

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

MONIQUE DE SOUZA

**BIOFOTOTÉRMICA E ESPECTROSCOPIA ÓPTICA PARA O ESTUDO DE  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE MATERIAIS PARA ODONTOLOGIA**

Maringá  
2024

MONIQUE DE SOUZA

**BIOFOTOTÉRMICA E ESPECTROSCOPIA ÓPTICA PARA O ESTUDO DE  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE MATERIAIS PARA ODONTOLOGIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Física.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Maringá  
2024

MONIQUE DE SOUZA

**BIOFOTOTÉRMICA E ESPECTROSCOPIA ÓPTICA PARA O ESTUDO DE  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE MATERIAIS PARA ODONTOLOGIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Física.

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Luzmarina Hernandez  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Sandro Marcio Lima  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

---

Profa. Dra. Debora Lopes Salles Scheffel  
University of Kentucky

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Paulo "*in memoriam*" e Maria Tereza,  
por sempre acreditarem em mim e  
por serem exemplos de dedicação ao  
longo de minha vida.

# Agradecimentos

Esta tese de doutorado representa a realização de um sonho, produto de muita dedicação e da contribuição de muitos.

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e por me dar coragem para enfrentar os desafios.

Ao meu orientador, professor Mauro Luciano Baesso, pela oportunidade de realizar este doutorado, por despertar meu interesse pela pesquisa e pelos ensinamentos científicos e pessoais transmitidos ao longo destes anos.

À minha família, por todo apoio e incentivo durante esta trajetória.

À professora Francielle Sato, por sempre me receber de forma gentil e me auxiliar nos momentos de dúvidas. Você foi essencial durante esta jornada.

Aos professores, Antonio Medina Neto, Antonio Carlos Bento, Luis Carlos Malacarne e Vitor Santaella Zanutto por todo conhecimento compartilhado, fundamental para o meu crescimento acadêmico.

Aos companheiros do grupo de pesquisa, por toda a ajuda nas dificuldades do laboratório e pelas diversas discussões, científicas ou não. Em especial, agradeço à Fernanda Midori Tsuzuki por todo o apoio, conversas e momentos de descontração. Você se tornou uma grande amiga.

As professoras Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, Melyssa Fernanda Norman Negri e Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça e aos professores Lourenço Correr Sobrinho e Paulo Henrique dos Santos, juntamente com seus alunos, pela colaboração e disponibilização dos materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro concedido.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), pelos equipamentos disponibilizados para a execução deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá. Sou grata e tenho muito orgulho em me formar nessa universidade, exemplo de excelência acadêmica.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para esta realização.

Muito obrigada a todos!

# Resumo

Os métodos espectroscópicos vêm cada vez mais se transformando em importantes ferramentas na área de ciências biológicas e da saúde, com evidentes avanços recentes que apontam para efetiva aplicação no diagnóstico clínico. Em especial, as técnicas denominadas de biofototérmicas já ocupam lugar de destaque neste cenário visando detecção precoce de doenças, análise físico-química dos tecidos e difusão de formulações farmacêuticas. Nesta tese, técnicas biofototérmicas e espectroscópicas tradicionais são aplicadas no estudo de diferentes formulações farmacêuticas e de materiais restauradores para odontologia. Na primeira etapa, a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) e no Ultravioleta-Visível (UV-Vis-PAS) foram empregadas para determinar a difusão ungueal e as interações físico-químicas de formulações farmacêuticas de uso tópico, desenvolvidas como possíveis alternativas para o tratamento da onicomicose: 1) FTIR-PAS para avaliar a difusão ungueal de formulações de esmaltes contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim; 2) UV-Vis-PAS para o estudo de nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato glicólico de própolis; 3) UV-Vis-PAS para avaliar a difusão de uma formulação contendo hipericina em unhas saudáveis e acometidas por diferentes cepas fúngicas. Na segunda etapa, dois estudos com a espectroscopia vibracional foram realizados para a análise de materiais dentários usados em restaurações cerâmicas: 1) Espectroscopia Raman (RS) para avaliar transformação de fase e tensão residual na superfície de diferentes cerâmicas odontológicas de zircônia tratadas com jateamento de partículas de óxido de alumínio ou com plasma de argônio não térmico; 2) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier via Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) e RS para a avaliação do grau de conversão de cimentos resinosos fotoativados sob cerâmicas odontológicas de zircônia ou dissilicato de lítio com diferentes níveis de translucidez e espessuras. De maneira abrangente, os resultados dos estudos da primeira etapa mostraram a difusão na unha de todas as formulações avaliadas, com exceção do extrato glicólico de própolis. Além disso, os espectros não mostraram formação de novas bandas ou deslocamento de bandas, indicando que não ocorreu interações entre as formulações e a estrutura ungueal. Por sua vez, os resultados dos estudos da segunda etapa mostraram que: 1) a análise por RS não detectou transformação da fase tetragonal para monoclinica e nem tensão residual na superfície das diferentes cerâmicas de zircônia tratadas com plasma de argônio não térmico, resultados relevantes para a aplicação pretendida; 2) determinadas condições testadas afetaram negativamente o grau de conversão dos cimentos resinosos, com a

material cerâmico mais espesso e opaco promovendo menores valores de grau de conversão. Em conclusão, os resultados desta tese mostraram mais uma vez que as técnicas biofototérmicas e espectroscópicas são ferramentas importantes no processo de avaliação de novas formulações farmacêuticas de administração tópica e na determinação do comportamento de fatores que podem influenciar a longevidade de restaurações cerâmicas de interesse para a odontologia.

**Palavras-chave:** Espectroscopia Fotoacústica. Espectroscopia no Infravermelho. Espectroscopia Raman. Onicomiose. Permeação ungueal. Cerâmicas dentárias. Grau de conversão.

# Abstract

Spectroscopic methods are increasingly becoming important tools in the area of biological and health sciences, with recent advances that point to their effective application in clinical diagnosis. In particular, the so-called biophotothermal techniques already occupy a prominent place in this scenario, aiming for the early detection of diseases, physical-chemical analysis of tissues, and dissemination of pharmaceutical formulations. In this thesis, biophotothermal and traditional spectroscopic techniques are applied for study of different pharmaceutical formulations and restorative materials for dentistry. In the first part of the thesis, Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS) and Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis-PAS) were used to determine the nail diffusion and physicochemical interactions of pharmaceutical formulations for topical use, developed as possible alternatives for the treatment of onychomycosis: 1) FTIR-PAS to evaluate the nail diffusion of nail lacquer formulations containing biogenic silver nanoparticles and oregano and rosemary essential oils; 2) UV-Vis-PAS for the study of silver nanoparticles biosynthesized from propolis glycolic extract; 3) UV-Vis-PAS to evaluate the diffusion of a formulation containing hypericin in healthy nails and those affected by different fungal strains. In the second part, two vibrational spectroscopy studies were carried out to analyze dental materials used in ceramic restorations: 1) Raman Spectroscopy (RS) to evaluate phase transformations and residual stress on the surface of different zirconia dental ceramics treated with sandblasting with aluminum oxide particles or non-thermal argon plasma; 2) Fourier Transform Infrared Spectroscopy via Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) and RS for evaluating the degree of conversion of photoactivated resin cement under zirconia or lithium disilicate dental ceramics with different levels of translucency and thicknesses. Comprehensively, the results showed the diffusion in the nail of all formulations evaluated, except for propolis glycolic extract. Furthermore, the spectra did not show the formation of new bands or band shifting, indicating no occurrence of interactions between the formulations and the nail structure. In turn, the results of the second part of the thesis showed that: 1) the RS analysis did not detect transformation from the tetragonal to the monoclinic phase nor residual stress on the surface of the different zirconia ceramics treated with non-thermal argon plasma, results that are relevant to the intended application; 2) certain conditions tested negatively affected the degree of conversion of resin cement, with thicker and more opaque ceramic material promoting lower values of degree of conversion. In conclusion, the results of this thesis showed once again that biophotothermal and spectroscopic techniques are important tools in the process of evaluating new pharmaceutical

formulations for topical administration and in determining the behavior of factors that can influence the longevity of ceramic restorations of interest to dentistry. The results contribute towards the establishment of these methods for future clinical diagnosis.

**Keywords:** Photoacoustic Spectroscopy. Infrared Spectroscopy. Raman Spectroscopy. Onychomycosis. Nail permeation. Dental ceramics. Degree of conversion.

# Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema representativo da anatomia da unidade ungueal humana e das camadas da placa ungueal. 1. borda ungueal livre; 2. placa ungueal; 3. dobra ungueal lateral; 4. lúnula; 5. cutícula; 6. dobra ungueal proximal; 7. hiponíquio; 8. leito ungueal; 9. matriz ungueal. Adaptado das referências [20, 23, 24]. .....20
- Figura 2.** (A) Representação esquemática da preparação das amostras para o estudo *ex vivo* da permeação ungueal dos esmaltes e do posicionamento para a aquisição dos espectros. (B) Representação esquemática da célula fotoacústica. Adaptado da referência [36]. .....28
- Figura 3.** Espectros obtidos por FTIR-PAS das formulações de esmalte. Adaptado da referência [36]. .....30
- Figura 4.** Espectros obtidos por FTIR-PAS de amostras de unha controle e de unha com aplicação da formulação de esmalte na superfície dorsal. Adaptado da referência [36]. 31
- Figura 5.** Valor médio das áreas obtidos por meio de integração e com subtração da área do controle. \* ( $P < 0,05$ ) formulações que diferem a letra são estatisticamente diferentes pela análise *One-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. Adaptado da referência [36]. .32
- Figura 6.** Estrutura química de compostos importantes presentes em óleos essenciais. (A) limoneno; (B) timol; (C) 1,8-cineol; (D) geraniol; (E) bisabolol; (F) farneseno; (G) eugenol. Reproduzido da referência [36]. .....33
- Figura 7.** Representação da montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica utilizada no presente estudo. Adaptado da referência [55]. .....38
- Figura 8.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS do extrato glicólico de própolis (GPE) e das nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do extrato glicólico de própolis (AgNPs-GPE). Para efeito de comparação, também é mostrado o espectro da solução aquosa de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) utilizada no processo de síntese. ....40
- Figura 9.** Espectros de absorção UV-Vis do propilenoglicol e das AgNPs-GPE (a). Imagens obtidas por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão de AgNPs-GPE na escala de 200 nm com ampliação 60.000x (b) e na escala de 20 nm com ampliação de 300.000x (c). Adaptado da referência [93]. .....42
- Figura 10.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS da superfície dorsal de unhas antes e após aplicação do GPE ou das AgNPs-GPE.....43
- Figura 11.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS da superfície ventral de unhas antes e após aplicação do GPE ou das AgNPs-GPE. Na inserção está apresentada a área sob a curva obtida

por meio de integral na região de 300 a 700 nm.....	44
<b>Figura 12.</b> Espectros obtidos por UV-Vis-PAS do DMSO, do pó de hipericina e da solução preparada com a mistura destas substâncias (Hip) [6].....	49
<b>Figura 13.</b> Espectros obtidos por UV-Vis-PAS de unhas saudáveis sem e com a aplicação de solução de hipericina (Hip) na superfície dorsal. Em (A, B e C) espectros das unhas das mãos e (D, E e F) das unhas dos pés. A ampliação destaca a presença das bandas características da formulação em 560 e 600 nm. Adaptado da referência [6]. .....	50
<b>Figura 14.</b> Área obtida por meio de integração dos espectros de UV-Vis- PAS da superfície dorsal de amostras de unhas saudáveis das mãos e dos pés que receberam a aplicação de solução de hipericina, com subtração da área do controle. teste t: * $P < 0,05$ . Adaptado da referência [6]. .....	51
<b>Figura 15.</b> Espectros obtidos por FTIR-ATR dos agentes etiológicos e das superfícies dorsal e ventral de unhas sem e com onicomicose. Em (A e B) onicomicose causada por <i>Fusarium solani</i> (ID 02) e em (C e D) <i>Trichophyton rubrum</i> (ID 03). Controle: fragmentos de unha saudáveis coletados dos respectivos pacientes. $\nu$ : modo de vibração de estiramento; $\nu_{as}$ : estiramento assimétrico; $\nu_s$ : estiramento simétrico; $\delta$ : modo de vibração de deformação angular[6]. .....	52
<b>Figura 16.</b> Espectros obtidos por UV-Vis-PAS das superfícies dorsal e ventral de unhas com onicomicose após a aplicação de solução de hipericina (Hip) na superfície dorsal. Em (A e B) onicomicose causada por <i>Fusarium solani</i> (ID 02) e em (C e D) <i>Trichophyton rubrum</i> (ID 03). Controle: fragmentos de unha saudáveis coletados dos respectivos pacientes sem Hip. Adaptado da referência [6]. .....	53
<b>Figura 17.</b> Fotografias das unhas dos pacientes ID 01, ID 02 e ID 03 tratados com PDT mediada por hipericina. Em (A, D e G), unhas antes do tratamento. Em (B, E e H), unhas após quatro sessões do tratamento, quando foi observada a cura micológica. Em (C, F e I), unhas saudáveis, caracterizando o final do tratamento. Reproduzido da referência [6].	55
<b>Figura 18.</b> Espectros Raman das superfícies de cerâmicas de zircônia (A) 3Y, (B) STML e (C) UTML antes e após tratamento com jateamento de partículas de óxido de alumínio ou com plasma de argônio. Os picos da zircônia tetragonal e monoclinica são indexados com t e m, respectivamente.....	60
<b>Figura 19.</b> Espectros Raman das cerâmicas de zircônia sem tratamento de superfície. A linha pontilhada indica o deslocamento da banda centrada em $643\text{ cm}^{-1}$ . .....	63
<b>Figura 20.</b> Posição do pico Raman da zircônia tetragonal em torno de $147\text{ cm}^{-1}$ em função dos tratamentos de superfície. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M; n = 10 amostras/grupo.....	64
<b>Figura 21.</b> Fluxograma detalhando a divisão dos grupos experimentais.....	69

<b>Figura 22.</b> Fluxograma do estudo. Adaptado da referência [140].	70
<b>Figura 23.</b> Espectros obtidos por FTIR-ATR das amostras de cimento resinoso RelyX Ultimate (RUL) antes e após fotoativação sob as cerâmicas de zircônia (A) MT e (B) MO com diferentes espessuras. A ampliação evidencia os picos em $1637\text{ cm}^{-1}$ (C=C alifático) e $1608\text{ cm}^{-1}$ (C=C aromático).	72
<b>Figura 24.</b> Grau de conversão de amostras de cimento resinoso RelyX Ultimate em função das espessuras das cerâmicas de zircônia MT e MO. Cada ponto representa a média $\pm$ D.P.M de 10 amostras por grupo.	73
<b>Figura 25.</b> Espectros Raman das amostras dos cimentos resinosos Multilink N (M) e Variolink Esthetic LC (V) evidenciando os picos em $1638\text{ cm}^{-1}$ (C=C alifático) e $1609\text{ cm}^{-1}$ (C=C aromático), antes e após a fotoativação sob as cerâmicas de dissilicato de lítio HT, LT e MO com diferentes espessuras [140].	74
<b>Figura 26.</b> Grau de conversão dos cimentos resinosos Multilink N (M) e Variolink Esthetic LC (V) em função das espessuras das cerâmicas de dissilicato de lítio (HT, LT e MO). Cada ponto representa a média $\pm$ D.P.M de 9 amostras por grupo.	75

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Composição das formulações de esmalte. Adaptado da referência [36].....	27
<b>Tabela 2.</b> Resumo dos grupos experimentais.....	59
<b>Tabela 3.</b> Média da fração volumétrica de fase monocínica obtida por meio da equação 3 .....	62

# Lista de Abreviaturas e Siglas

AgNPs	Nanopartículas de prata
AgNPs-GPE	Nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do extrato glicólico de própolis
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
Bio-NPAg	Nanopartículas de prata biogênicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAG	Formulação contendo nanopartículas de prata biogênicas
FB	Formulação base
FOA	Formulação contendo óleo essencial de alecrim
FOAAG	Formulação contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim
FOO	Formulação contendo óleo essencial de orégano
FTIR-ATR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier via reflectância total atenuada
FTIR-PAS	Espectroscopia Fotoacústica no infravermelho por transformada de Fourier
GPE	Extrato glicólico de própolis
Hip	Solução de hipericina
HT	Cerâmica com alta translucidez
ID02	Fragmentos de unha do pé do paciente 02 com onicomicose causada por <i>Fusarium solani</i>
ID03	Fragmentos de unha do pé do paciente 03 com onicomicose causada por <i>Trichophyton rubrum</i>
JAT	Jateamento com partículas de óxido de alumínio
LT	Cerâmica com baixa translucidez
MO	Cerâmica com média opacidade
MT	Cerâmica com média translucidez
OEA	Óleo essencial de alecrim
OEO	Óleo essencial de orégano
PDT	Terapia fotodinâmica

PLA	Plasma de argônio não térmico
RS	Espectroscopia Raman
STML	Zircônia super translúcida
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UTML	Zircônia ultra translúcida
UV-Vis-PAS	Espectroscopia Fotoacústica no ultravioleta e visível
$\mu_s$	Comprimento de difusão térmica
$V_m$	Fração volumétrica de fase monoclinica
3Y	Zircônia tetragonal policristalina clássica

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Espectroscopia Fotoacústica para análise de difusão de formulações farmacêuticas de uso tópico para terapêutica de onicomicose</b>	<b>19</b>
2.1	Considerações iniciais: unha e onicomicose .....	19
2.1.1	Esmaltes contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim .....	25
2.1.1.1	Introdução.....	25
2.1.1.2	Procedimento experimental .....	26
2.1.1.3	Resultados e discussão.....	29
2.1.2	Nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato glicólico de própolis.....	35
2.1.2.1	Introdução.....	35
2.1.2.2	Procedimento experimental .....	37
2.1.2.3	Resultados e discussão.....	39
2.1.3	Formulação de hipericina em DMSO para terapia fotodinâmica .....	46
2.1.3.1	Introdução.....	46
2.1.3.2	Procedimento experimental .....	47
2.1.3.3	Resultados e discussão.....	48
<b>3</b>	<b>Espectroscopia Raman e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier via Reflectância Total Atenuada para análise de materiais dentários</b>	<b>56</b>
3.1	Cerâmicas odontológicas de zircônia.....	56
3.1.1	Introdução.....	56
3.1.2	Procedimento experimental .....	58
3.1.3	Resultados e discussão.....	59
3.2	Cimentos resinosos .....	66
3.2.1	Introdução.....	66
3.2.2	Procedimento experimental .....	68
3.2.3	Resultados e discussão.....	70
<b>4</b>	<b>Conclusão</b>	<b>78</b>
<b>A</b>	<b>Artigos Publicados</b>	<b>80</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>82</b>

# Capítulo 1

## Introdução

Métodos espectroscópicos estão cada vez mais se tornando ferramentas valiosas no campo das ciências biológicas e da saúde. Embora nos dias de hoje exista um amplo espectro de métodos de análise que proporcionam instrumentos para diagnóstico clínico e investigação científica, há lacunas que poderiam ser minimizadas com a utilização de métodos espectroscópicos não convencionais como aqueles baseados nas técnicas biofototérmicas e em espectroscopias de infravermelho por transformada de Fourier e espalhamento Raman. Essas técnicas permitem extrair informações relacionadas aos constituintes moleculares e suas estruturas eletrônicas ou vibracionais de um material, o que possibilita, por exemplo, a identificação de alterações vinculadas a um estado patológico específico [1–4].

