com redistribuição intracelular do fotossensibilizador.

Outro aspecto observável nesta imagem é a redução relativa do volume citoplasmático, com uma relação núcleo-citoplasma menor quando comparada à Figura 12, compatível com retração celular pós-estresse foto-oxidativo. O núcleo, delimitado por uma região de menor intensidade de fluorescência, permanece identificável, embora ocupe proporção maior da área celular devido à diminuição do volume citoplasmático.

Figura 13 Incorporação celular pós-irradiação.

Imagens de fluorescência obtidas no microscópio ZOE (Bio-Rad) após exposição das células L929 ao butil azul de toluidina O (BuTBO) e irradiação com luz de 660 nm (19,2 mW/poço, 2,4 J, 125 s). As imagens superiores mostram o campo amplo, enquanto as inferiores apresentam ampliações digitais das regiões indicadas pelas setas. Observa-se aumento do espaço intercelular, membranas com contornos mais irregulares, citoplasma com padrão fluorescente granular e intensidade de sinal mais elevada, além de redução aparente da razão núcleo/citoplasma em comparação às imagens sem irradiação. A barra de escala corresponde a 100 μ M.



5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo geral comparar os efeitos dos fotossensibilizadores butil azul de toluidina O, azul de toluidina O e azul de metileno sobre a viabilidade, proliferação e incorporação nos fibroblastos L929, em condições com e sem ativação luminosa.

Este estudo representa a primeira investigação *in vitro* do BuTBO, um novo fotossensibilizador derivado fenotiazínico, em fibroblastos murinos L929. A construção sistemática da curva concentração–resposta, fundamentada em ensaios complementares de viabilidade - MTT e proliferação – cristal violeta, no escuro, conferiu solidez metodológica ao estudo e possibilitou a definição racional de uma concentração citocompatível, assegurando que os ensaios subsequentes refletissem predominantemente os efeitos decorrentes da ativação fotodinâmica dos fotossensibilizadores [37, 56, 57].

A utilização da linhagem L929 mostrou-se adequada para este estudo, uma vez que é reconhecida pela ISO 10993-5 para ensaios de citotoxicidade, apresentando respostas comparáveis à linhagem NIH-3T3 validada pela OECD, e já foi amplamente empregada em pesquisas com fotossensibilizadores e irradiação por LED. Essas características a consolidam como um modelo *in vitro* robusto e relevante para a avaliação da citocompatibilidade sob condições de escuro e luz [33, 35, 45, 58].

Como base para as concentrações dos fotossensibilizador do BuTBO neste projeto, utilizou-se como referências os estudos *in vivo*, onde apresentaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada pelo fotossensibilizador butil azul de toluidina em modelos de ratos para doenças periodontais e osteonecrose da mandíbula [10, 30]. Nelas o BuTBO e os demais fotossensibilizadores foram utilizados nas concentrações de 244 μM , 1220 μM e 4880 μM [29], sendo que a mais efetiva foi a de 1220 μM . Porém, ao utilizá-los neste trabalho, os resultados iniciais indicaram elevada citotoxicidade, evidenciada por morte celular significativa na monocamada de fibroblastos. No entanto, essa resposta não deve ser interpretada como uma transposição direta dos achados *in vivo*, uma vez que as células em cultura são mais sensíveis do que os modelos animais utilizados em estudos anteriores. Diante da ausência de dados prévios em células eucarióticas, as concentrações

dos fotossensibilizadores foram testadas inicialmente com o objetivo de determinar o intervalo mais adequado para avaliação subsequente, garantindo a segurança e a confiabilidade dos experimentos.

Empregou-se os parâmetros metodológicos descritos por Wainwright (2016) e por Campos Chaves Lamarque (2020) [27, 45], estabelecendo-se a curva de concentração–resposta por meio de diluição seriada, iniciando em 100 μM e finalizando em 0,39 μM . Esse intervalo permitiu a obtenção de resultados mais estáveis e adequados para análise comparativa entre os fotossensibilizadores avaliados.

Nos ensaios de viabilidade celular (MTT) e de proliferação (cristal violeta) no escuro, observou-se elevados valores de densidade óptica em todas as condições testadas, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Diante desses achados, conclui-se que a citocompatibilidade dos fotossensibilizadores é equivalente no intervalo de concentrações estudado [22, 27, 45].

Os resultados deste estudo demonstraram que BuTBO, TBO e MB apresentaram baixa citotoxicidade em células L929 sem irradiação, tanto imediatamente após o contato quanto após 24 horas, com viabilidades próximas de 1,0 e apenas reduções discretas nas concentrações mais elevadas. Esse padrão contrasta parcialmente com os achados de Pereira *et al.* (2023), que reportaram citotoxicidade mais pronunciada para o TBO, observada em concentrações de aproximadamente 20–25 μM , enquanto o MB manteve baixa toxicidade até 100 μM . É importante salientar, contudo, que as diferenças entre os estudos podem estar relacionadas ao tempo de exposição adotado: em Pereira *et al.*, os efeitos citotóxicos foram registrados somente após 72 horas de incubação, um período substancialmente mais longo do que o empregado no presente estudo. Assim, nossos resultados sugerem que, em condições de incubação mais curtas, os três fotossensibilizadores apresentam um comportamento citocompatível, enquanto evidências de citotoxicidade mais acentuada, especialmente para o TBO, podem emergir apenas em tempos prolongados de incubação. Essas discrepâncias ressaltam a relevância dos parâmetros temporais na interpretação da toxicidade *in vitro* de fotossensibilizadores [59].

O comportamento do BuTBO foi semelhante ao observado para TBO e MB, indicando que o novo corante não aumenta a toxicidade basal em relação aos fotossensibilizadores MB e TBO [22]. As pequenas oscilações entre concentrações e tempos de análise são esperadas em ensaios de MTT e não indicam tendência consistente de toxicidade progressiva [46]. Além disso, a manutenção da viabilidade após 24 h reforça que não houve efeito tardio citotóxico relevante [60].

Esses achados são importantes porque indicam que o BuTBO pode ser utilizado em protocolos fotodinâmicos sem comprometer a viabilidade celular no escuro, condição essencial para garantir segurança biológica antes da irradiação. A similaridade entre os três fotossensibilizadores também sugere que o novo corante se alinha ao perfil já bem estabelecido de TBO e MB, ampliando seu potencial de aplicação em terapias antimicrobianas.