O termo biofototérmica vem sendo adotado recentemente por pesquisadores para arranjos experimentais dedicados especialmente ao estudo de sistemas biológicos compreendendo obtenção de imagens, avaliação físico-química de tecidos saudáveis, infectados por patógenos, acometidos por neoplasias, etc., além de possibilitar a determinação da difusão de formulações farmacêuticas ao longo de tecidos biológicos. A Espectroscopia Fotoacústica (PAS) é uma destas técnicas biofototérmicas, a qual tem sido utilizada como ferramenta para o estudo da dinâmica de difusão de formulações de uso tópico e para se avaliar as interações físico-químicas das formulações com os tecidos biológicos. Diversos estudos a evidenciam como um método de apoio para o diagnóstico clínico e de acompanhamento durante ações terapêuticas, como por exemplo, no tratamento de infecções fúngicas [5–7]. Essa técnica se baseia na absorção de luz modulada pela matéria, com posterior geração de calor. Como consequência desses efeitos, tem-se flutuações de pressão e ondas acústicas detectáveis, que resultam no sinal Fotoacústico [8]. O método pode ser realizado nas regiões espectrais do ultravioleta e visível (UV-Vis-PAS), do infravermelho próximo (NIR-PAS) e do infravermelho médio por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) [9].

A espectroscopia vibracional, abrangendo a espectroscopia no infravermelho por

transformada de Fourier via reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e a espectroscopia Raman (RS), também vem sendo empregada como instrumento no campo das avaliações biológicas e clínicas nas últimas décadas [4, 10]. A FTIR-ATR é uma técnica que envolve os fenômenos de reflexão e absorção. Nesta abordagem o material testado está em contato direto com um cristal que possui alto índice de refração. Quando a radiação infravermelha atinge esse cristal com um determinado ângulo crítico, ocorre sua reflexão interna total. Neste ponto, uma pequena fração da radiação penetra no material como uma onda evanescente, que por sua vez, ao ser absorvida seletivamente, provoca uma atenuação no feixe de radiação, a qual é capturada por um sensor e resulta no espectro de absorção do material [11, 12]. Por outro lado, a RS baseia-se no espalhamento de luz. Nesta abordagem, um feixe de luz monocromático incidente sobre um material interage com o mesmo e pode ser espalhado de forma elástica ou inelástica. O primeiro ocorre quando os fótons são espalhados com a mesma energia dos fótons incidentes, enquanto o segundo ocorre quando há troca de energia, com os fótons sendo espalhados com energias maiores ou menores que a dos fótons incidentes. Este último leva o nome de espalhamento Raman. Esse espalhamento é detectado por um sensor e posteriormente convertido no espectro do material a partir da diferença entre os comprimentos de onda dos fótons incidentes e espalhados [13, 14].

As técnicas biofototérmicas e espectroscópicas tradicionais apresentam diversas vantagens, incluindo natureza não destrutiva, análise relativamente rápida, capacidade de analisar o material em diferentes formas físicas (como pó, líquido e sólido) e aplicabilidade em estudos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* [4, 14–17]. Apesar do potencial e da atual evolução dos métodos espectroscópicos, a tradução deles para o ambiente clínico tem experimentado um ritmo lento com desafios que ainda precisam ser vencidos [4]. Por isso, a principal motivação para deste trabalho é ampliar as aplicações das técnicas biofototérmicas e espectroscópicas visando a consolidação destes métodos para uso de forma rotineira no diagnóstico clínico e para pesquisa científica na certificação de novos materiais.

Dessa forma, o objetivo principal desta tese é aplicar técnicas biofototérmicas e espectroscópicas tradicionais para o estudo de diferentes formulações farmacêuticas e de materiais restauradores para odontologia. Para isto, esta tese se divide em duas partes principais. A primeira traz uma breve contextualização sobre onicomicose e contém três estudos em que a espectroscopia Fotoacústica é utilizada na análise de formulações

farmacêuticas de uso tópico desenvolvidas para o tratamento desta infecção fúngica, a saber: 1) aplicar a FTIR-PAS para avaliar a penetração ungueal de formulações esmaltes contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim; 2) empregar a UV-Vis-PAS para caracterizar e avaliar a permeação ungueal de nanopartículas de prata produzidas via síntese biológica a partir do extrato glicólico de própolis; 3) utilizar a UV-Vis-PAS para avaliar a difusão de uma solução contendo hipericina em unhas saudáveis das mãos e dos pés, bem como em unhas dos pés acometidas por onicomicose. A segunda parte compreende dois estudos em que a espectroscopia vibracional é aplicada para a análise de materiais cerâmicos de interesse para restaurações odontológicas, são eles: 1) usar a RS para avaliar a eventual transformação de fase e tensão residual na superfície de diferentes cerâmicas odontológicas de zircônia submetidas ao jateamento com partículas de óxido de alumínio ou a aplicação de plasma de argônio não térmico; 2) aplicar FTIR-ATR e RS para a avaliação do grau de conversão de cimentos resinosos fotoativados sob cerâmicas odontológicas de zircônia ou dissilicato de lítio com diferentes níveis de translucidez e espessuras.

## Capítulo 2

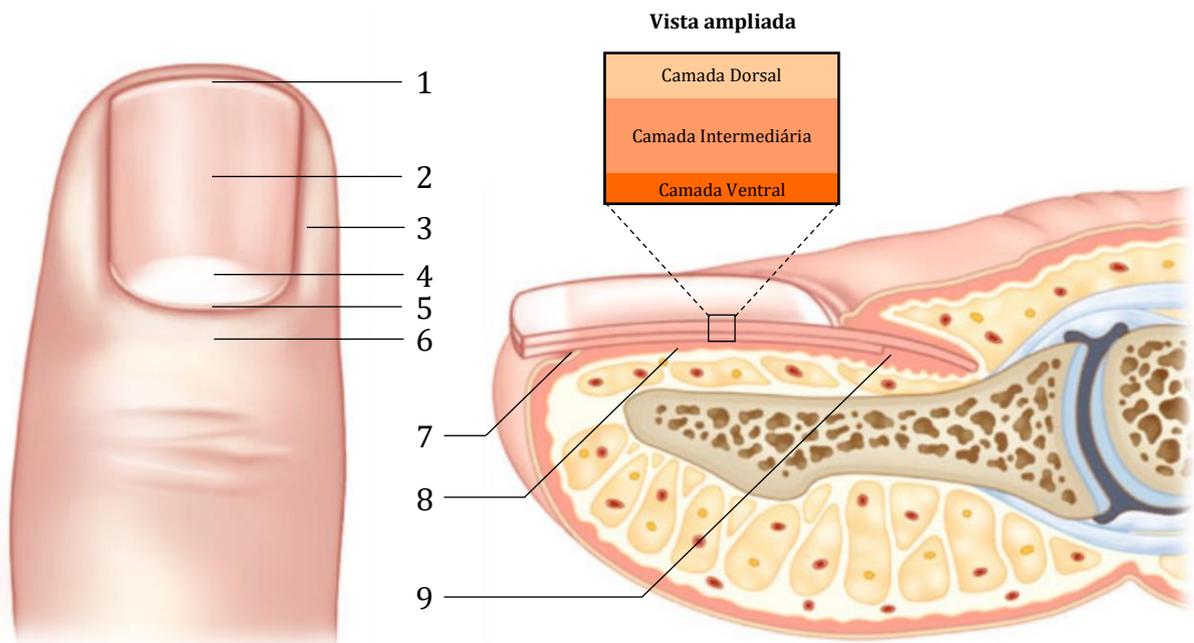
# Espectroscopia Fotoacústica para análise de difusão de formulações farmacêuticas de uso tópico para terapêutica de onicomicose

### 2.1 Considerações iniciais: unha e onicomicose

A unha humana, também denominada placa ou lâmina ungueal, é um anexo cutâneo semirrígido formado por células queratinizadas. Está localizada nas extremidades superiores dos dedos dos pés e das mãos, e tem a função de proteção das falanges além de auxiliar na manipulação de objetos e desempenhar propósitos estético e cosmético [18–20].

A placa ungueal é uma estrutura dinâmica, crescendo continuamente ao longo da vida. Tem sua origem na matriz, se estende sobre o leito ungueal e o hiponíquio, e está incorporada nas dobras ungueais. Essas estruturas compõem a unidade ungueal e estão ilustradas na Figura 1. A matriz ungueal está situada abaixo da dobra proximal e em alguns dedos sua porção distal, a lúnula, pode ser vista através da unha. O leito ungueal é uma região vascularizada que está firmemente aderida à placa ungueal, começa na margem distal da lúnula e estende-se até o hiponíquio. Este último, compreende tanto um espaço quanto uma superfície, é uma camada de epiderme adjacente ao leito ungueal que está fortemente aderida a superfície inferior da placa ungueal, marcando e selando a região da separação entre a placa ungueal e o tecido subjacente. As dobras ungueais são estruturas cutâneas que envolvem a placa ungueal, delimitando suas bordas e auxiliando em sua fixação. Além disso, juntamente com a cutícula, a camada de epiderme originada da dobra ungueal proximal e aderida a superfície superior da unha, fornece uma proteção física contra agentes externos que podem infectar as regiões subungueais e proximais. A borda livre é a região distal onde termina a lâmina ungueal [19–22].

De forma geral, a placa ungueal é dividida em três camadas distintas que estão sobrepostas e fortemente unidas, denominadas: dorsal, intermediária e ventral, conforme mostra a Figura 1. A camada dorsal está disposta na região superior da placa ungueal, a ventral na região inferior e a intermediária entre as duas. Suas espessuras são proporcionalmente diferentes, a camada intermediária é a mais espessa, representa 50% da placa ungueal, enquanto que a dorsal e a ventral contribuem com 30 e 20%, respectivamente. O arranjo da queratina, proteína fibrosa e constituinte majoritário da unha, também difere nas camadas ungueais, na intermediária as fibras estão alinhadas e orientadas no sentido perpendicular e no mesmo plano do eixo de crescimento da unha, e, nas outras duas camadas restantes, as fibras de queratina estão compactadas, como ladrilhos sobrepostos, e distribuídas sem orientação preferencial [18, 23].



**Figura 1.** Esquema representativo da anatomia da unidade ungueal humana e das camadas da placa ungueal. 1. borda ungueal livre; 2. placa ungueal; 3. dobra ungueal lateral; 4. lúnula; 5. cutícula; 6. dobra ungueal proximal; 7. hiponíquio; 8. leito ungueal; 9. matriz ungueal. Adaptado das referências [20, 23, 24].

As unhas humanas podem ser acometidas por diversas doenças, dentre as quais, a mais comum é a onicomicose. Estima-se que seja responsável por cerca de 50% dos casos de doenças ungueais [20, 25–27]. Onicomicose é o termo referente a infecção fúngica das unhas. Os organismos causadores dessa doença incluem: fungos dermatófitos, considerados os principais agentes etiológicos, dentre os quais, se sobressaem

*Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*; fungos não-dermatófitos, como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis* e *Acremonium* spp; e leveduras, especialmente do gênero *Candida* [28, 29].

Os fungos invadem a placa ungueal diretamente ou por meio das estruturas ao seu redor. Com base no padrão e no local da invasão, a onicomicose pode ser classificada como superficial, subungueal distal e lateral, subungueal proximal, *endonyx* e distrófica total [30, 31]. As próprias características naturais das unhas proporcionam um ambiente favorável ao desenvolvimento de agentes patogênicos [29], a fenda entre o hiponíquio e a borda livre da unha é uma região que armazena diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos [21]. Ao considerar as características químicas da unha, estudos [32, 33] já mostraram que alguns patógenos fúngicos apresentam capacidade de usar somente ela como fonte nutricional para crescer e invadi-la.

Existem inúmeros fatores predisponentes para o desenvolvimento da onicomicose, incluindo condições médicas (diabetes, psoríase, imunossupressão, anomalia genética), fatores físicos e ambientais (obesidade, tabagismo, lesões nas unhas, calçados oclusivos, prática de atividades esportivas, compartilhar moradia com pessoas afetadas) e fatores genéticos (idade avançada, sexo) [29, 30]. Esses fatores são os mesmos que podem contribuir para a recorrência da onicomicose pós-tratamento, tornando-a uma doença persistente e desafiadora de se tratar [28].

Clinicamente, a onicomicose pode se apresentar com mudança de coloração, fragilidade e espessamento da placa ungueal, descolamento da placa ungueal do leito ungueal e hiperqueratose subungueal [28]. Apesar do aparente estado doente da unha, muitas vezes essa infecção é ignorada, considerada um simples problema cosmético; no entanto, a onicomicose requer tratamento, pois não se resolve por conta própria e, se permitida progredir, pode levar a uma doença mais grave ou generalizada. Também pode ter efeito negativo na qualidade de vida do indivíduo infectado, causando, além dos problemas físicos (dor, desconforto e dificuldade na realização de atividades diárias), constrangimento com a aparência das unhas e diminuição da autoestima, em alguns casos, levando até mesmo ao afastamento social [28, 30, 34].

Para tratar a onicomicose encontram-se disponíveis tanto abordagens sistêmicas quanto localizadas. As terapias medicamentosas orais e tópicas são as mais comumente utilizadas na prática clínica, mas também podem ser empregadas terapias baseadas em dispositivos, bem como a remoção parcial ou total da placa ungueal [35, 36].

O tratamento por antifúngicos orais tem sido amplamente empregado devido à sua eficácia, acessibilidade e baixo custo. Atualmente os principais medicamentos sistêmicos prescritos são terbinafina, itraconazol e fluconazol. Embora apresentem bom efeito terapêutico, o uso desses antifúngicos orais tem diversas desvantagens. Após ser ingerido, o fármaco é absorvido pela corrente sanguínea e distribuído sistemicamente, atingindo o leito ungueal e a seguir penetrando na placa ungueal ventral. A longa duração do tratamento, que pode variar de meses até anos, causa um nível elevado de exposição sistêmica à substância e, com isso, efeitos adversos podem surgir nos pacientes, tais como, hepatotoxicidade, erupções cutâneas, dor de cabeça e problemas do trato gastrointestinal [23, 28, 35, 37]. Somado a isso, uma limitação crucial dos antifúngicos orais é a potencial interação com outros fármacos, que pode ocasionar efeitos adversos graves, e, portanto, o uso desses medicamentos é contraindicado para alguns pacientes [28, 29].

O tratamento por antifúngicos tópicos, por outro lado, não tem limitações de segurança, visto que atuam diretamente na área infectada, e com isso, não ocorrem interações medicamentosas e os efeitos adversos, quando existem, geralmente são reações no local de aplicação do fármaco. Por isso, dependendo das circunstâncias a terapia tópica apresenta-se como a melhor escolha. Contudo, a eficácia da terapia tópica atual é menor, devido principalmente a fraca difusão do fármaco na placa ungueal. Os agentes sintéticos usados nessa modalidade terapêutica incluem efinaconazol e tavaborol, disponibilizados na forma de solução, e, ciclopirox e amorolfina, na forma de esmalte [23, 28, 35].

Para exercer efeito terapêutico, o medicamento aplicado topicamente deve penetrar na unidade ungueal e atingir o local onde está o agente infeccioso. Nesse processo, a estrutura compacta da placa ungueal é um obstáculo e diferentes fatores influenciam a permeação do medicamento, incluindo: as propriedades do fármaco, como peso molecular, lipofilicidade, hidrofiliabilidade e carga; as propriedades da formulação, como o tipo de veículo e o pH; e as propriedades da própria unha, como seu grau de hidratação, espessura e estado da doença. A administração de medicamentos tópicos que possuem características favoráveis pode melhorar consideravelmente o processo de permeação [23, 38].

Além disso, considerando as propriedades acima, várias estratégias têm sido propostas a fim de facilitar a penetração do fármaco na placa ungueal, e, conseqüentemente, alcançar terapias tópicas mais eficazes para o tratamento da

onicomicose. Administração de fármaco mediada por corrente elétrica (iontoforese) ou por ondas ultrassônicas de baixa frequência, encapsulamento de fármaco em nanopartículas ou em transferossomas, realização de pequenas perfurações na placa ungueal (microporação) e o uso de diferentes intensificadores químicos de penetração são algumas dessas estratégias [23, 38].

Procedimentos de remoção da unha infectada também podem ser usados no tratamento da onicomicose. O desbridamento mecânico consiste em cortar, lixar ou abrasar com dispositivo elétrico a placa ungueal para remover a região afetada [39]. Esse procedimento reduz a carga fúngica, mas não deve ser usado como monoterapia, é uma alternativa terapêutica complementar [35, 39]. A avulsão ungueal é um procedimento que visa remover a placa ungueal infectada do leito ungueal. Para isso, utiliza-se meios químicos ou cirúrgicos e, dependendo da extensão da área afetada, remove-se parcialmente ou completamente a placa ungueal. Embora esse procedimento possa ser realizado como tratamento independente, é altamente recomendável o tratamento subsequente com antifúngicos para melhorar sua eficácia [39].

Por fim, outras opções de tratamento para a onicomicose incluem as terapias fotodinâmica e a laser. A terapia fotodinâmica envolve o uso de uma fonte de luz com comprimento de onda específico, um fotossensibilizador aplicado topicamente na placa ungueal e o oxigênio disponível no meio. A interação desses elementos resulta em reações físico-químicas com capacidade de provocar a inativação dos fungos. Essa modalidade terapêutica vem se mostrando eficiente; no entanto, investigações adicionais são necessárias para otimizar a técnica e estabelecer protocolos de tratamento padronizados [37, 40]. Por sua vez, a terapia a laser é um método no qual a interação da luz do laser com o tecido fúngico pode resultar em efeitos fungicidas [26, 40]. Esse método tem se mostrado promissor para produzir melhoras temporárias na estética das unhas, mas em relação as taxas de cura, essas são menores em comparação com as terapias tópica e oral; na realidade, existem evidências limitadas sobre a eficácia dos lasers na eliminação dos fungos patogênicos [28, 35, 40].

A onicomicose é uma infecção fúngica persistente, com um arsenal terapêutico disponível que apresenta limitações. As falhas terapêuticas e a recorrência da doença são muito comuns, sendo que a exposição prolongada, a aplicação excessiva ou a utilização inadequada dos antifúngicos pode propiciar o surgimento de resistência antifúngica [23, 41, 42], um problema já relatado em todo o mundo [42]. Diante das informações

apresentadas, percebe-se a necessidade de desenvolvimento e uso de técnicas para se determinar a difusão e as interações físico-químicas de novas formulações que sejam mais eficazes e seguras para o tratamento da onicomicose.

## **2.1.1 Esmaltes contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim**

### **2.1.1.1 Introdução**

Produtos naturais ou produtos contendo moléculas derivadas de recursos biológicos têm sido explorados como abordagem terapêutica complementar ou como substituto dos medicamentos convencionais no tratamento da onicomicose [29, 43, 44]. As razões para isso são as diversas vantagens que os tratamentos naturais podem oferecer. Eles possuem potencial para serem de baixo custo se a classificação for como medicamentos de venda livre ou complementares. As reações adversas associadas aos tratamentos naturais geralmente são mínimas, como irritação da pele ou dor leve, indicando serem alternativas mais seguras e toleráveis. Além disso, a natureza complexa dos constituintes bioativos encontrados nos produtos à base de plantas pode conferir ao tratamento uma menor propensão para o surgimento da resistência fúngica [45].

Os óleos essenciais são compostos extraídos das estruturas de várias plantas aromáticas, sendo caracterizados como uma substância líquida, volátil, com intenso aroma, na maioria das vezes incolor, solúvel em lipídeos e em solventes orgânicos (com densidade geralmente inferior à da água). São produzidos como metabólitos secundários das plantas e apresentam em sua composição uma mistura complexa e variável de componentes químicos, predominantemente aqueles classificados como terpenos e terpenóides [46, 47]. Estudos demonstraram que alguns óleos essenciais possuem propriedades bioativas, como ação antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antiparasitária e inseticida, e por esta razão, eles são amplamente empregados na indústria cosmética, agrícola, sanitária, farmacêutica e alimentícia [48, 49]. Entre as amplas variedades de óleos essenciais conhecidos (cerca de 3000) estão os óleos essenciais de orégano e de alecrim, os quais contêm compostos bioativos que os torna eficazes contra fungos patogênicos [49–51].

As nanopartículas de prata são estruturas com tamanho de 1 a 100 nm, que podem ser obtidas por meio de métodos químicos, físicos e biológicos. A síntese biológica (ou verde) têm recebido considerável atenção pelos pesquisadores por ser um processo ecologicamente correto, seguro e de baixo custo. As fontes mais comumente empregadas

nesse tipo de síntese são microrganismos (fungos e bactérias) e plantas (extratos). As nanopartículas de prata de síntese biogênica apresentam amplo espectro de ação farmacológica, e em decorrência disso, têm ganhado destaque nos últimos anos com aplicações em diversas áreas, tais como os setores alimentício, medicinal, agrícola e têxtil [52, 53]. Sua eficácia antifúngica já comprovada contra diversos microrganismos a torna uma alternativa promissora para tratamento de doenças decorrentes das infecções fúngicas [54].

Os antifúngicos tópicos podem se apresentar de diversas formas farmacêuticas, dentre elas, o esmalte se mostra mais adequado e conveniente no caso do tratamento de doenças de unhas por permitir a retenção do medicamento na área desejada [23, 38]. Nestes casos, os esmaltes são modificados por meio da incorporação de agentes antifúngicos. Após sua aplicação, o solvente volátil evapora, deixando uma película, insolúvel em água, na qual o medicamento está concentrado e em contato com a placa ungueal. Essa retenção, hidratação e maior concentração do fármaco são importantes para aumentar sua permeação na placa ungueal [23].

Para avaliar a permeação de um novo antifúngico de aplicação tópica, a espectroscopia fotoacústica é uma técnica de grande valia, pois permite avaliar tanto a permeação como possíveis interações entre a substância e o tecido biológico, além disso essa técnica tem sido usada para analisar a difusão de formulações farmacêuticas em diferentes tecidos biológicos, como por exemplo unha e pele [6, 9, 55]. Assim, este estudo visa empregar a espectroscopia fotoacústica na região do infravermelho (FTIR-PAS) para avaliar a permeação ungueal de formulações de esmalte com a incorporação de óleos essenciais de orégano e alecrim e nanopartículas de prata biogênicas. Estas podem ser um possível método terapêutico alternativo no tratamento preventivo ou curativo da onicomicose.

O estudo foi realizado em colaboração com o Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina. As formulações de esmalte foram elaboradas pela professora Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia Lonni e a aluna Natalia Rodrigues de Oliveira. Os dados aqui apresentados também fazem parte da dissertação da referida aluna [36].

### **2.1.1.2 Procedimento experimental**

Para este estudo, as formulações de esmaltes foram preparadas adicionando em uma mesma base, de forma isolada ou em associação, três ativos diferentes: óleo essencial de orégano (OEO), óleo essencial de alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (Bio-NPAG). A síntese das nanopartículas de prata foi realizada a partir do uso do fungo *Fusarium oxysporum*. A formulação base, isenta de ativos, foi desenvolvida utilizando acetato butirato de celulose, álcool isopropílico, acetato de etila e acetato butirato de sacarose, sendo que a concentração de cada componente não foi exposta por motivo de patente. A Tabela 1 mostra a composição das formulações de esmalte elaboradas para este estudo [36].

**Tabela 1.** Composição das formulações de esmalte. Adaptado da referência [36].

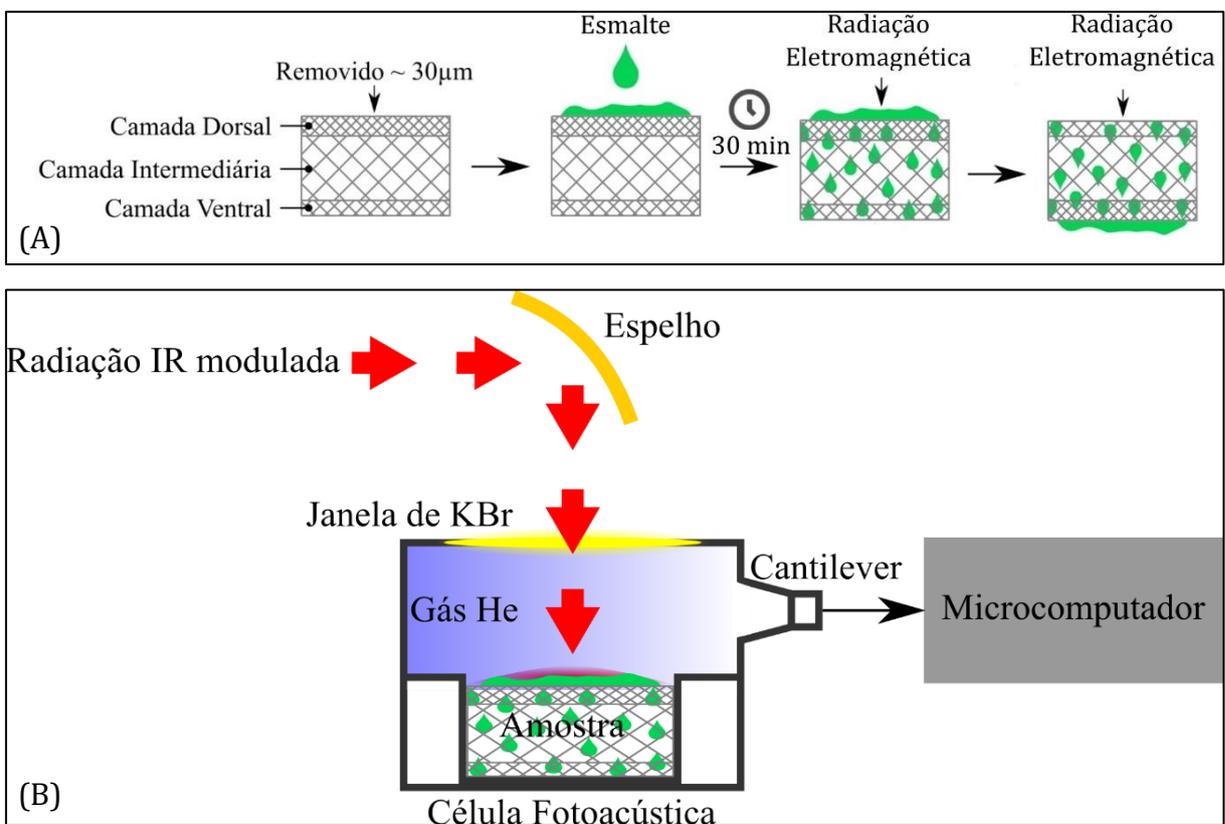
Formulação	Base (% v/v)	OEO (% v/v)	OEA (% v/v)	Bio-NPAG (% v/v)
FB	100	-	-	-
FOO	100	7,0	-	-
FOA	100	-	7,0	-
FAG	100	-	-	2,5
FOAAG	100	2,33	2,33	0,83

Para avaliar a permeação dos esmaltes foram utilizados fragmentos de unhas das mãos coletados de uma voluntária saudável na faixa etária de 23 anos. Os fragmentos de unha foram manualmente seccionados em amostras (n=10/grupo) de dimensões semelhantes (3x3 mm). Em seguida, a espessura das amostras foi aferida e, com o auxílio de uma lixa, foram retirados cerca de 30 µm de espessura da superfície dorsal da estrutura ungueal. A média das espessuras das amostras foi de 408 µm. Após essa etapa, foram obtidos os espectros FTIR-PAS das amostras de unha (superfície dorsal e ventral) sem aplicação de qualquer formulação, os quais foram usados como controle. Por fim, sobre superfície dorsal foram aplicados 5 µl da formulação de esmalte e após 30 minutos, a difusão da formulação foi avaliada por FTIR-PAS.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier (Vertex 70v, Bruker) equipado com uma célula de detecção fotoacústica (Gasera, PA-301). A amostra foi posicionada dentro da célula fotoacústica iluminando-se primeiramente a superfície dorsal, e, posteriormente a ventral. Antes do

início de cada medida, o interior da célula fotoacústica foi preenchido com gás hélio. Este procedimento visa otimizar a sensibilidade da técnica, bem como minimizar interferências do ar ambiente. Os espectros de FTIR-PAS foram coletados no modo *rapid scan*, no intervalo espectral de 3000 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 8  $\text{cm}^{-1}$ , média de 128 varreduras e velocidade do espelho de 0,05  $\text{cm/s}$  (equivalente a frequência de modulação de 1,6 kHz).

A Figura 2 ilustra como a formulação foi aplicada na unha e o respectivo posicionamento da amostra no interior da célula fotoacústica.



**Figura 2.** (A) Representação esquemática da preparação das amostras para o estudo *ex vivo* da permeação ungueal dos esmaltes e do posicionamento para a aquisição dos espectros. (B) Representação esquemática da célula fotoacústica. Adaptado da referência [36].

O comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ) é o parâmetro que permite estimar a espessura da amostra que está contribuindo para a geração do sinal fotoacústico. Sua expressão para medidas realizadas por FTIR-PAS no modo *rapid scan* é [9]:

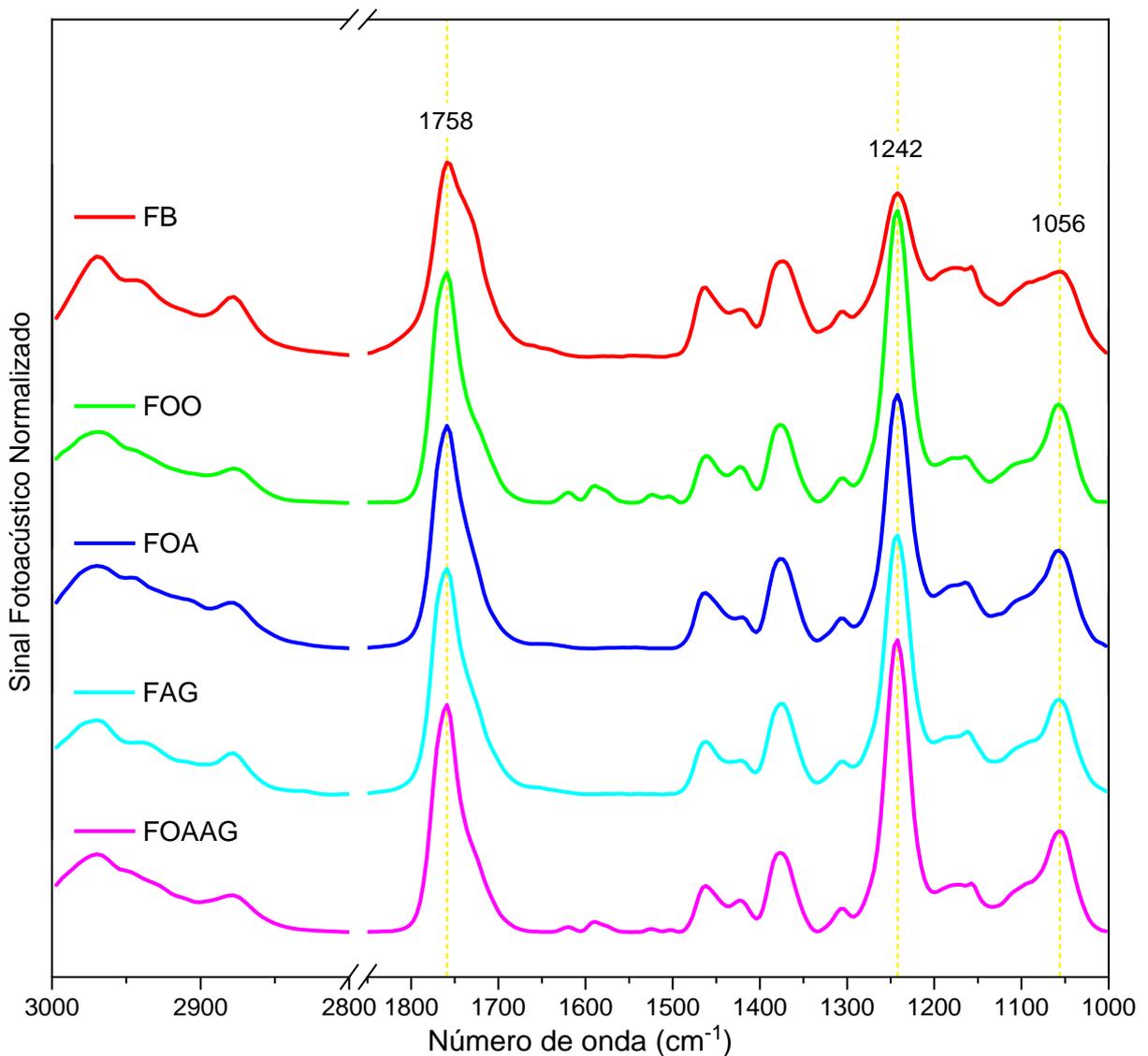
$$\mu_s(\nu) = \sqrt{\frac{D}{2\pi\nu V}} \quad (1)$$

Em que,  $D$  é a difusividade térmica da amostra,  $v$  é o número de onda da radiação infravermelha e  $V$  é a velocidade do espelho do interferômetro. Utilizando na equação (1) a difusividade térmica da unha ( $D = 10 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  [56]) e a velocidade do espelho usada nesse experimento (0,05 cm/s), tem-se que o valor de  $\mu_s$  variou de 10 a 18  $\mu\text{m}$ . Considerando esses valores e o valor médio da espessura das amostras (408  $\mu\text{m}$ ), se a formulação for detectada do lado oposto à sua aplicação, indica que ela se propagou ao longo da estrutura unha.