Como até o momento da realização deste estudo não havia dados disponíveis sobre o comportamento do BuTBO em modelos celulares, a curva concentração–resposta foi elaborada para definir de forma padronizada a concentração mais adequada para os ensaios de PDT. A concentração de 25 μM foi selecionada por apresentar o melhor equilíbrio entre baixa citotoxicidade no escuro, variabilidade experimental reduzida e resposta celular estável, além de permitir a detecção de diferenças reais entre os fotossensibilizadores após a irradiação. Essa faixa mostrou-se mais robusta e reprodutível do que concentrações muito baixas (0,39 μM) ou muito altas (100 μM), garantindo maior confiabilidade para as análises fotodinâmicas subsequentes.

Os efeitos citotóxicos dos fotossensibilizadores, avaliados pelo ensaio de MTT e complementados pelo ensaio de cristal violeta, evidenciaram comportamentos distintos entre viabilidade e proliferação celular. O MTT demonstrou diferenças significativas entre os grupos, destacando o BuTBO como o fotossensibilizador de maior fototoxicidade quando comparado ao TBO, ao MB e ao controle ($p < 0,05$). Em contraste, o ensaio de cristal violeta não revelou diferenças significativas na proliferação, indicando que a redução da viabilidade observada no MTT não foi acompanhada por perda de células aderidas. Contrastando ao trabalho de Biberoglu *et al.* 2022 onde foi

demonstrado que o TBO e o MB induziram seletivamente a apoptose de células cancerosas.

A preservação da integridade estrutural da monocamada, mesmo diante da redução acentuada da viabilidade, sugere que o efeito foto-oxidativo da PDT mediada pelo BuTBO não comprometeu a membrana plasmática. Esse comportamento é compatível com a maior lipofilicidade do BuTBO [27], característica que favorece sua penetração intracelular e amplia sua ação fotodinâmica para alvos internos, em vez de restringi-la à superfície celular [5, 7, 61].

A análise das imagens de fluorescência obtidas neste estudo permitiu caracterizar, de forma complementar aos ensaios de viabilidade e de proliferação, o comportamento fotofísico e o padrão de incorporação dos fotossensibilizadores pelas células L929. Mesmo após apenas cinco minutos de exposição e subsequente lavagem, as células tratadas com butil azul de toluidina O (BuTBO) já apresentavam fluorescência vermelha claramente detectável, indicando que a internalização do corante ocorre rapidamente e de modo suficiente para gerar sinal mensurável no microscópio ZOE. A intensificação desse sinal após a irradiação sugere que a ativação luminosa modifica o estado fotoquímico do BuTBO, contribuindo para um aumento do contraste da fluorescência sob as condições experimentais avaliadas.

Esses achados diferem daqueles relatados por Kömerik *et al.* (2002), que, utilizando azul de toluidina O em modelo *in vivo*, observaram fluorescência somente após um intervalo maior (aproximadamente 10 minutos) e predominantemente limitada às camadas epiteliais. A diferença metodológica entre estudos *in vitro* e *in vivo*, incluindo variáveis como barreiras teciduais, microambiente, espessura dos tecidos e dinâmica de dispersão do fotossensibilizador, provavelmente explica tais discrepâncias. No ambiente *in vitro*, a ausência dessas barreiras facilita a interação direta do corante com a membrana e o citoplasma, permitindo detecção mais precoce da fluorescência [28].

No presente estudo, a fluorescência foi registrada exclusivamente nos grupos tratados com BuTBO; nem o azul de metileno nem o azul de toluidina O apresentaram sinal detectável no microscópio ZOE sob as mesmas condições

experimentais. A ausência de sinal de fluorescência detectável para MB e TBO foi atribuída às limitações espectrais e de sensibilidade do microscópio ZOE (Bio-Rad) para captar eficientemente a emissão desses fotossensibilizadores nas condições experimentais empregadas. Essa limitação instrumental não invalida os resultados obtidos com o BuTBO, uma vez que as imagens de fluorescência registradas representam sinais reais e reproduzíveis de sua incorporação celular, permitindo a análise qualitativa de seu padrão intracelular sob as mesmas condições experimentais.

A análise morfológica das imagens complementa essas observações. Antes da irradiação, as células exibiam membranas bem definidas, núcleo facilmente identificável e padrão fluorescente difuso no citoplasma, compatível com distribuição homogênea do fotossensibilizador sem formação de agregados. Após a irradiação, observou-se aumento da intensidade da fluorescência, padrão citoplasmático mais granular e discreta alteração morfológica, com ampliação do espaço intercelular e contornos celulares mais irregulares, sem perda completa da adesão ao fundo da placa. Essas características qualitativas são compatíveis com alterações estruturais iniciais decorrentes da fotossensibilização, sem ruptura abrupta da membrana plasmática — achados coerentes com os resultados obtidos nos ensaios de proliferação, que não mostraram redução significativa mesmo após a PDT.

Em conjunto, os resultados das imagens reforçam a interpretação de que o BuTBO apresenta comportamento fotofísico distinto e maior capacidade de incorporação celular quando comparado ao azul de metileno e ao azul de toluidina O. A detecção precoce da fluorescência (após 5 minutos de contato), sua intensificação após a irradiação e as alterações morfológicas compatíveis com danos controlados após PDT oferecem suporte visual aos dados quantitativos de viabilidade (atividade metabólica) e proliferação (adesão de biomassa), contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos efeitos celulares associados ao BuTBO.

Embora este estudo apresente as primeiras evidências iniciais quanto à eficácia, segurança e ao potencial translacional do BuTBO na terapia fotodinâmica antimicrobiana, em comparação ao TBO e ao MB, suas limitações devem ser reconhecidas. A investigação foi conduzida exclusivamente em

modelo *in vitro* e restringiu-se às análises de viabilidade, proliferação e incorporação celular, sem incluir modelos de biofilme ou abordagens tridimensionais capazes de reproduzir condições teciduais mais complexas. As imagens de fluorescência exclusivamente do BuTBO não permitiram inferir comparações entre os três fotossensibilizadores. Essas limitações reforçam a necessidade de estudos futuros que explorem modelos de biofilme, avaliações mecanísticas mais abrangentes e validações pré-clínicas e clínicas. A consolidação dessas etapas será essencial para determinar sua aplicabilidade clínica e garantir eficiência antimicrobiana com preservação da integridade tecidual.

6. Conclusão

O butil azul de toluidina O demonstrou desempenho superior ao azul de metileno e ao azul de toluidina, apresentando citocompatibilidade adequada, maior fototoxicidade e evidência qualitativa de presença intracelular sob as condições de fluorescência empregadas, aspecto não observado para os demais corantes. Esses resultados indicam que o BuTBO reúne um conjunto de propriedades mais favorável entre os fotossensibilizadores avaliados, sustentando sua pertinência para a continuidade das investigações em terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Referências bibliográficas

1. Aebisher D, Czech S, Dynarowicz K, et al (2024) Photodynamic Therapy: Past, Current, and Future. *Int J Mol Sci* 25:11325. <https://doi.org/10.3390/ijms252011325>
2. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, et al (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38:2628–2635
3. Gomer CJ, Dougherty TJ (1979) Determination of [3H]- and [14C]hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res* 39:146–151
4. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 36:2326–2329
5. Sabino CP, Ribeiro MS, Wainwright M, et al (2022) The Biochemical Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy ¹. *Photochem Photobiol* php.13685. <https://doi.org/10.1111/php.13685>
6. Sabino CP, Wainwright M, Ribeiro MS, et al (2020) Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 208:111893. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111893>
7. Huang L, Xuan Y, Koide Y, et al (2012) Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med* 44:490–499. <https://doi.org/10.1002/lsm.22045>
8. Abdelkarim-Elafifi H, Parada-Avendaño I, Arnabat-Dominguez J (2021) Photodynamic Therapy in Endodontics: A Helpful Tool to Combat Antibiotic Resistance? A Literature Review. *Antibiotics* 10:1106. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091106>
9. Bacellar I, Tsubone T, Pavani C, Baptista M (2015) Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci* 16:20523–20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>
10. Ervolino E, Olivo MB, Toro LF, et al (2022) Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 40:103172. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103172>
11. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, et al (2014) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 49:584–594. <https://doi.org/10.1111/jre.12138>

12. Aghayan S, Yazdanfar A, Seyedjafari E, et al (2022) Evaluation of indocyanine-mediated photodynamic therapy cytotoxicity in human osteoblast-like cells: an in vitro study. *Folia Med (Plovdiv)* 64:932–937. <https://doi.org/10.3897/folmed.64.e67475>
13. Machado AHA, Braga FMP, Soares CP, et al (2007) Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. *Photomed Laser Surg* 25:220–228. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.2035>
14. Surur AK, De Oliveira AB, De Annunzio SR, et al (2024) Bacterial resistance to antimicrobial photodynamic therapy: A critical update. *J Photochem Photobiol B* 255:112905. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112905>
15. Wainwright M (2005) The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2:263–272. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00110-9)
16. Wainwright M (2015) Tricyclic Cationic Chromophores as Models for New Photoantimicrobials. *J Braz Chem Soc.* <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150188>
17. Wainwright M, O’Kane C, Rawthore S (2016) Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J Photochem Photobiol B* 160:68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.035>
18. Tortamano ACAC, Anselmo GG, Kassa CT, et al (2020) Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 101784. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101784>
19. da Collina GA, Freire F, Santos TP da C, et al (2018) Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 17:1355–1364. <https://doi.org/10.1039/c8pp00238j>
20. Bacellar IOL, Pavani C, Sales EM, et al (2014) Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. *Photochem Photobiol n/a-n/a.* <https://doi.org/10.1111/php.12264>
21. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, et al (2002) Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys* 4:2320–2328. <https://doi.org/10.1039/b109753a>
22. Wainwright M, Phoenix DA, Burrow SM, Waring J (1999) Cytotoxicity and Adjuvant Activity of Cationic Photosensitizers in a Multidrug Resistant Cell Line. *J Chemother* 11:61–68. <https://doi.org/10.1179/joc.1999.11.1.61>

23. Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 42:13–28. <https://doi.org/10.1093/jac/42.1.13>
24. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2001) Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 29:165–173. <https://doi.org/10.1002/lsm.1105>
25. Wilson M, Dobson J, Sarkar S (1993) Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 8:182–187. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1993.tb00663.x>
26. Wainwright M, O’Kane C, Rawthore S (2016) Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J Photochem Photobiol B* 160:68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.035>
27. Wainwright M, O’Kane C, Rawthore S (2016) Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J Photochem Photobiol B* 160:68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.035>
28. Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al (2002) Fluorescence Biodistribution and Photosensitising Activity of Toluidine Blue O on Rat Buccal Mucosa. *Lasers Med Sci* 17:86–92. <https://doi.org/10.1007/s101030200015>
29. Nuernberg MAA, Wainwright M, Miessi DMJ, et al (2020) Effects of butyl toluidine blue photosensitizer on antimicrobial photodynamic therapy for experimental periodontitis treatment in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 31:101868. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101868>
30. Theodoro LH, da Rocha TE, Wainwright M, et al (2021) Comparative effects of different phenothiazine photosensitizers on experimental periodontitis treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34:102198. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102198>
31. Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A (2012) Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dent Mater J* 31:1028–1032. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-172>
32. Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H (2002) Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18:318–323. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00056-2)
33. Ray RS, Agrawal N, Sharma A, Hans RK (2008) Use of L-929 cell line for phototoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* 22:1775–1781. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.06.015>

34. Gruber-Bzura BM, Bubko I, Szybor P, et al (2023) Quality and Purity of L929 Cell Cultures: Isoenzyme Profiles As a Sensitive Marker of Cross-Contamination. *Biopreservation Biobanking* 21:90–97. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0180>
35. International Organization for Standardization (2009) ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
36. Moro MG, De Carvalho VF, Godoy-Miranda BA, et al (2021) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. *Lasers Med Sci* 36:1573–1590. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03238-1>
37. Kassa CT, Salviatto LTC, Tortamano ACAC, et al (2023) Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle as adjuvant to periodontal treatment. Randomized, controlled, double-blind clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 41:103194. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103194>
38. Prates RA, Silva EG, Yamada AM, et al (2009) Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Phys* 19:1038–1044. <https://doi.org/10.1134/S1054660X09050284>
39. Krithikadatta J, Datta M, Gopikrishna V (2014) CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent* 17:301. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.136338>
40. Isil T, Ozlem K, Defne BH, et al (2023) Toxicity evaluation of indocyanine green mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 44:103754. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103754>
41. Silva CR (2015) Efeitos do laser de baixa intensidade em células de linhagem tumoral e fibroblastos submetidas à radiação ionizante. Dissertação, USP
42. Dias Schalch T, Porta Santos Fernandes K, Costa-Rodrigues J, et al (2016) Photomodulation of the osteoclastogenic potential of oral squamous carcinoma cells. *J Biophotonics* 9:1136–1147. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500292>
43. Schalch TD Efeito do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade, invasividade e potencial osteoclastogênico de células de carcinoma epidermoide de boca
44. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