Por fim, análises estatísticas foram realizadas utilizando *One-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. Foi considerado  $P < 0,05$  como nível de significância.

### **2.1.1.3 Resultados e discussão**

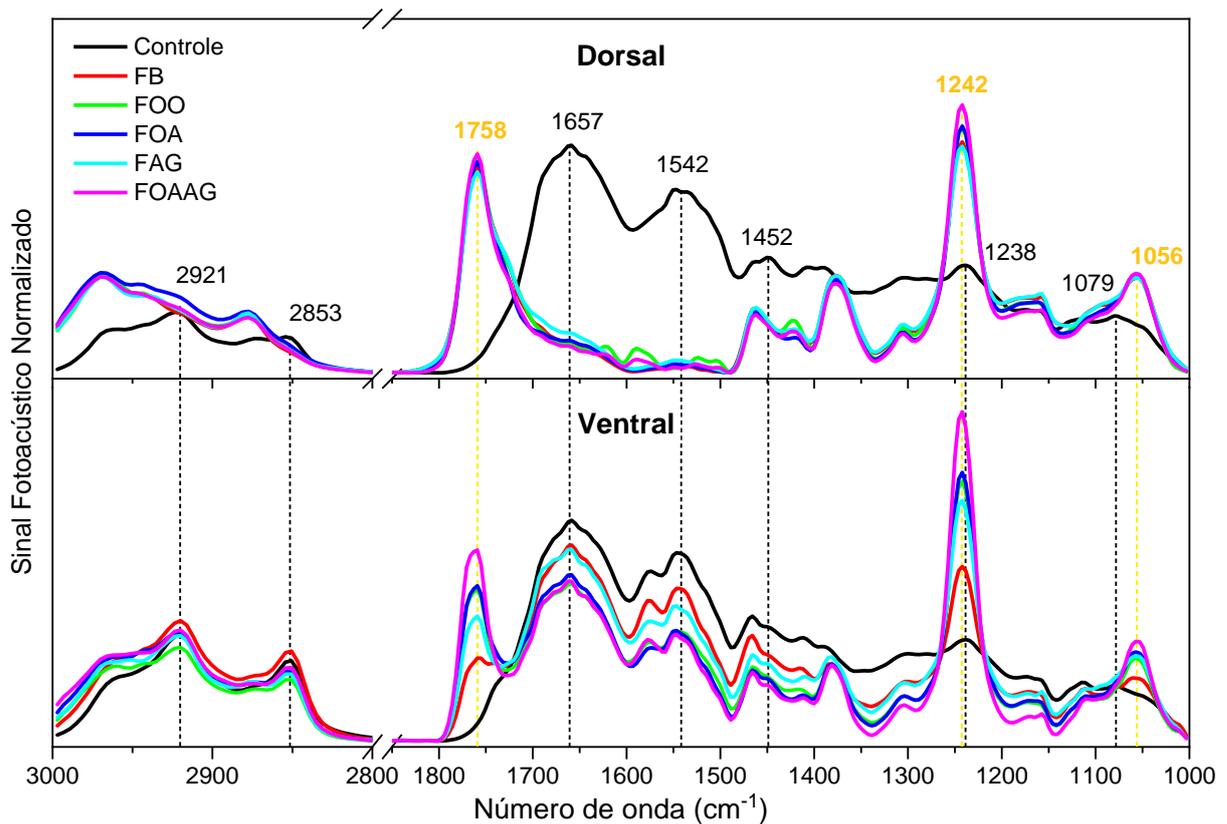
Os espectros de absorção óptica das formulações de esmalte contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e alecrim, em associação ou não, foram semelhantes ao espectro de FB, porém, a adição do ativo levou ao aumento de intensidade dos picos em 1758, 1242 e 1056  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3). Esses picos foram usados como referência para a análise de permeação, assim, a identificação deles nos espectros da superfície ventral da unha, após a aplicação das formulações de esmalte na superfície dorsal, indica que ocorreu a difusão através da estrutura ungueal.



**Figura 3.** Espectros obtidos por FTIR-PAS das formulações de esmalte. Adaptado da referência [36].

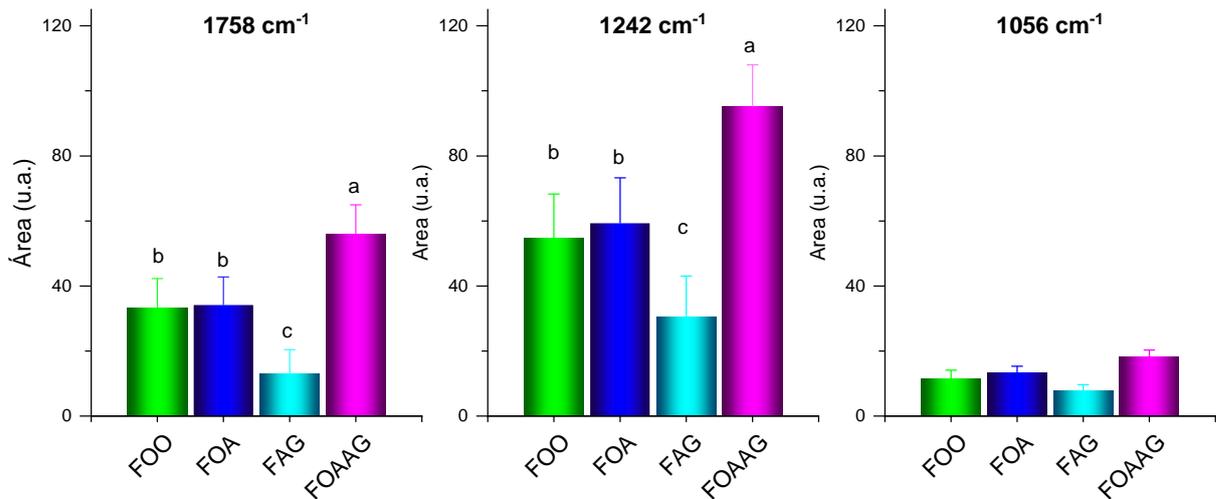
A avaliação da permeação foi realizada com base nas leituras de FTIR-PAS das unhas antes e após a aplicação tópica da formulação (Figura 4). O espectro da unha controle apresenta bandas de absorção em 2921 e 2853  $\text{cm}^{-1}$  associadas ao estiramento de  $\text{CH}_2$  de lipídeos, em 1657, 1542 e 1238  $\text{cm}^{-1}$  referentes a amida I, II e III, em 1452  $\text{cm}^{-1}$  característica da deformação de  $\text{CH}_3$  e em 1079  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas as ligações do esqueleto CC [15, 32]. Os espectros das unhas com as formulações de esmalte evidenciaram sua presença em ambas as superfícies, dorsal e ventral. A medida da superfície dorsal resultou em um espectro similar ao da formulação. A medida da superfície ventral mostrou a presença dos picos em 1758, 1242 e 1056  $\text{cm}^{-1}$  juntamente com os da unha, indicando a permeação de todas as formulações de esmalte. Além disso, pode-se observar que não

ocorreu deslocamento ou desaparecimento dos picos, mostrando que a técnica não detectou possíveis interações entre a formulação e a estrutura ungueal, o que pode significar que os componentes da fórmula não induziram efeitos adversos na placa ungueal.



**Figura 4.** Espectros obtidos por FTIR-PAS de amostras de unha controle e de unha com aplicação da formulação de esmalte na superfície dorsal. Adaptado da referência [36].

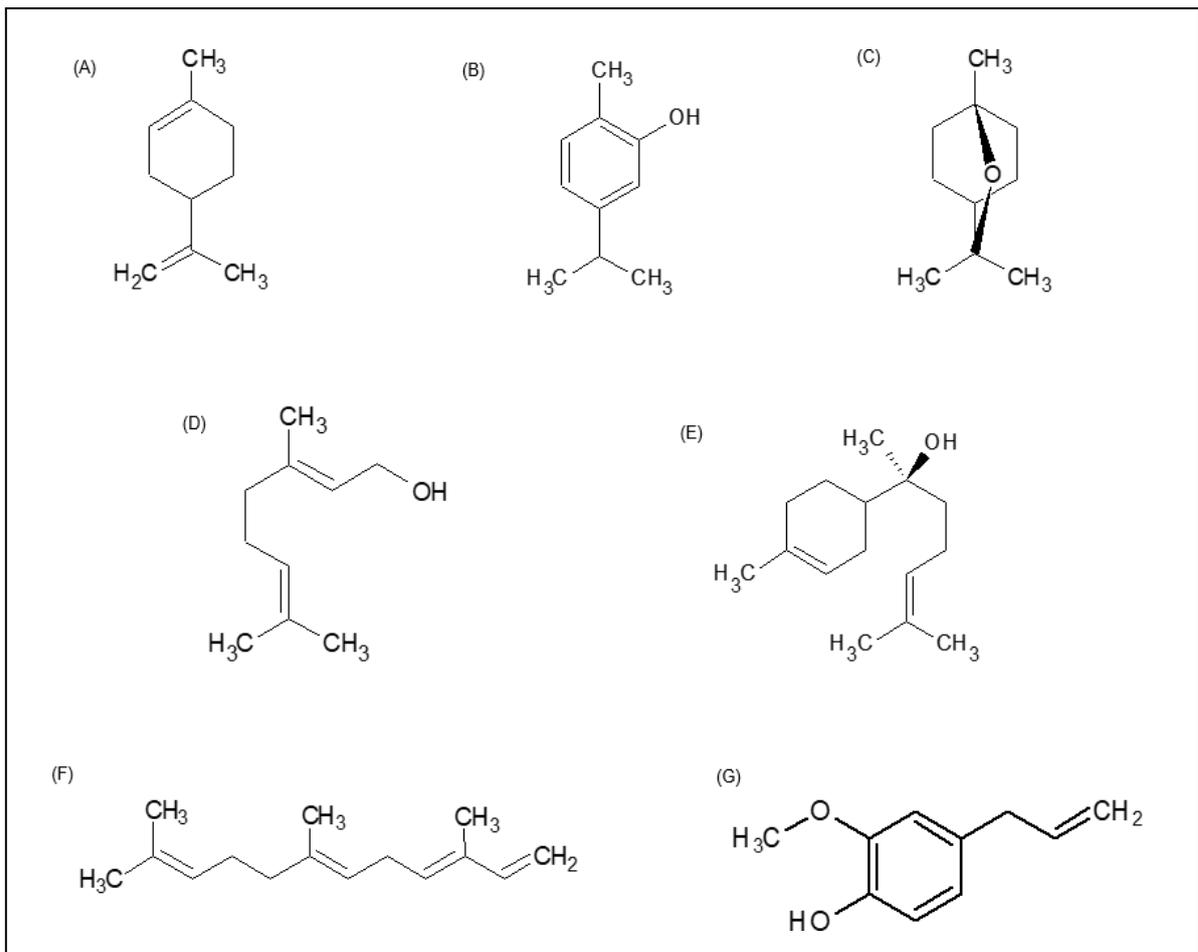
A diferença entre a permeação da formulação base e das formulações com os princípios ativos foi quantificada por meio de integração numérica. As áreas obtidas estão apresentadas na Figura 5. Dentre as formulações analisadas, os resultados mostraram valores maiores de área para as três formulações que continham óleos essenciais de orégano e/ou alecrim em sua composição, indicando maior permeação destas formulações na superfície ventral da placa ungueal, sendo que FOAAG foi a formulação com maior difusão. A formulação que apresentou menor permeação foi a FAG.



**Figura 5.** Valor médio das áreas obtidos por meio de integração e com subtração da área do controle. \* ( $P < 0,05$ ) formulações que diferem a letra são estatisticamente diferentes pela análise *One-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. Adaptado da referência [36].

Conforme relatado anteriormente, uma das propriedades que influencia na permeação da substância na unha é seu peso molecular, a permeabilidade diminui com o aumento do peso molecular do composto ou vice-versa [57, 58]. Os compostos terpenos, principais constituintes de vários óleos essenciais, apresentam baixo peso molecular [59], portanto, é possível que os componentes dos óleos essenciais presentes em FOO, FOA e FOAAG tenham favorecido a permeação dessas formulações na unha.

A Figura 6 apresenta estruturas químicas de diferentes compostos encontrados em óleos essenciais. Diferenças nos constituintes químicos e nas concentrações de óleos essenciais são observadas em diferentes espécies de plantas e dentro da mesma espécie. Essas variações são atribuídas a fatores como a parte específica da planta usada, a época da colheita, o método de secagem e armazenamento, o processo de destilação e questões relacionados ao clima. Dentre os diversos compostos que podem ser encontrados nos óleos essenciais, apenas um pequeno número de moléculas, duas ou três, estão presentes em proporções relativamente altas, de 20 a 70%, e são responsáveis pelas propriedades distintas do óleo essencial [60]. Segundo Bakkali e colaboradores [46], o OEO contém principalmente carvacrol e timol, com porcentagens de 30% e 27%, respectivamente; enquanto, Sienkiewicz e colaboradores [61] relataram que os principais componentes do OEA são 1,8-cineol, cânfora e  $\alpha$ -pineno, com porcentagens de 46%, 11% e 11%, respectivamente.



**Figura 6.** Estrutura química de alguns compostos importantes presentes em óleos essenciais. (A) limoneno; (B) timol; (C) 1,8-cineol; (D) geraniol; (E) bisabolol; (F) farneseno; (G) eugenol. Reproduzido da referência [36].

No que se refere a menor permeação através da lâmina ungueal apresentada por FAAG, esta pode ser devido as cargas na formulação. A menor permeabilidade de espécies carregadas pode ocorrer devido à hidratação do íon, que resulta em pequeno aumento do tamanho molecular, ou à repulsão eletrostática com a queratina, quando carregadas de forma semelhantes [57]. Portanto, temos duas hipóteses: a primeira que os íons de  $Ag^+$  liberados pelas Bio-NP<sub>Ag</sub> podem ser impactados pela hidratação e assim aumentar o tamanho da molécula; e a segunda que a formulação pode ser repelida pela queratina da unha. Esta última hipótese, está suportada no fato da queratina assumir uma carga líquida positiva ou negativa dependendo do PH. Para pH abaixo de 5 sua carga líquida é positiva, e acima desse valor é negativa [62]. O pH da própria unha está relacionado com sua localização anatômica e com o gênero da pessoa, sendo ligeiramente menor para as unhas das mãos e do gênero feminino [63], assim, tem-se a hipótese que as unhas aqui usadas estavam carregadas positivamente, repelindo os íons  $Ag^+$ .