45. Campos Chaves Lamarque G, Cusicanqui Méndez DA, Arruda Matos A, et al (2020) Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 29:101654. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101654>
46. Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology Annual Review*. Elsevier, pp 127–152
47. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, et al (1996) A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518–1520. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1518>
48. Vega-Avila E, Pugsley MK (2011) An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 54:10–14
49. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M (2016) Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016:pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
50. Da Collina GA, Cabral FV, Monteiro CM, et al (2022) The importance of combining methods to assess *Candida albicans* biofilms following photodynamic inactivation. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 38:102769. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102769>
51. Bolton JR, Linden KG (2003) Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in Bench-Scale UV Experiments. *J Environ Eng* 129:209–215. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2003\)129:3\(209\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:3(209))
52. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2003) The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B* 71:87–98. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002>
53. Paul P, Mati SS, Bhattacharya SC, Kumar GS (2017) Exploring the interaction of phenothiazinium dyes methylene blue, new methylene blue, azure A and azure B with tRNA^{Phe}: spectroscopic, thermodynamic, voltammetric and molecular modeling approach. *Phys Chem Chem Phys* 19:6636–6653. <https://doi.org/10.1039/C6CP07888E>
54. Shanmugaraj K, Anandakumar S, Ilanchelian M (2015) Unraveling the binding interaction of Toluidine blue O with bovine hemoglobin – a multi spectroscopic and molecular modeling approach. *RSC Adv* 5:3930–3940. <https://doi.org/10.1039/C4RA11136B>
55. Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US, Boston, MA

56. Biberoglu K, Yuksel M, Onder S, Tacal O (2022) Effects of toluidine blue O and methylene blue on growth and viability of pancreatic cancer cells. *Drug Dev Res* 83:900–909. <https://doi.org/10.1002/ddr.21915>
57. Er Karaoğlu G, Uğur Ydın Z, Erdönmez D, et al (2020) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy administered using methylene blue, toluidine blue and tetra 2-mercaptopyridine substituted zinc phthalocyanine in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32:102038. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102038>
58. OECD (2019) Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. OECD
59. Pereira LM, Portapilla GB, Brancini GTP, et al (2023) The potential of phenothiazinium dyes as cytotoxicity markers in cisplatin-treated cells. *Sci Rep* 13:10203. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36721-0>
60. Kashef N, Ravaei Sharif Abadi G, Djavid GE (2012) Photodynamic inactivation of primary human fibroblasts by methylene blue and toluidine blue O. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 9:355–358. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2012.05.001>
61. Tremblay J-F, Dussault S, Viau G, et al (2002) Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochem Photobiol Sci* 1:852–856. <https://doi.org/10.1039/b204385h>

ANEXO I – Dados brutos

Densidades ópticas obtidas no ensaio de viabilidade celular (MTT) de fibroblastos murinos L929 expostos ao butil azul de toluidina O (BuTBO), azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (MB), em concentrações de 100 a 0,39 μ M. As células foram incubadas com os fotossensibilizadores por 5 min, com leituras imediatas e após 24 h de incubação. Os valores representam médias $\pm$ desvio-padrão, calculados a partir de oito poços por condição experimental, em placas de 96 poços. Em todas as placas houve os respectivos controles negativo, positivo e branco

5 min contact / 0 h groth						
Concentração (mM)	BuTBO 24h		TBO 24h		MB 24h	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
100,00	0,656	0,236	0,906	0,080	0,834	0,293
50,00	0,771	0,202	0,916	0,138	0,929	0,242
25,00	0,880	0,206	0,988	0,132	0,953	0,271
12,50	0,896	0,238	0,965	0,079	0,925	0,184
6,25	0,985	0,199	0,956	0,129	0,993	0,289
3,13	1,029	0,219	0,818	0,109	0,948	0,152
1,56	1,064	0,170	0,921	0,127	0,922	0,210
0,78	0,994	0,202	0,891	0,216	0,877	0,158
0,39	1,001	0,186	0,845	0,106	1,045	0,310
0,00	1,000	0,125	1,000	0,140	1,000	0,124

5 min contact / 24 h groth						
Concentração (mM)	BuTBO 24h		TBO 24h		MB 24h	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
100,00	0,704	0,281	0,999	0,316	1,039	0,230
50,00	0,802	0,271	0,856	0,250	0,985	0,117
25,00	0,986	0,315	0,906	0,157	0,871	0,142
12,50	1,023	0,184	0,882	0,136	0,917	0,146
6,25	0,986	0,156	0,915	0,128	0,891	0,147
3,13	0,992	0,142	0,908	0,150	0,899	0,177
1,56	1,033	0,137	0,932	0,160	0,722	0,238
0,78	0,957	0,112	0,881	0,156	0,868	0,169
0,39	0,958	0,147	0,837	0,223	0,898	0,179
0,00	1,000	0,115	1,000	0,085	0,992	0,197

Densidades ópticas obtidas no ensaio de MTT após irradiação. Fibroblastos murinos L929 foram expostos por 5 min ao azul de metileno (AM), azul de toluidina O (TBO) ou butil azul de toluidina O (BuTBO) e, em seguida, irradiados com luz LED vermelho. Cada condição experimental foi realizada em quadruplicata, utilizando todas as linhas (A–H) das placas de 96 poços. Controle negativo- células e meio de cultura.