É importante ressaltar brevemente os resultados das análises realizadas por Oliveira [36]. Em relação aos três ativos avaliados (OEO, OEA e bio-NPAG), os testes antimicrobianos demonstraram melhor eficácia do OEO e do bio-NPAG na inibição do crescimento dos microrganismos testados, os quais foram *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. O teste de citotoxicidade confirmou a segurança dos ativos. No que se refere as 7 formulações preparadas, o teste de difusão em disco mostrou que apenas FOO foi capaz de inibir o crescimento fúngico de todas as espécies testadas, enquanto no teste de infecção ungueal apenas as formulações contendo OEO em sua composição, com exceção de FOAAG, mostraram eficácia na inibição do crescimento de todos os agentes patogênicos durante os 15 dias de tratamento. Esses testes foram realizados utilizando os mesmos microrganismos descritos acima.

Considerando todos os resultados, inclusive da análise de permeação ungueal, FOO e FOAG (formulação contendo óleo essencial de orégano e nanopartículas de prata) foram as formulações escolhidas como potenciais candidatas para a formulação final do esmalte antifúngico. Após essa escolha, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de características físico-químicas foram realizadas. As imagens MEV evidenciaram que ambas as formulações inibiram eficientemente o crescimento de hifas de *Tricophyton mentagrophytes*. Além disso, as formulações se mostraram estáveis, apresentaram pH compatível com o da lâmina ungueal e tempo de secagem de menos de 2 minutos. Diante de tais resultados, essas formulações podem ser consideradas uma alternativa terapêutica para o tratamento da onicomicose [36].

## **2.1.2 Nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato glicólico de própolis**

### **2.1.2.1 Introdução**

Nas últimas décadas, por conta de suas propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, os nanomateriais se tornaram objetos de grande interesse da comunidade científica [64, 65]. Em particular, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido um dos nanomateriais mais estudados para aplicação nas áreas da saúde devido sua notável ação antimicrobiana. Além disso, possuem atividades anti-inflamatória e anticancerígena, e, apresentam estabilidade química e altas condutividades térmica e elétrica. Diante de tais propriedades, essas nanopartículas estão sendo usadas em várias aplicações (incluindo dispositivos médicos, sistemas de entrega de medicamentos, materiais dentários, curativos, diagnóstico e tratamento de doenças) e desempenham um papel promissor na busca por novas estratégias biomédicas [66–69].

Como consequência da crescente demanda por AgNPs, surgiu a necessidade de estabelecer métodos alternativos para sua produção, uma vez que os métodos convencionais (físicos e químicos) envolvem desvantagens como o alto consumo de energia ou a presença de produtos e subprodutos tóxicos para os seres humanos e ao meio ambiente [66, 70]. Nesse sentido, existe um interesse na síntese de nanopartículas usando métodos biológicos; os quais são processos com impactos ambientais reduzidos, mais seguros, econômicos e eficazes [70, 71].

Na síntese verde (ou biológica), as nanopartículas são produzidas se utilizando entidades biológicas, como microrganismos e plantas, sem a necessidade de quaisquer agentes químicos adicionais [70, 71]. As biomoléculas reduzem os sais metálicos a nanopartículas e exercem um papel crucial em sua estabilização, por meio da formação de uma camada que envolve a superfície das nanopartículas. Além da função estabilizadora, as biomoléculas que revestem as nanopartículas contribuem para sua biocompatibilidade e sua eficácia [70–72].

Nesse viés, a síntese biológica de AgNps utilizando derivados de própolis pode resultar em produto promissor, não apenas por ampliar as opções de recursos biológicos utilizados para este fim, mas também por combinar os efeitos antifúngicos oferecidos

pelos precursores para produzir um novo sistema, mais eficiente e seguro, para o tratamento da onicomicose. Visto que a própolis é um produto natural que tem sido estudado por apresentar atividade antifúngica contra diversas cepas de fungos e capacidade antibiofilme [29, 73]. Também são conhecidas suas propriedades antiinflamatória e cicatrizantes, as quais podem complementar o tratamento da onicomicose [74].

A própolis (também conhecida como “cola de abelha”) é uma substância com características resinosas, encontrada nas colmeias, onde as abelhas a utilizam como material cimentante para fechar rachaduras e espaços abertos, bem como para revestir as paredes e proteger a colmeia de microrganismos nocivos [75]. Essa substância resinosa é preparada pelas abelhas a partir de material coletado de exsudatos vegetais e obtida após mistura com suas próprias secreções (saliva, secreções enzimáticas e cera) [76, 77]. De modo geral, a própolis é formada por resinas e bálsamos (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos (5%) como aminoácidos, vitaminas e minerais [74, 76, 77]. Sua composição química é altamente complexa e varia conforme a localização geográfica e a época de coleta do material pelas abelhas, sendo que mais de 800 compostos químicos diferentes já foram identificados na própolis [77, 78]. Suas atividades biológicas decorrem dos compostos presentes na resina vegetal, os quais são predominantemente em todo o mundo substâncias fenólicas [76, 78].

Uma investigação anterior conduzida pela atual equipe de pesquisa mostrou a síntese e estabilização de nanopartículas utilizando somente prata e extrato etanólico de própolis verde. As AgNPs obtidas apresentaram tamanho inferior a 100 nm, boa estabilidade, baixa toxicidade, atividades antifúngicas contra todos os isolados testados e propriedades antibiofilme [79]. No presente estudo, o extrato glicólico de própolis (GPE) foi empregado como possível agente redutor e estabilizador da prata. Esse extrato tem sido menos investigado em comparação com os extratos etanólico. Entretanto, existem dados indicando que o extrato de própolis elaborado com glicol como solvente, apresenta alto teor de polifenóis totais e possui boa atividade antimicrobiana [80–83]. Assim, o objetivo deste estudo é caracterizar por espectroscopia Fotoacústica nanopartículas de prata preparadas via síntese biológica a partir do extrato glicólico de própolis (AgNPs-GPE) e também avaliar sua capacidade de permeação ungueal.

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com a professora Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri e as alunas Brenda Kischkel e Thaís Emiko Kawasaki do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

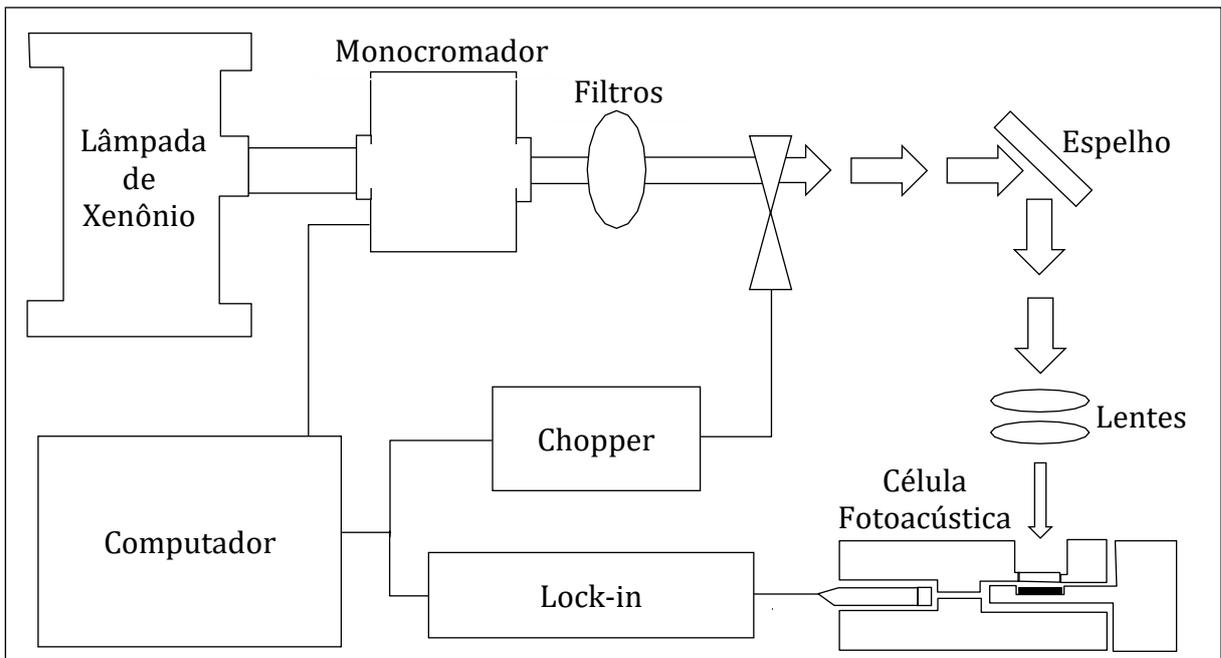
### **2.1.2.2 Procedimento experimental**

O extrato glicólico de própolis (GPE) e as nanopartículas de prata contendo extrato glicólico de própolis (AgNPs-GPE) foram elaborados seguindo os mesmos processos e etapas descrito por Kischkel [79], diferindo apenas pelo uso de propilenoglicol no lugar do etanol. A caracterização e a avaliação da permeação ungueal dessas preparações foram realizadas por meio da técnica UV-Vis-PAS.

O ensaio de permeação foi realizado conforme descrito na seção 2.1.1.2 da presente tese, com modificações. Inicialmente, foram adquiridos fragmentos de unhas das mãos do biobanco do Laboratório de Cultura Celular e Tecidos da Universidade Estadual de Maringá, previamente coletados de indivíduos saudáveis. A seguir, esses fragmentos foram seccionados em partes com dimensões finais de aproximadamente 3x3 mm, suas espessuras foram aferidas e a superfície dorsal de cada amostra foi lixada, removendo cerca de 30  $\mu\text{m}$  de sua espessura. A média das espessuras das amostras foi de 315  $\mu\text{m}$ . Cinco amostras de unha foram preparadas para cada formulação. Posteriormente, foram adquiridos os espectros de absorção das superfícies dorsal e ventral da estrutura ungueal, com a finalidade de serem usados como controle. Em seguida, foram aplicados 3  $\mu\text{l}$  de cada preparação sobre a superfície dorsal e após 1 hora, adquiridos os espectros de absorção de ambas as superfícies da unha. Uma representação esquemática do processo de aplicação da formulação na unha e do posicionamento da amostra para a realização das medidas está mostrado na Figura 2, apresentada anteriormente na seção 2.1.1.2.

A Espectroscopia Fotoacústica usada neste estudo consiste em uma montagem experimental, conforme esquematizado na Figura 7. Nesta montagem, a luz emitida por uma lâmpada de Arco de Xenônio (Oriel, modelo 68820), de potência máxima de 1000 W, é difratada por uma grade de difração posicionada no interior de um monocromador (Oriel, modelo 77250). Essa grade é selecionada conforme a região espectral de análise, a qual pode ser ultravioleta-visível (200-800 nm) e infravermelho próximo (800-3200 nm). Além disso, na entrada e na saída do monocromador tem-se fendas também ajustáveis de 3,16 ou 1,56 mm. A seguir, o feixe de luz monocromático que sai do monocromador, passa

por um filtro, cuja a finalidade é bloquear ordens superiores de difração, e posteriormente passa por um modulador mecânico (*Stanford Research Systems*, modelo SR540). A luz modulada, por sua vez, incide em um espelho de primeira superfície e é direcionada verticalmente para duas lentes convergentes, de quartzo, as quais focalizam o feixe de luz na amostra e faz com que ela receba a maior intensidade possível. A amostra fica posicionada dentro de uma célula fotoacústica fechada. Esta tem um microfone (*Brüel & Kjaer*, modelo 2669) acoplado que detecta o sinal e o transfere para um *Lock-in amplifier* (*EG & G Instruments*, modelo 5110). Por fim, os dados são transferidos do *Lock-in* para um computador, resultando, no caso do presente estudo, no espectro de absorção óptica da amostra.



**Figura 7.** Representação da montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica utilizada no presente estudo. Adaptado da referência [55].

Neste experimento, os espectros foram coletados no intervalo espectral de 300 a 700 nm e se utilizou a potência da lâmpada em 800 W, as fendas de 3.16 mm e a frequência de modulação da luz de 23 Hz.

Nas medidas de Espectroscopia Fotoacústica, somente uma determinada espessura da amostra contribui para a geração do sinal Fotoacústico, a qual é definida a partir do comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ). Para a técnica UV-Vis-PAS, esse parâmetro é calculado utilizando a seguinte expressão:

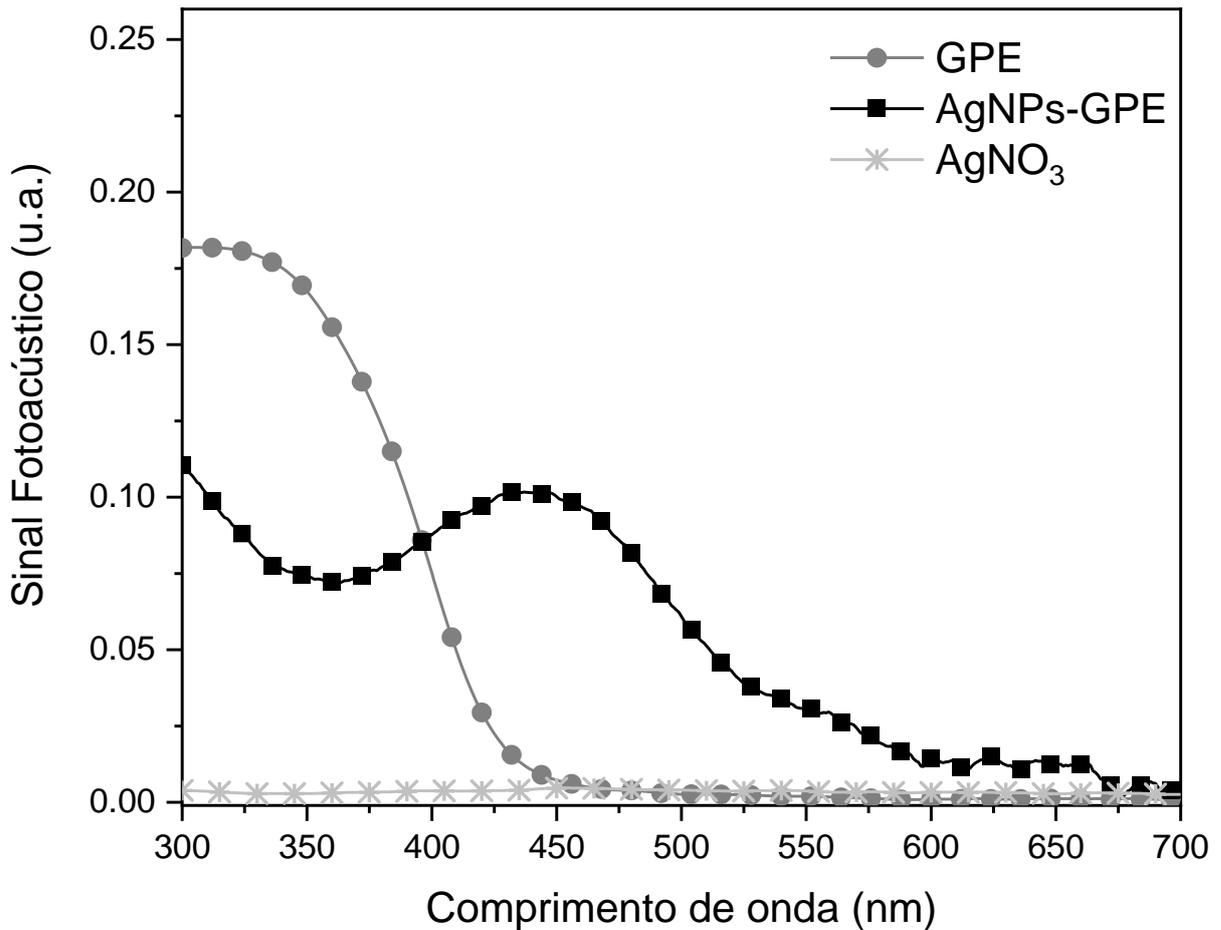
$$\mu_s(f) = \sqrt{\frac{D}{\pi f}} \quad (2)$$

Sendo,  $D$  a difusividade térmica da amostra e  $f$  a frequência de modulação da luz utilizada no experimento.

Utilizando  $D = 18,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  [56], para a difusividade térmica da unha, e  $f = 23 \text{ Hz}$ , na equação (2), tem-se que o valor de  $\mu_s$  foi de  $\sim 50 \text{ }\mu\text{m}$ . Assim, considerando a espessura da unha como  $315 \text{ }\mu\text{m}$  e sabendo que espessura que contribuiu para o sinal Fotoacústico foi de  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , a detecção da formulação nas leituras realizadas na superfície ventral (lado oposto a aplicação) indica que houve sua difusão ao longo da estrutura ungueal.

### 2.1.2.3 Resultados e discussão

Os espectros de absorção óptica das preparações, GPE e AgNPs-GPE, estão mostrados na Figura 8. Nota-se que o GPE apresenta uma banda larga de absorção até aproximadamente  $450 \text{ nm}$ , enquanto as AgNPs-GPE absorvem em todo o intervalo espectral analisado, com uma banda principal centrada em aproximadamente  $437 \text{ nm}$ . Com a finalidade de tentar identificar a atribuição dessa banda realizou-se a medida da solução aquosa de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) usada na síntese das nanopartículas. O espectro obtido dessa medida também está apresentado na Figura 8, e como se pode observar,  $\text{AgNO}_3$  não apresenta absorção no intervalo espectral analisado.



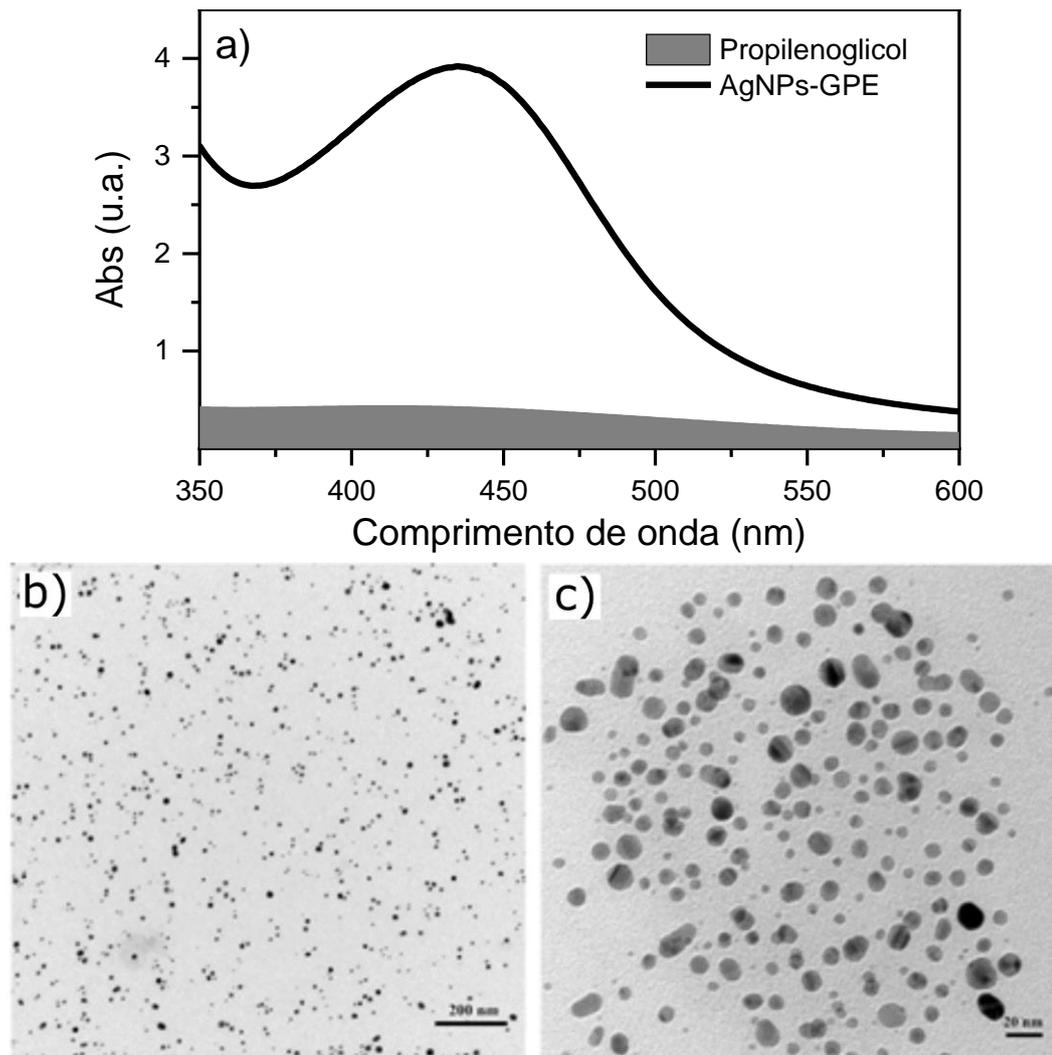
**Figura 8.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS do extrato glicólico de própolis (GPE) e das nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do extrato glicólico de própolis (AgNPs-GPE). Para efeito de comparação, também é mostrado o espectro da solução aquosa de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) utilizada no processo de síntese.

Quando as dimensões de uma partícula metálica são reduzidas para alguns nanômetros, ocorrem alterações significativas em suas propriedades ópticas, resultando em um comportamento completamente diferente ao apresentado pelo metal na forma de pó com dimensões maiores. A ressonância de *plasmons* de superfície é uma propriedade óptica proveniente dessa redução de tamanho. Quando um feixe de luz ilumina uma partícula metálica, com dimensões significativamente inferiores ao comprimento de onda, os elétrons livres localizados na superfície da partícula serão impactados pelo campo elétrico da luz, sendo direcionados no sentido oposto ao campo. Conseqüentemente, à medida que a partícula metálica desloca a onda, o campo elétrico sofre reversões alternadas em sua direção, o que por sua vez, causa um movimento oscilatório dos elétrons. Esse efeito de oscilação ressonante é denominado ressonância de *plasmons* de superfície, a qual depende, dentre outros parâmetros, do tamanho, da geometria e da composição da nanopartícula [84, 85].

Para AgNPs, a ressonância de *plasmons* de superfície dá origem a uma banda no espectro de absorção na região entre 400 e 500 nm [86], a qual fornece informações em relação à formação, estabilização e tamanho das nanopartículas. Sua observação por meio da espectroscopia UV-Vis está bem documentada na literatura [71, 86, 87]. Contudo, até onde se sabe, existem apenas alguns estudos [88–90], que analisaram a presença da banda de ressonância de *plasmons* de superfície em espectros de AgNps obtidos por espectroscopia Fotoacústica convencional.

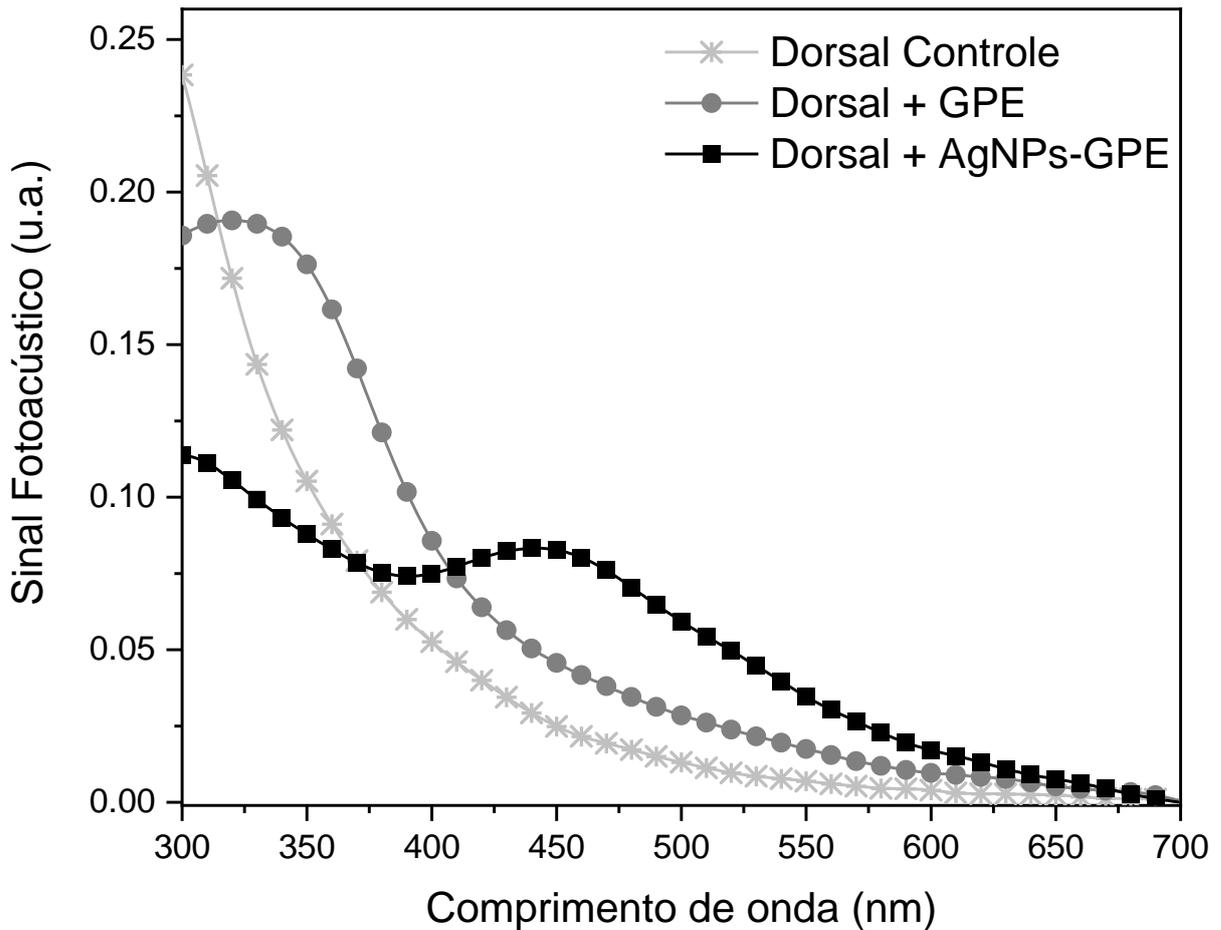
Embora o efeito de ressonância plasmônica seja um efeito óptico, ele leva à absorção da radiação luminosa, cuja energia pode ser eficientemente dissipada na forma de calor e, conseqüentemente, levar a variação de pressão e uma onda acústica detectável [91]. Basicamente, o princípio de geração do efeito fotoacústico. Dessa forma, é possível empregar espectroscopia Fotoacústica na análise de amostras que apresente esse efeito. El-Brossoly [92], por exemplo, mostrou que a técnica Fotoacústica pode ser utilizada para caracterizar nanopartículas de ouro com diferentes formatos e tamanhos. No estudo, os espectros fotoacústicos mostraram uma divisão da banda de ressonância plasmônica de superfície para nanobastões de ouro, além do que, o aumento destes levou ao deslocamento da posição das bandas.

Portanto, com base nos dados acima expostos, é possível inferir que a técnica UV-Vis-PAS pode ser usada como uma ferramenta para monitorar a formação de AgNPs por meio da ressonância de *plasmons* de superfície e que a síntese de nanopartículas usando GPE foi realizada com sucesso. Indo além, pode-se até supor que as AgNPs-GPE obtidas tinham formato esférico. Tais hipóteses foram validadas por espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em medições realizadas pela aluna Brenda Kischkel, conforme pode ser visto na Figura 9 [93].



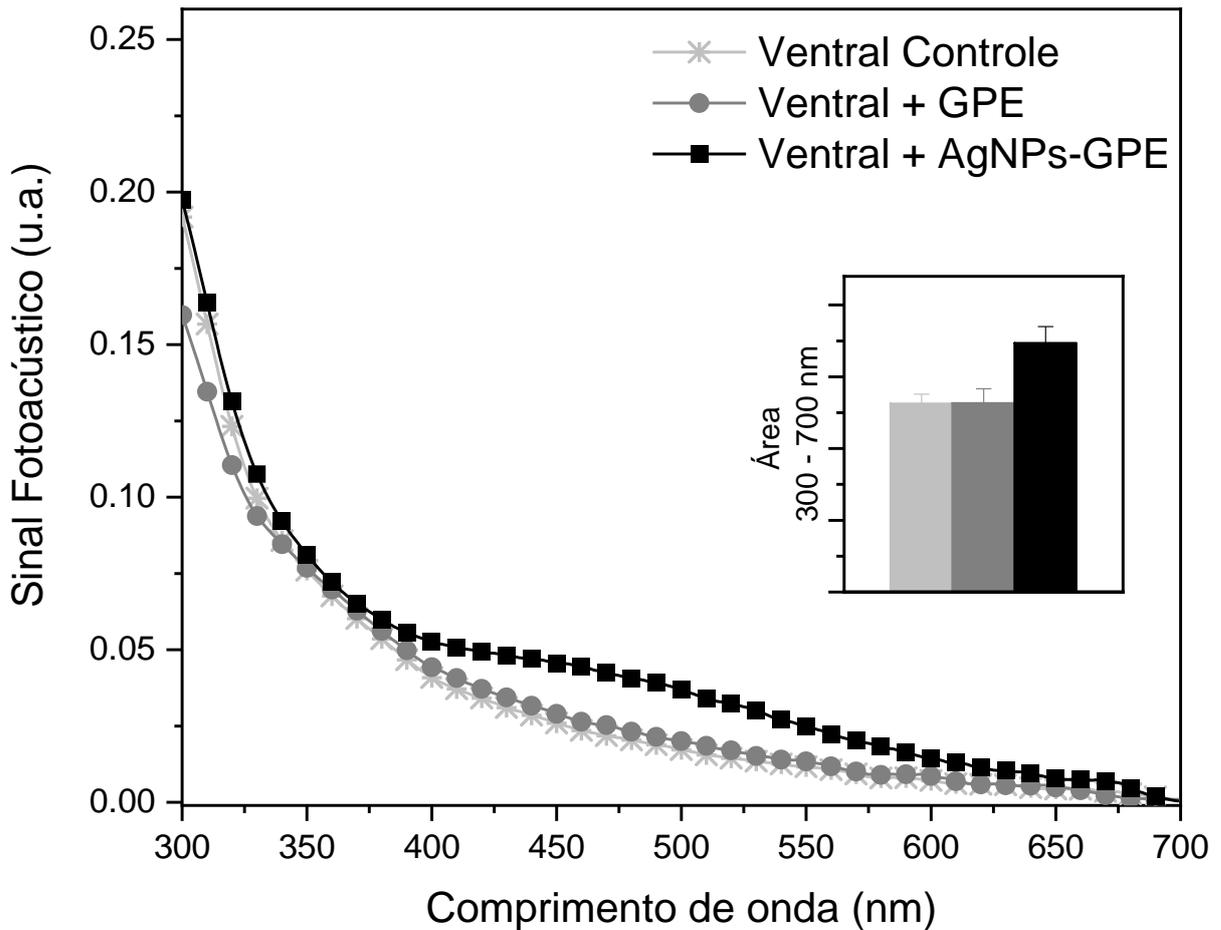
**Figura 9.** Espectros de absorção UV-Vis do propilenoglicol e das AgNPs-GPE (a). Imagens obtidas por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão de AgNPs-GPE na escala de 200 nm com ampliação 60.000x (b) e na escala de 20 nm com ampliação de 300.000x (c). Adaptado da referência [93].

Com o perfil de absorção de cada preparação identificado, a penetração ungueal foi investigada. A Figura 10 mostra os espectros de absorção óptica obtidos por UV-Vis-PAS da superfície dorsal da unha antes e após aplicação de GPE e AgNPs-GPE. Observa-se que os espectros da superfície dorsal com a aplicação das formulações foram semelhantes aos de suas respectivas formulações (mostrados na Figura 8), o que evidencia a presença destas na superfície dorsal da unha uma hora após a administração tópica.



**Figura 10.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS da superfície dorsal de unhas antes e após aplicação do GPE ou das AgNPs-GPE.

Por sua vez, as medidas realizadas a partir da iluminação da superfície ventral mostraram que o espectro da unha que recebeu as AgNPs-GPE mostrou a banda de absorção característica dessa formulação, enquanto o espectro da unha que recebeu o GPE foi semelhante ao controle, conforme apresentado na Figura 11. Em concordância ao observado, as áreas dos espectros obtidas por meio de integração numérica mostraram maior valor para as amostras de unha que receberam as AgNPs-GPE e valor semelhante ao controle para as que receberam o GPE (Figura 11). Assim, os resultados indicam que, em uma hora, apenas as AgNPs-GPE se propagaram por toda a espessura da lâmina ungueal.



**Figura 11.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS da superfície ventral de unhas antes e após aplicação do GPE ou das AgNPs-GPE. Na inserção está apresentada a área sob a curva obtida por meio de integral na região de 300 a 700 nm.

Estudos anteriores [5, 94] também realizados com a técnica UV-Vis-PAS demonstraram que o extrato de própolis e seus derivados são capazes de penetrar na lâmina ungueal; contudo, nesses estudos o tempo de contato da formulação com a unha foi de 24 horas. Logo, o fato da técnica UV-Vis-PAS não evidenciar a permeação ungueal de GPE pode estar associado ao tempo de aplicação da formulação, visto que no presente estudo a permeação foi avaliada uma hora após a aplicação tópica, o que evidencia a maior facilidade das AgNPs-GPE de permear as unhas humanas do que o GPE.

Assim, pode-se concluir que neste estudo a técnica UV-Vis-PAS demonstrou ser um método que permite monitorar, por meio da banda de ressonância de *plasmons* de superfície, a formação de AgNPs. Em relação a formulação, o extrato de própolis elaborado com propilenoglicol como solvente se mostrou uma fonte eficiente para a síntese de AgNPs. Além disso, as AgNPs-GPE obtidas foram capazes de permear através de todas as

camadas da lâmina ungueal e apresentando vantagem em relação ao GPE, o que torna essa preparação uma alternativa promissora para a aplicação no tratamento de onicomicose.