	AM	AM	AM	TBO	TBO	TBO	BUTBO	BUTBO	BUTBO	CTRL NEG
A	1,21	1,23	1,14	0,90	1,13	1,18	0,54	0,40	0,43	1,35
B	1,23	1,25	1,32	0,93	1,02	0,89	0,65	0,47	0,58	1,33
C	1,07	1,23	1,27	1,07	1,05	1,04	0,54	0,61	0,48	0,89
D	1,18	1,26	1,24	1,15	1,09	1,12	0,59	0,70	0,45	0,93
E	1,02	1,12	0,79	1,08	0,98	0,99	0,53	0,63	0,52	0,89
F	1,01	1,28	1,21	1,28	1,18	1,05	0,49	0,55	0,51	0,76
G	1,02	1,10	1,10	0,94	0,94	0,81	0,47	0,67	0,54	0,86
H	0,95	1,11	1,02	1,25	0,95	0,86	0,37	0,36	0,35	0,98
A	0,67	0,94	0,81	0,76	0,77	0,91	0,34	0,39	0,32	1,00
B	0,79	0,77	0,84	0,74	0,86	0,76	0,35	0,55	0,36	1,01
C	0,65	0,73	0,72	0,72	0,70	0,56	0,38	0,35	0,39	1,01
D	0,75	0,58	0,67	0,81	0,92	0,59	0,33	0,46	0,43	1,06
E	0,61	0,81	0,65	0,81	0,88	0,60	0,31	0,38	0,49	0,94
F	0,88	0,61	0,93	0,94	0,64	0,56	0,34	0,44	0,41	1,01
G	0,66	0,78	0,84	0,68	0,91	0,58	0,32	0,21	0,41	0,88
H	0,80	0,64	0,67	0,74	1,01	0,69	0,27	0,28	0,33	1,09
A	0,82	0,78	0,76	0,85	0,74	0,71	0,33	0,47	0,33	0,44
B	0,81	0,73	0,93	0,74	0,93	0,64	0,25	0,31	0,25	0,97
C	0,84	0,82	0,99	0,65	0,69	0,68	0,34	0,27	0,26	1,33
D	0,73	0,75	0,66	0,76	0,62	0,50	0,22	0,24	0,25	1,33
E	0,63	0,76	0,78	1,03	0,64	0,49	0,31	0,25	0,28	1,03
F	0,64	0,79	0,70	0,62	0,54	0,54	0,26	0,27	0,23	1,02
G	0,56	0,62	0,71	0,54	0,55	0,47	0,22	0,27	0,24	0,76
H	0,57	0,62	0,58	0,80	0,68	0,56	0,27	0,27	0,47	1,13
A	0,66	0,73	0,76	0,63	0,55	0,74	0,32	0,32	0,35	0,97
B	0,68	0,66	0,71	0,57	0,57	0,83	0,31	0,34	0,29	0,75
C	0,66	0,69	0,66	0,63	0,59	0,65	0,32	0,38	0,30	1,18
D	0,69	0,64	0,78	0,66	0,61	0,64	0,35	0,37	0,32	1,02
E	0,52	0,67	0,60	0,64	0,67	0,72	0,34	0,25	0,29	1,00
F	0,54	0,52	0,62	0,63	0,52	0,57	0,39	0,66	0,30	1,08
G	0,47	0,54	0,52	0,61	0,50	0,65	0,28	0,35	0,26	1,07
H	0,50	0,51	0,55	0,49	0,48	0,59	0,30	0,44	0,32	0,93

Densidade óptica média obtida pelo ensaio de cristal violeta (CV), realizado sob as mesmas condições experimentais do ensaio de MTT: fibroblastos murinos L929 foram expostos por 5 min ao azul de metileno (AM), azul de toluidina O (TBO) ou butil azul de toluidina O (BuTBO), seguidos de irradiação com luz LED vermelha. As análises foram conduzidas em quadruplicata em dias independentes, garantindo reprodutibilidade e robustez estatística dos resultados

	AM	TBO	BUTBO	CTRL
DIA 1	0,833	0,851	0,958	1,088
	0,842	0,801	0,884	1,020
	0,765	0,817	0,800	1,013
	0,737	0,826	0,927	0,987
	0,763	0,769	0,790	1,022
	0,906	0,867	0,920	1,012
	0,796	0,855	0,949	0,923
	0,844	0,794	0,841	0,934
	0,833	0,934	0,905	1,009
	0,753	0,824	0,931	1,135
	0,781	0,839	0,961	0,945
	0,730	0,801	0,840	0,994
	0,732	0,799	0,913	1,101
	0,745	0,860	0,866	0,920
	0,875	0,824	0,936	0,935
	0,824	0,855	1,016	0,961
	0,868	0,918	0,947	1,009
	0,946	0,783	0,949	1,135
	0,847	0,762	0,945	0,945
	0,820	0,785	0,972	0,994
	0,868	0,840	1,020	1,101
	0,894	0,822	0,913	0,920
	0,887	0,826	0,950	0,935
	0,837	0,908	0,922	0,961
DIA 2	0,693	0,795	0,941	0,925
	0,792	0,794	0,960	1,059
	0,790	0,782	1,001	0,942
	0,821	0,812	0,966	0,969
	0,802	0,924	0,885	1,060
	0,888	0,929	0,897	1,021
	0,819	0,875	0,896	0,951
	0,850	0,860	0,917	1,073
	0,740	0,927	0,927	0,925
	0,835	0,824	0,966	1,073
	0,891	0,847	0,925	1,109

	0,837	0,953	0,933	0,969
	0,954	0,879	0,916	0,972
	0,907	0,883	0,937	0,950
	0,869	0,834	0,955	1,039
	0,839	0,853	0,996	0,962
	0,785	0,888	0,919	0,925
	0,859	0,887	0,957	1,073
	0,878	0,890	1,029	1,109
	0,855	0,843	1,058	0,969
	0,909	0,864	0,968	0,972
	0,833	0,907	1,035	0,950
	0,890	0,887	0,922	1,039
	0,817	0,935	0,962	0,962
DIA 3	0,758	0,806	0,897	0,912
	0,849	0,981	0,948	1,016
	0,759	1,002	0,951	0,983
	0,845	0,981	0,983	1,068
	0,780	1,024	1,001	1,048
	0,793	0,989	1,019	0,998
	0,833	1,024	0,957	0,978
	0,708	0,948	0,924	0,995
	0,760	0,844	0,862	0,753
	0,972	1,010	0,912	0,981
	0,925	1,047	0,960	1,046
	0,973	1,007	0,919	1,057
	1,007	1,025	0,969	1,023
	0,952	1,060	0,946	1,059
	0,984	1,059	0,936	1,058
	0,900	1,035	0,921	1,023
	0,839	0,853	0,943	0,753
	1,060	1,005	1,050	0,981
	1,029	1,012	1,055	1,046
	0,998	1,033	1,052	1,057
	0,987	1,014	1,156	1,023
	1,012	0,970	1,028	1,059
	0,993	1,007	1,051	1,058
	0,885	0,989	0,962	1,023
DIA 4	0,909	0,830	0,823	0,913
	0,914	0,932	1,010	1,035
	0,886	0,948	1,020	1,010
	0,942	1,018	1,033	1,005
	0,899	0,995	1,000	1,060
	0,865	0,963	0,984	1,012
	0,863	0,967	0,984	1,003
	0,889	0,935	0,937	0,962