## 2.1.3 Formulação de hipericina em DMSO para terapia fotodinâmica

### 2.1.3.1 Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido cada vez mais explorada para o tratamento de infecções fúngicas devido à sua eficácia, ausência de efeitos colaterais significativos, natureza não invasiva e mínima toxicidade [95–97]. Essa abordagem terapêutica consiste em aplicar no tecido infectado um fotossensibilizador, que ao ser exposto à luz de comprimento de onda apropriado e na presença de oxigênio, induz a produção de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), estas, por sua vez, levam a morte das células patogênicas [98].

Os fotossensibilizadores podem ser definidos como corantes que possuem a capacidade de absorver energia proveniente de uma fonte de luz e, posteriormente, transferi-la para outra molécula. Dentre os diversos fotossensibilizadores que já foram estudados, destaca-se a hipericina, que é um composto derivado de plantas do gênero *Hypericum*, popularmente chamada de erva de são João. Essa molécula, com características lipofílicas, penetra na membrana celular lipídica de organismos eucarióticos, sendo considerada mais eficiente do que outros fotossensibilizadores que apresentam características hidrofílicas [99].

Estudos utilizando modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* tem demonstrado a eficácia antifúngica de PDT mediada por hipericina contra fungos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e leveduras do gênero *Candida* spp. [99]. Também já foi relatado que esse sistema apresenta ação antibiofilme e promove a recuperação da integridade do tecido cutâneo [100, 101]. A combinação de tais atividades pode contribuir para a melhoria geral da condição de unhas acometidas por onicomicose.

Neste contexto, pesquisas sobre o potencial da PDT mediada por hipericina voltada para o tratamento clínico da onicomicose são de grande relevância. Portanto, este estudo tem como foco empregar a Espectroscopia Fotoacústica para determinar se há permeação de uma solução de hipericina em unhas saudáveis das mãos e dos pés, bem como em unhas acometidas por onicomicose, sendo esta solução utilizada no tratamento de pacientes diagnosticados com essa doença.

Este estudo integra um relato de caso já publicado [6], o qual foi desenvolvido pela Dra. Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado durante seu doutorado sob a orientação da professora Dra. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, pertencente ao Programa de Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

### **2.1.3.2 Procedimento experimental**

Para este estudo, inicialmente a hipericina foi diluída em DMSO e, a seguir, uma solução na concentração de 12,5  $\mu\text{mol/L}$  foi preparada em água destilada estéril. A avaliação da difusão desta formulação em placas de unhas saudáveis e acometidas por onicomicose foram feitas por UV-Vis-PAS [6].

Em uma primeira etapa, unhas saudáveis foram usadas para se avaliar a permeação da solução de hipericina (Hip). Para o ensaio, fragmentos de unhas foram coletados das mãos de um voluntário com 24 anos de idade, e dos pés, de outro voluntário com 68 anos, ambos do sexo masculino. As amostras de unha ( $n=10/\text{grupo}$ ) foram preparadas de maneira semelhante ao protocolo já descrito na seção 2.1.1.2 na presente tese: padronização de tamanho, lixamento e posterior aplicação de 3  $\mu\text{L}$  de formulação sobre a superfície dorsal da estrutura ungueal. A seguir, as amostras foram protegidas da luz por 30 minutos e subsequentemente avaliada a penetração da formulação. Amostras sem aplicação de quaisquer formulações foram usadas como controle. As leituras foram realizadas iluminando-se as superfícies da unha na seguinte ordem: dorsal, ventral e ventral lixada. Esta última, obtida a partir do lixamento manual da amostra até diminuir sua espessura para aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . Os espectros de absorção foram coletados nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível (250 – 700 nm), com a potência da lâmpada de Xenônio ajustada em 800 W. As frequências de modulação da luz usadas foram 13 e 24 Hz, sendo a primeira para as unhas das mãos e a segunda para as unhas dos pés. Essas frequências foram diferentes para se monitorar a mesma profundidade na amostra, uma vez que a espessura que contribui para o sinal fotoacústico [equação (2); seção 2.1.2.2] depende da frequência de modulação da luz e da difusividade térmica da unha, e este último parâmetro, varia com a idade do doador. No presente estudo, os voluntários têm idades diferentes, 24 e 68 anos, por isso, os valores de difusividade térmica da unha eram diferentes,  $10 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  e  $18.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  [56],

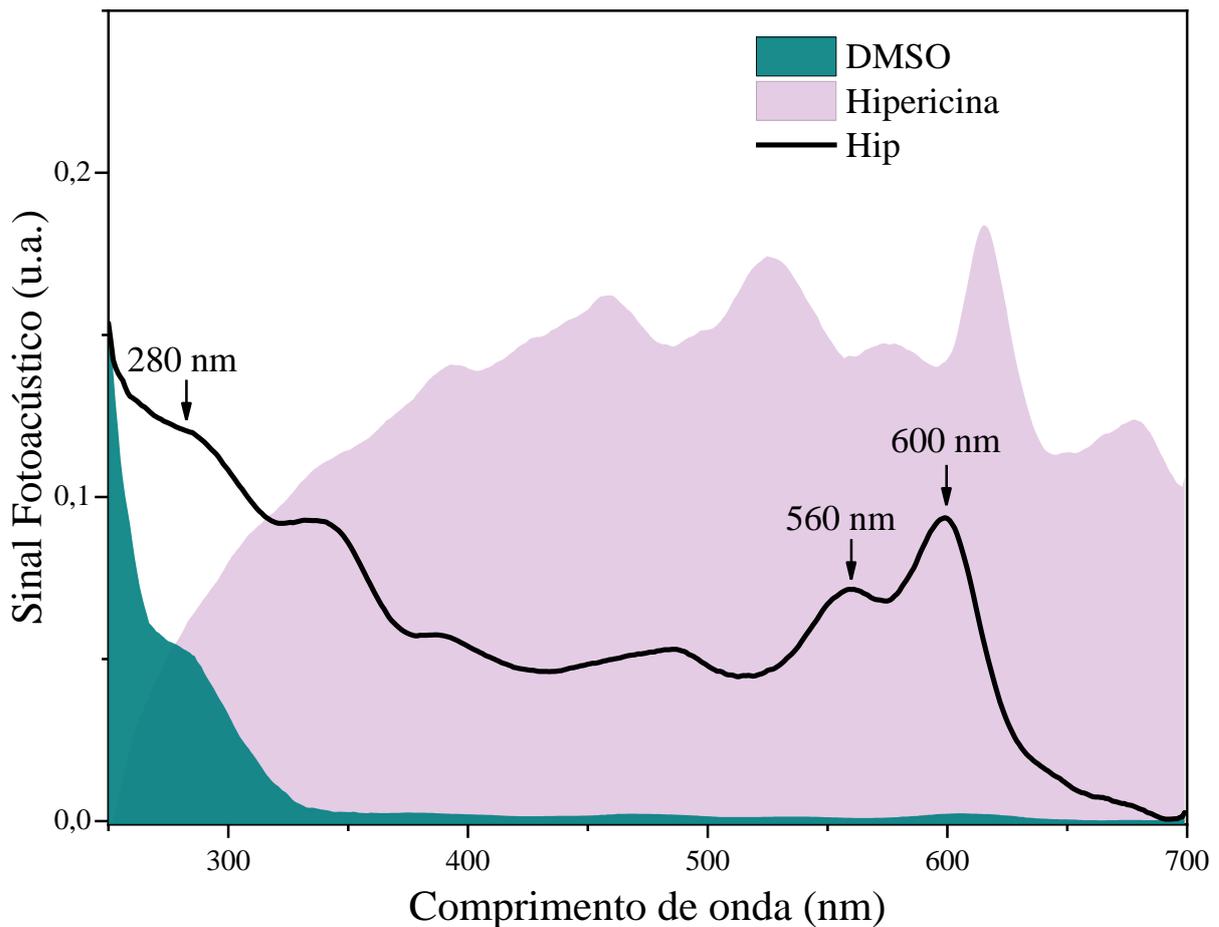
respectivamente. A escolha de tais frequências permitiu estimar o valor de  $\mu_s$  em aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , tanto para as unhas das mãos, quanto para as unhas dos pés, que tinham espessura média de 360 e 820  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Em uma segunda etapa, a permeação da solução de hipericina foi avaliada em unhas *ex vivo* de pacientes com onicomicose. Para isso, fragmentos de unha do pé (hálux) infectados pelos agentes etiológicos *Fusarium solani* (ID 02) e *Trichophyton rubrum* (ID 03) foram coletados e imediatamente colocados em paraformaldeído (4%). Inicialmente, para verificar possíveis alterações estruturais e moleculares na placa ungueal, as amostras foram analisadas em um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier equipado com acessório de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) (Vertex 70v, Bruker). Cada espectro de FTIR-ATR é resultado de 128 medidas sucessivas, realizadas no intervalo espectral de 4000 à 800  $\text{cm}^{-1}$  e com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Após essa análise, o ensaio de permeação foi realizado por UV-Vis-PAS. O procedimento aplicado foi igualmente ao descrito acima, com exceção de que as amostras não foram lixadas. As configurações experimentais também foram as mesmas, exceto a frequência de modulação da luz que foi de 24 Hz.

Os resultados foram analisados estatisticamente por teste t de *Student*, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 2.1.3.3 Resultados e discussão

O espectro de UV-Vis-PAS da hipericina em DMSO mostrou que a solução absorve em toda região espectral analisada, e, a partir dos espectros de seus componentes, foi possível identificar que a banda em 280 nm é majoritariamente devido à absorção do DMSO, enquanto as outras bandas correspondem à absorção da hipericina, sendo as principais centradas em 560 e 600 nm (Figura 12). Estas bandas foram adotadas como marcadores na identificação da permeação da formulação. Além disso, o espectro da hipericina mostrou que sua absorção é máxima na região próxima a 600 nm. Assim, para maior eficiência, o sistema de iluminação usado na PDT deve utilizar emissão máxima também nessa região [6].

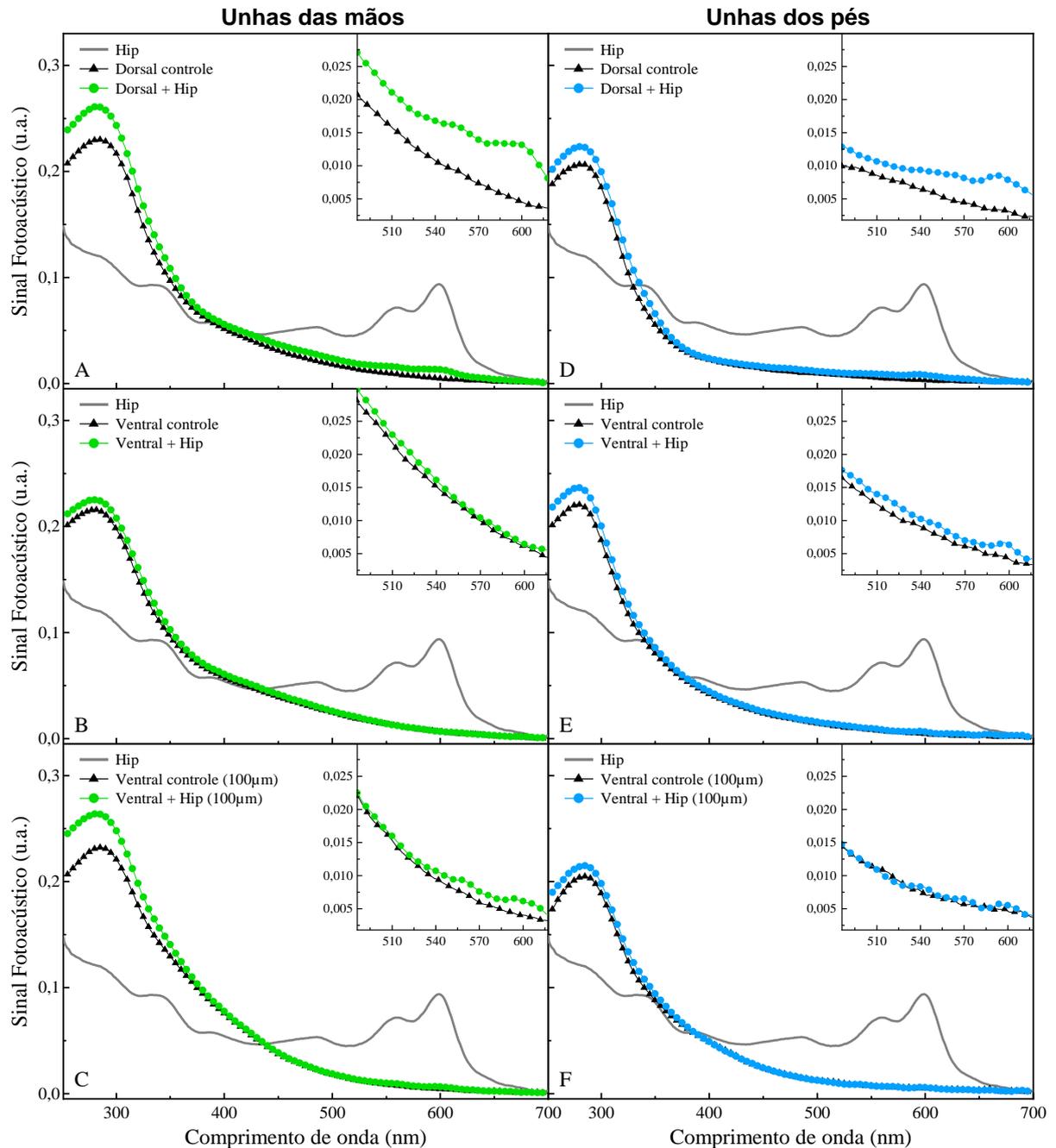


**Figura 12.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS do DMSO, do pó de hipericina e da solução preparada com a mistura destas substâncias (Hip) [6].

A onicomicose pode acometer as unhas das mãos e as dos pés, sendo as últimas mais comumente afetadas [27]. Além disso, os fungos podem estar situados em qualquer região da unidade ungueal, conseqüentemente, podem existir na placa ungueal tanto partes infectadas, quanto partes saudáveis. Dessa forma, para tentar melhor reproduzir as condições clínicas, é importante considerar todas essas condições no momento da avaliação de permeação da formulação nas unhas, verificando a possibilidade de entrega efetiva do fármaco ao local onde está o agente infeccioso.

Os espectros das unhas saudáveis após a aplicação tópica da solução de hipericina mostraram a presença da formulação nas superfícies dorsal e ventral, tanto da unha da mão quanto da unha do pé (Figura 13). Para as leituras da superfície dorsal, nota-se que as bandas características da absorção da solução de hipericina, 280, 560 e 600 nm, foram mais intensas no espectro da unha da mão (Figura 13 (A) e (C)). Por sua vez, para a superfície ventral, identificou-se um aumento de absorção em torno dessas regiões espectrais, porém, com maior intensidade no espectro da unha do pé (Figura 13 (B) e (E)).

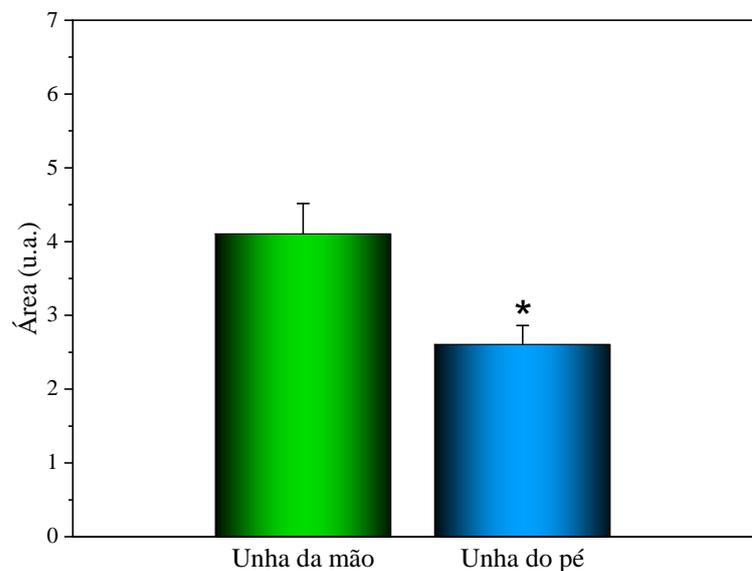
Após reduzir a espessura da amostra para aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , a presença da formulação se intensificou no espectro da unha da mão (Figura 13 (C) e (F)).



**Figura 13.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS de unhas saudáveis sem e com a aplicação de solução de hipericina (Hip) na superfície dorsal. Em (A, B e C) espectros das unhas das mãos e (D, E e F) das unhas dos pés. A ampliação destaca a presença das bandas características da formulação em 560 e 600 nm. Adaptado da referência [6].