0,946	0,926	0,978	0,966
1,009	1,045	0,932	1,012
0,960	1,039	0,997	0,976
1,003	1,075	1,017	1,074
1,086	1,055	1,042	1,095
1,041	0,936	1,029	0,987
0,989	1,027	1,054	0,973
0,978	1,006	1,008	0,917
0,849	0,929	0,955	0,966
0,992	0,978	1,021	1,012
0,957	1,072	1,011	0,976
1,030	1,089	1,002	1,074
1,033	1,027	1,006	1,095
1,016	1,018	1,045	0,987
1,075	1,005	0,994	0,973
0,953	1,004	0,967	0,917

ANEXO II

Artigos publicados

1. Tortamano ACAC, Anselmo GG, Kassa CT, Godoy-Miranda B, Pavani C, Kato IT, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31: 101784. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101784
2. Moro MG, de Carvalho VF, Godoy-Miranda BA, Kassa CT, Horliana ACRT, Prates RA. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2021;36: 1573–1590. doi:10.1007/s10103-020-03238-1
3. Kassa CT, Salviatto LTC, Tortamano ACAC, Rost-Lima KS, Damante CA, Pavani C, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle as adjuvant to periodontal treatment. Randomized, controlled, double-blind clinical trial. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2023;41: 103194. doi:10.1016/j.pdpdt.2022.103194
4. Wince C, Kassa CT, Insper J, Amzallag D, Consonlandich W, Tortamano ACAC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy effects mediated by methylene blue in surfactant medium as an adjuvant treatment of teeth with apical periodontitis and presence of fistula—Protocol for randomized, controlled, double-blind clinical trial. Nosotti MG, editor. *PLoS ONE.* 2024;19: e0315169. doi:10.1371/journal.pone.0315169
5. González CSW, Kassa CT, Tortamano ACAC, Magalhães FD, Latorre JI, Rodriguez V, et al. Evaluation of Photodynamic Therapy in Teeth with Fistula and Apical Periodontitis: A Case Series. *J Adv Med Med Res.* 2024;36: 162–169. doi:10.9734/jammr/2024/v36i125663
6. Latorre JI, Gonçalves MLL, González CSW, Kassa CT, Rodriguez MS, Tortamano ACAC, et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with erythrosine and blue light emitting diode for inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Lasers Med Sci.* 2025;40: 189. doi:10.1007/s10103-025-04434-7

Artigos submetidos

- Artigo 1 - ***Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Butyl Toluidine Blue O for Inactivation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans Biofilm*** – Submetido à revista *Photochemical & Photobiological Sciences*, atualmente em revisão.
- Artigo 2 ***Photochemical improvement of antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue on periodontal pathogenic bacteria*** – Submetido à revista *Photochemical & Photobiological Sciences*, atualmente em revisão

Artigo 3 ***Antimicrobial Photodynamic Therapy with Butyl Toluidine Blue O for Inactivation of Candida albicans*** – Submetido à revista *Photochemical & Photobiological Sciences*, atualmente em revisão

ANEXO III CRIS - Lista de Verificação para Relato de Estudos

In Vitro

Seção / Tópico	Item nº	Item da lista de verificação	Relatado na página nº
Título e Resumo	1a	Identificação como estudo <i>in vitro</i> no título	
	1b	Resumo estruturado do desenho, métodos, resultados e conclusões	
Introdução	2a	Fundamentação científica e justificativa	
	2b	Objetivos ou hipóteses específicas	
Métodos	3	Intervenção para cada grupo, incluindo como e quando foi administrada (detalhes para replicação)	
	4	Desfechos: definição completa dos desfechos primários e secundários; como e quando foram avaliados	
	5	Como o tamanho amostral foi determinado	
	6	Método utilizado para gerar a sequência de alocação aleatória	
	7	Mecanismo utilizado para implementar a alocação / ocultação da sequência	
	8	Quem gerou a sequência de alocação, quem incluiu as amostras e quem as distribuiu nos grupos	
	9	Caso realizado, quem foi cegado e como os desfechos foram avaliados em cegamento	
	10	Métodos estatísticos utilizados para comparar grupos em relação aos desfechos primários/secundários	
Resultados	11a	Para cada grupo, número de amostras analisadas; se a análise foi feita pelos grupos originais	
	11b	Para cada desfecho primário/secundário, resultados para cada grupo, tamanho do efeito, precisão (ex.: IC95%)	
Discussão	12a	Limitações: fontes potenciais de viés, imprecisão, multiplicidade de análises	
	12b	Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados	
	12c	Interpretação consistente com os resultados, equilibrando benefícios e limitações, considerando outras evidências	
Outras Informações	13 ^a	Onde o protocolo completo pode ser acessado, se disponível	

	13b	Fontes de financiamento / outro suporte; papel dos financiadores	
--	-----	--	--

ANEXO IV. Manual de Experimentos em Cultura Celular

2023

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Manual para elaboração de experimentação em cultura celular

SÃO PAULO

2023

Manual para elaboração de experimentação cultura celular

Este manual tem o objetivo de orientar, uniformizar e garantir a reprodutibilidade e confiabilidade em estudos científicos que envolvem o uso de cultura celular em laboratório. Ainda, ele permite que pesquisadores realizem sua pesquisa de maneira adequada, com rigor metodológico e com capacidade de reprodução de seus métodos e resultados.

As diretrizes aqui apontadas são úteis e imprescindíveis não apenas para consulta ao longo de todas as etapas do estudo científico, mas também para garantir publicações de excelência.

Abaixo seguem importantes informações para serem consideradas em todos os estudos científicos em animais, a fim de garantir confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

I. Desenho do Estudo ([itens 1, 2 do checklist](#))

Para cada experimento, descreva detalhes dos grupos experimentais, incluindo grupo controle. Se um grupo controle não for usado, isto deve ser justificado. Descreva e justifique o tamanho da amostra (número de células) especificando informações como:

- Procedência das células:
 - (a) Cultura primária: célula obtida a partir de doador (especificar animal, paciente). Incluir dados do Comitê de Ética em Humanos ou do Comitê de Experimentação Animal dependendo de quem foi o doador.
 - (b) Linhagem celular: incluir a origem da linhagem celular com seu respectivo número de registro (catálogo) e empresa fornecedora e/ou Instituição que doou as células após estabelecimento da linhagem.
- Definição de grupos experimentais:
Explique como serão distribuídas as células nos diferentes grupos experimentais.

II. Critérios de controle ([item 3 do checklist](#))

- a) Descreva os critérios de controle utilizados para o experimento, incluindo percentual de células viáveis, condição de confluência (número de células/área).
- b) Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, proliferação, marcadores celulares e moleculares).

III. Métodos estatísticos ([item 4 do checklist](#))

Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. Incluir detalhadamente o número de repetições de cada experimento.

IV. Procedimentos experimentais

Descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo:

- Condições de cultivo: temperatura, tipo de meio, suplementações (soro, fatores de crescimento, antifúngicos, antibióticos entre outros).
- Para cada análise, relate o número de células em cada grupo experimental, número de replicatas para cada grupo experimental. Incluir detalhadamente a condição experimental (placa, quantidade de poços/placas, frascos de cultivo) e distribuição dos grupos experimentais.
- Intervenção realizada (tratamento): quando e com que frequência.
- Incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação e das passagens utilizadas.
- Justifique os procedimentos.

V. Embasamento científico

- Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e quando apropriado, a hipótese do estudo.
- Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou Humanos se aplicável (cultura primária) e quaisquer números de licença ou protocolo.
- Descreva detalhes das condições de armazenamento (linhagem e primária, se aplicável): descrever detalhadamente o meio e temperatura para congelamento/armazenamento.
- Descreva quaisquer cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar a contaminação.
- Comente as limitações do estudo.
- Definir possíveis cegamentos se aplicáveis especialmente se a análise for qualitativa (ex morfologia celular). Sequência de alocação, randomização às cegas. Exemplo. Geralmente, é o mesmo pesquisador que prepara a amostra, semeia em wells e coleta os resultados. O mais interessante é o trabalho com 2 pessoas, onde um faz a alocação sem que o outro saiba (blind). Apenas no final as informações são reveladas.

VI. Declaração de interesses

- Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não.
- Caso não exista, isso deve ser declarado.
- Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do (s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

Este checklist para estudos em cultura celular deve ser incluído como ANEXO nos projetos e teses de acordo com a fase descrita abaixo:

- Qualificação de mestrado e primeira qualificação de doutorado: incluir como ANEXO o Checklist Pré realização;
- Segunda qualificação do doutorado, dissertações e teses: incluir como ANEXO o Checklist Pós realização adaptado do ARRIVE

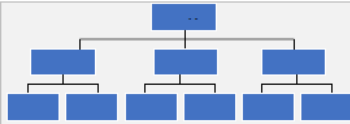
Referências: Checklist para estudos em cultura celular elaborado pelos docentes dos PPGB e PPGM.

Fase PRÉ REALIZAÇÃO.

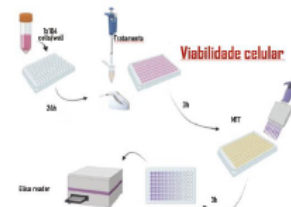
CHECKLIST EM CULTURA CELULAR				
Itens que devem ser incluídos no projeto. Sem essas informações, os avaliadores não serão capazes de avaliar o seu projeto/dissertação/tese.				
Tópico	Nº item	Recomendação	Pag. que o autor deve inserir no seu projeto	Observações / Exemplos

Desenho do estudo	1	• Descreva os grupos experimentais, incluindo grupo controle. • Descreva a procedência das células: cultura primária ou linhagem celular. • Para cultura primária: Incluir os dados do Comitê de Ética em Humanos ou do Comitê de Experimentação Animal dependendo de quem foi o doador • Explique como serão distribuídas as células nos diferentes grupos experimentais.		O que fazer: estabelecer os grupos experimentais que serão usados no estudo, número de células por grupos e períodos de análise. Como fazer: criar um fluxograma contendo a distribuição das células nos diferentes grupos experimentais. Ex:
Tamanho da amostra	2a	Especifique o número de células em cada grupo e o número total em cada experimento. Indique no fluxograma o número total de células por experimento e por amostra.		O que fazer: completar o fluxograma Como fazer: incluir o número total de células a serem utilizadas, a distribuição das células em grupos experimentais e número por grupo, incluir os períodos de análise.

	2b	Explique como o número de células foi definido para seu experimento/análise. (sugerido incluir a escolha do número de células com base nas análises a serem realizadas).	O que fazer: explicar o cálculo de número de células dependendo do tipo de célula e experimento. Como fazer: incluir referências que utilizaram o mesmo número em análises semelhantes.
Critérios de controle	3	Descreva os critérios de controle utilizados para o experimento, incluindo percentual de células viáveis, condição de confluência (número de células/área).	O que fazer: Verificar as condições desejáveis das células para o experimento. Como fazer: descrever os critérios de controle utilizados. Ex: Serão utilizadas culturas com 90% células viáveis e em confluência de 80%. O monitoramento das células será realizado a cada 48h.
Cegamento	4	Explique se houve algum cegamento para contagem celular dos resultados ou alguma análise qualitativa (ex morfologia celular) entre os grupos experimentais. Descrever se o mesmo pesquisador prepara a amostra, semeia em wells, coleta os resultados e os analisa.	O que fazer: verificar como foi realizado o cegamento nestas diferentes fases do experimento (alocação, condução e análise dos resultados) Como fazer: incluir tudo que foi "cegado" para a análise dos resultados. Ex: Análise de resultados "cega" de morfologia celular: pesquisador recebe os resultados sem identificação dos grupos experimentais
Desfechos	5	Defina claramente todos os desfechos que serão avaliados (ex: morte celular, proliferação, marcadores celulares e moleculares)	O que fazer: explicar detalhadamente os desfechos escolhidos. Como fazer: Incluir no fluxograma os desfechos escolhidos para o experimento.

			
Procedimentos experimentais	6a	Condições de cultivo: temperatura, tipo de meio, suplementações (soro, fatores de crescimento, antifúngicos, antibióticos entre outros).	O que fazer: incluir as informações sobre as condições de cultivo de forma detalhada. Como fazer: incluir de forma detalhada: temperatura, tipo de meio, suplementações durante todas as fases do experimento. Exemplo: as células L929 foram mantidas em meios de cultivo DMEM suplementado com 10% SFB e durante os experimentos a suplementação foi reduzida para 5%.

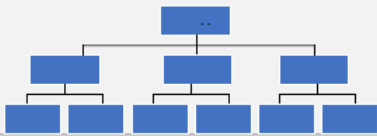
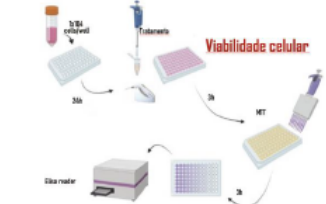
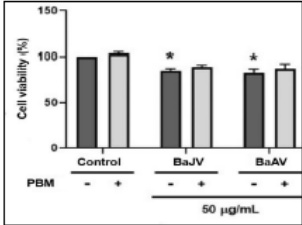
	6b	Para cada análise, relate o número de células em cada grupo experimental e número de replicatas. Incluir detalhadamente a condição experimental (placa, quantidade de poços/placa, frascos de cultivo) e distribuição dos grupos experimentais. Intervenção realizada (tratamento): quando e com que frequência.	O que fazer: incluir as informações sobre a intervenção/tratamento nos diferentes grupos experimentais, incluindo material usado (placa/poços) e frequência de realização. Como fazer: descrever os detalhes de procedimento e, se possível, adicionar um exemplo/guia de como o experimento foi realizado. Incluir número de replicatas e frequência da intervenção. Exemplo: figura representando o procedimento experimental.
Métodos estatísticos	7	Descreva em detalhes os métodos estatísticos utilizados em cada análise, incluindo o software utilizado.	O que fazer: incluir como será realizada a análise estatística de forma clara e detalhada. Como fazer: descrever o programa (software) que será utilizado para a análise estatística, como os dados serão apresentados, qual(is) teste(s) será(ão) utilizado(s). Ex: Programa GraphPad Prism versão X, avaliação da distribuição dos dados.



Fase PÓS REALIZAÇÃO.

CHECKLIST EM CULTURA CELULAR				
Itens que devem ser incluídos no projeto. Sem essas informações, os avaliadores não serão capazes de avaliar o seu projeto/dissertação/tese.				
Tópico	Nº item	Recomendação	Pág. que consta esse item no seu projeto	Observações / Exemplos

Desenho do estudo	1	- Descreva os grupos experimentais, incluindo grupo controle. - Descreva a procedência das células: cultura primária ou linhagem celular. - Para cultura primária: Incluir os dados do Comitê de Ética em Humanos ou do Comitê de Experimentação Animal dependendo de quem foi o doador - Explique como serão distribuídas as células nos diferentes grupos experimentais.		O que fazer: estabelecer os grupos experimentais que serão usados no estudo, número de células por grupos e períodos de análise. Como fazer: criar um fluxograma contendo a distribuição das células nos diferentes grupos experimentais. Ex:
Tamanho da amostra	2a	Especifique o número de células em cada grupo e o número total em cada experimento. Indique no fluxograma o número total de células por experimento e por amostra.		O que fazer: completar o fluxograma Como fazer: incluir o número total de células a serem utilizadas, a distribuição das células em grupos experimentais e número por grupo, incluir os períodos de análise.
	2b	Explique como o número de células foi definido para seu experimento/análise. (sugerido incluir a escolha do número de células com base nas análises a serem realizadas).		O que fazer: explicar o cálculo de número de células dependendo do tipo de célula e experimento. Como fazer: incluir referências que utilizaram o mesmo número em análises semelhantes.
Crítérios de controle	3	Descreva os critérios de controle utilizados para o experimento, incluindo percentual de células viáveis, condição de confluência (número de células/área).		O que fazer: Verificar as condições desejáveis das células para o experimento. Como fazer: descrever os critérios de controle utilizados. Ex. Serão utilizadas culturas com 90% células viáveis e em confluência de 80%. O monitoramento das células será realizado a cada 48h.
Cegamento	4	Explicar se houve algum cegamento para contagem celular dos resultados ou alguma análise qualitativa (ex morfologia celular) entre os grupos experimentais. Descrever se o mesmo pesquisador prepara a amostra, semeia em wells, coleta os resultados e os analisa.		O que fazer: verificar como foi realizado o cegamento nestas diferentes fases do experimento (alocação, condução e análise dos resultados) Como fazer: incluir tudo que foi "cegado" para a análise dos resultados. Ex: Análise de resultados "cega" de morfologia celular: pesquisador recebe os resultados sem identificação dos grupos experimentais

Desfechos	5	Defina claramente todos os desfechos que serão avaliados (ex: morte celular, proliferação, marcadores celulares e moleculares)	O que fazer: explicar detalhadamente os desfechos escolhidos. Como fazer: Incluir no fluxograma os desfechos escolhidos para o experimento. 
Procedimentos experimentais	6a	Condições de cultivo: temperatura, tipo de meio, suplementações (soro, fatores de crescimento, antifúngicos, antibióticos entre outros).	O que fazer: incluir as informações sobre as condições de cultivo de forma detalhada. Como fazer: incluir de forma detalhada: temperatura, tipo de meio, suplementações durante todas as fases do experimento. Exemplo: as células L929 foram mantidas em meios de cultivo DMEM suplementado com 10% SFB e durante os experimentos a suplementação foi reduzida para 5%.
	6b	Para cada análise, relate o número de células em cada grupo experimental e número de replicatas. Incluir detalhadamente a condição experimental (placa, quantidade de poços/placas, frascos de cultivo) e distribuição dos grupos experimentais. Intervenção realizada (tratamento): quando e com que frequência.	O que fazer: incluir as informações sobre a intervenção/tratamento nos diferentes grupos experimentais, incluindo material usado (placa/poços) e frequência de realização. Como fazer: descrever os detalhes de procedimento e, se possível, adicionar um exemplo/guia de como o experimento foi realizado. Incluir número de replicatas e frequência da intervenção. Exemplo: figura representando o procedimento experimental. 
Métodos estatísticos	7	Descreva em detalhes os métodos estatísticos utilizados em cada análise, incluindo o software utilizado.	O que fazer: incluir como será realizada a análise estatística de forma clara e detalhada. Como fazer: descrever o programa (software) que será utilizado para a análise estatística, como os dados serão apresentados, qual(is) teste(s) será(ão) utilizado(s). Ex: Programa GraphPad Prism versão X, avaliação da distribuição dos dados.
Resultados	8	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: - Incluir figuras e tabelas ilustrando os resultados encontrados bem como imagens quando aplicáveis. - Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade, quando aplicável (ex: média e desvio- padrão, ou mediana e amplitude) - Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança	O que fazer: descrever os resultados incluindo as respectivas análises estatísticas.. Como fazer: descrever adequadamente os resultados, a escolha dos testes estatísticos e de como os dados foram expressos. Ex:  Figura 1: Resultados da viabilidade celular (MTT) expressos em médias e erro padrão, teste ANOVA one way e pós teste Tukey, incluir valor de P (significância).