Para quantificar a difusão da solução de hipericina nas unhas saudáveis foi feita a integração da área sob as curvas de absorção da superfície dorsal, com posterior

subtração da área do controle. O resultado da integração mostrou uma área significativamente menor para unha do pé (Figura 14). Portanto, esse resultado, juntamente com a interpretação dos espectros de UV-Vis- PAS, sugere principalmente que a solução de hipericina atingiu as camadas mais profundas de ambas as unhas analisadas, porém a maior difusão da formulação ocorreu na placa ungueal do pé do voluntário de maior idade, ou por outro lado, ocorreu uma maior retenção da formulação nas camadas mais superficiais da placa ungueal da mão.

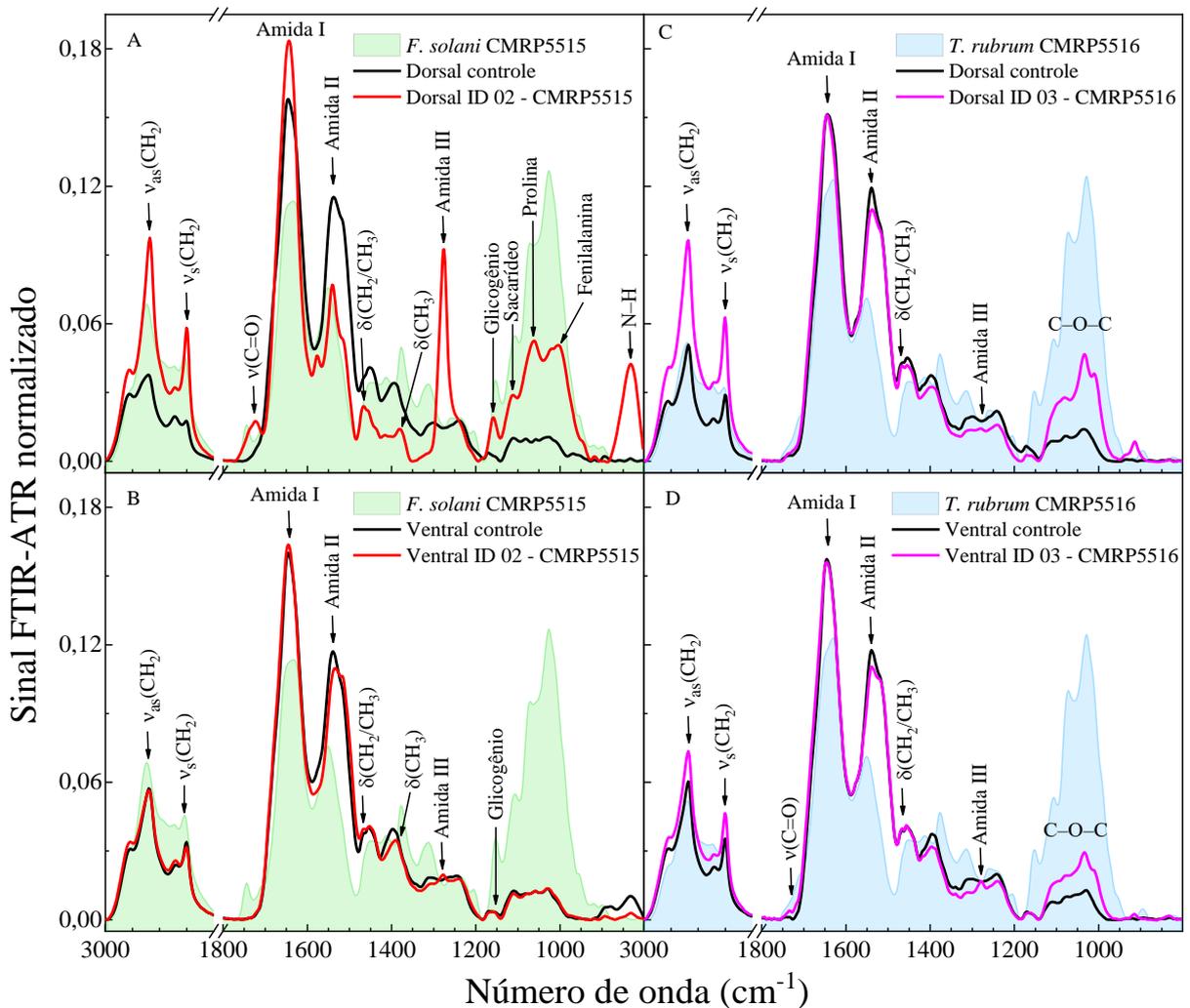


**Figura 14.** Área obtida por meio de integração dos espectros de UV-Vis- PAS da superfície dorsal de amostras de unhas saudáveis das mãos e dos pés que receberam a aplicação de solução de hipericina, com subtração da área do controle. teste t: \* $P < 0,05$ . Adaptado da referência [6].

Antes da avaliação da permeação da solução de hipericina em unhas coletadas de pacientes diagnosticados com onicomicose, os fragmentos de unha foram medidos pela técnica FTIR-ATR com intuito de confirmar a infecção e verificar possíveis alterações produzidas pelos agentes infecciosos na placa ungueal.

Os resultados de FTIR-ATR das leituras dos fragmentos de unha com onicomicose causada por *Fusarium solani* (ID 02) e *Trichophyton rubrum* (ID 03) indicaram alterações espectrais nas superfícies dorsal e ventral devido a interação do agente etiológico com a unha (Figura 15). O espectro do controle apresentou os picos geralmente relatados em espectros de unhas saudáveis: 2919 (estiramento assimétrico de CH<sub>2</sub>), 2850 (estiramento simétrico de CH<sub>2</sub>), 1644 (amida I), 1538 (amida II), 1452 (amida II; deformação de CH<sub>3</sub>), 1239 (amida III), 1077 (esqueleto CC) e 1032 cm<sup>-1</sup> (estiramento CC da queratina). As diferenças espectrais encontradas nas leituras das unhas com onicomicose sugerem

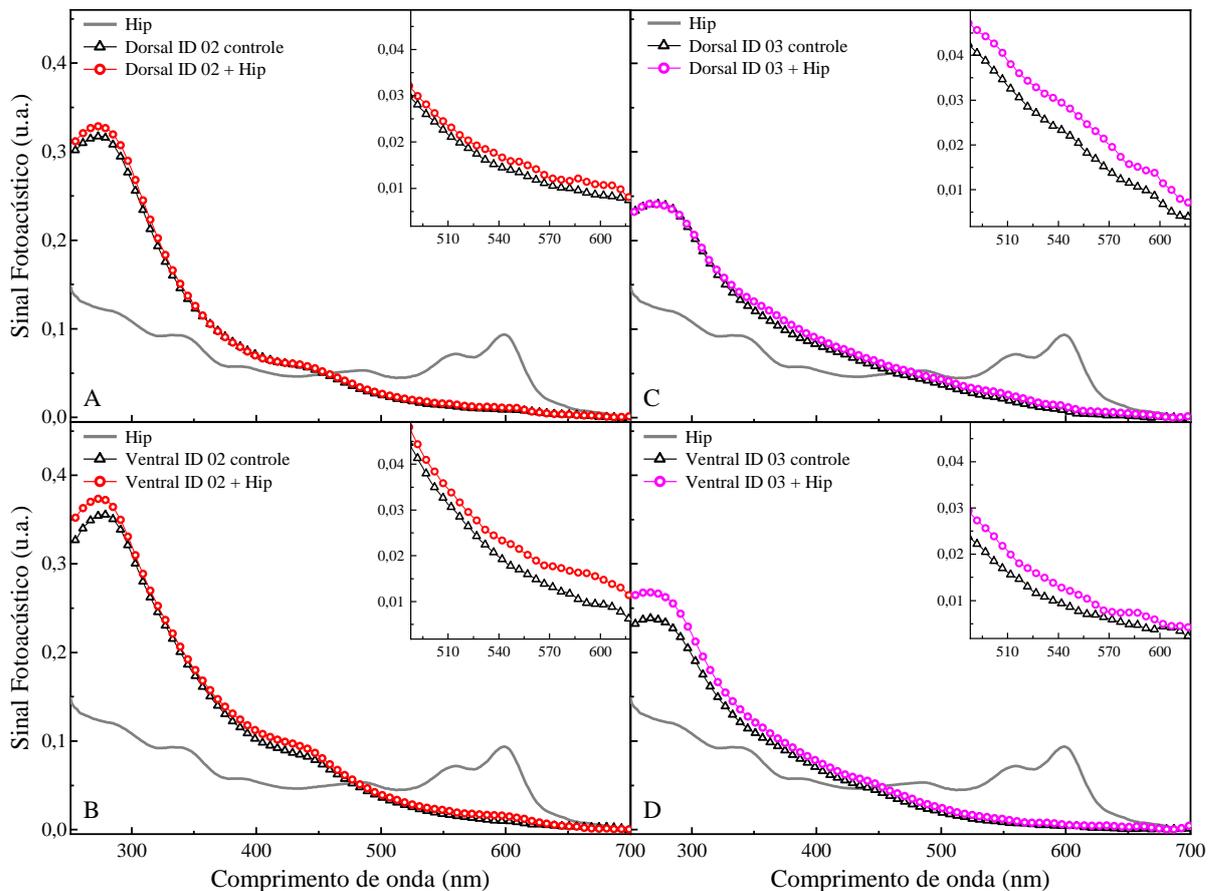
alterações relacionadas a lipídios, proteínas e carboidratos, evidenciadas pelas alterações nas bandas centradas em 2919, 2850, 1750, 1644, 1538, 1465, 1379, 1276, 1157, 1112, 1062, 1003 e 833  $\text{cm}^{-1}$ , cujas atribuições estão mostradas na Figura 15 [15, 102, 103].



**Figura 15.** Espectros obtidos por FTIR-ATR dos agentes etiológicos e das superfícies dorsal e ventral de unhas sem e com onicomicose. Em (A e B) onicomicose causada por *Fusarium solani* (ID 02) e em (C e D) *Trichophyton rubrum* (ID 03). Controle: fragmentos de unha saudáveis coletados dos respectivos pacientes.  $v$ : modo de vibração de estiramento;  $v_{as}$ : estiramento assimétrico;  $v_s$ : estiramento simétrico;  $\delta$ : modo de vibração de deformação angular [6].

As alterações espectrais observadas no presente estudo são semelhantes às relatadas por Veiga e colaboradores [102] ao analisar também por FTIR-ATR o processo de infecção ungueal causado por *Fusarium oxysporum*, utilizando unhas humanas *ex vivo* como única fonte nutricional para os fungos. Assim, por meio dos resultados de FTIR-ATR é possível inferir que a técnica detectou alterações na estrutura ungueal causadas pela invasão das diferentes cepas fúngicas.

Em relação a análise de permeação, os espectros de UV-Vis-PAS das unhas acometidas por *Fusarium solani* (ID 02) e *Trichophyton rubrum* (ID 03) com a aplicação da solução de hipericina mostraram aumento de absorção em 280 nm juntamente com a identificação das bandas de absorção óptica em 560 e 600 nm, com esse comportamento sendo semelhante em ambas as superfícies (Figura 16). A identificação dessas bandas na superfície ventral indica que a solução de hipericina permeou todas as camadas da placa ungueal acometida por onicomicose (Figura 16 (B) e (C)).



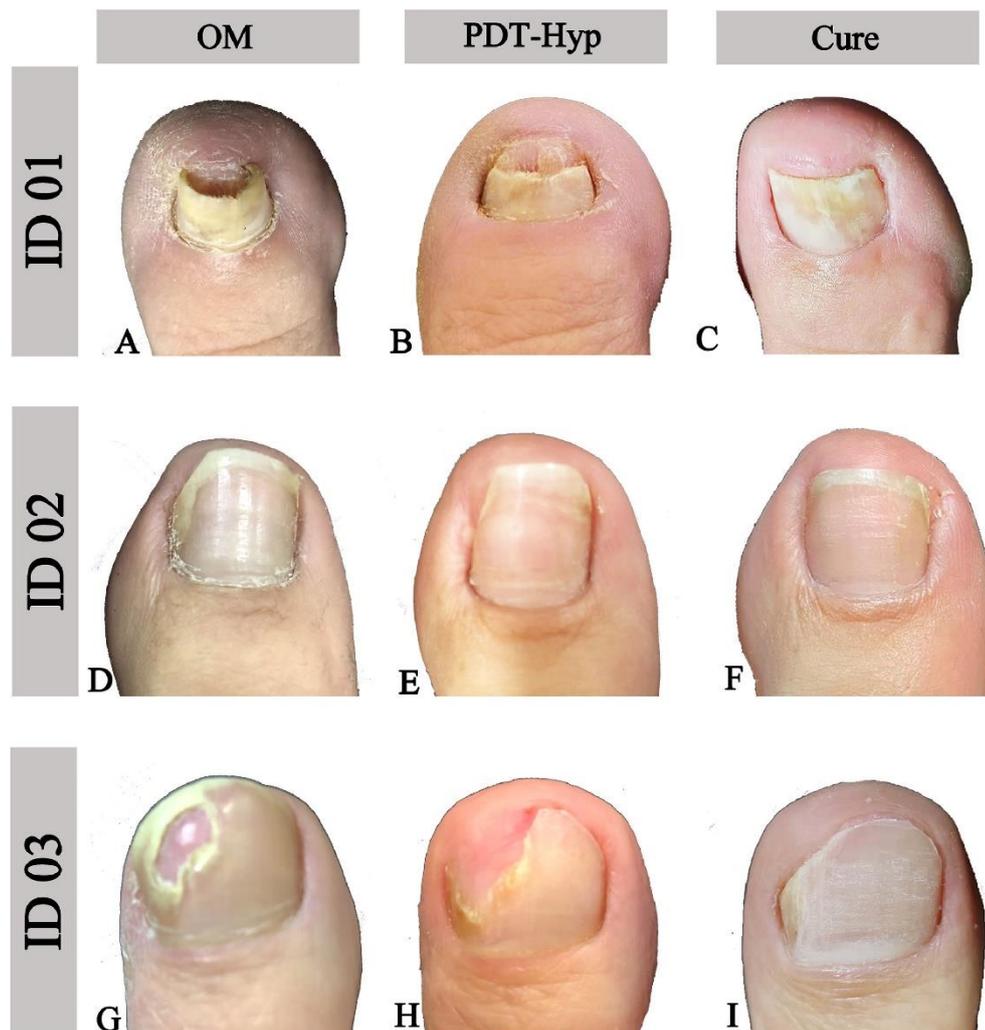
**Figura 16.** Espectros obtidos por UV-Vis-PAS das superfícies dorsal e ventral de unhas com onicomicose após a aplicação de solução de hipericina (Hip) na superfície dorsal. Em (A e B) onicomicose causada por *Fusarium solani* (ID 02) e em (C e D) *Trichophyton rubrum* (ID 03). Controle: fragmentos de unha saudáveis coletados dos respectivos pacientes sem Hip. Adaptado da referência [6].

A erradicação da infecção fúngica está relacionada, entre outros fatores, com a entrega do princípio ativo ao patógeno alvo, no entanto, as próprias características físicas e químicas da placa ungueal fornecem obstáculos à sua difusão, impedindo o sucesso terapêutico [23, 104]. No presente estudo, os resultados se mostraram favoráveis, uma vez que a técnica UV-Vis-PAS indicou que a solução de hipericina tem

capacidade de se difundir por toda a estrutura ungueal, tanto de unhas saudáveis com diferentes espessuras, quanto unhas acometidas por diferentes cepas fúngicas, e, assim pode contribuir para a eficácia do tratamento da onicomicose.

Conforme mencionado anteriormente, a formulação avaliada neste estudo foi de fato aplicada no tratamento clínico de pacientes com onicomicose. Para isso, Conrado [6] selecionou pacientes voluntários de ambos os sexos, com idade entre 25 e 60 anos, que apresentavam alterações ungueais sugestivas de onicomicose. Para confirmar o diagnóstico dessa doença, o material ungueal foi submetido a exames micológicos diretos. No total, três pacientes foram incluídos no estudo, todos com onicomicose exclusivamente em uma única unha. Antes do início do tratamento, foram realizados procedimentos preparatórios, os quais incluíram assepsia da região afetada das unhas com 70% de álcool e desbridamento para facilitar a penetração da solução de hipericina. O tratamento consistiu em aplicar essa formulação na área desbridada e proteger da luz por um período de 30 minutos (o mesmo protocolo adotado para as análises de UV-Vis-PAS). Depois disso, a região foi exposta a um sistema de iluminação contendo LED. As sessões de tratamento com PDT mediada por hipericina foram realizadas semanalmente e para estabelecer a cura completa dois critérios foram considerados: cura micológica, determinada por meio de resultados negativos de exame micológico direto, e cura clínica, indicada pelo crescimento saudável da placa ungueal.

Conrado [6] relata que todos os pacientes apresentaram cura micológica após quatro sessões de tratamento, com uma sessão adicional sendo realizada como medida profilática. A cura clínica também foi alcançada por todos os pacientes, contudo o período para alcançá-la foi diferente para cada paciente devido a condições individuais. O paciente ID 01 exibia a pele dos pés muito seca em razão à sua diabetes, o que interferiu no crescimento da placa ungueal aderida ao leito ungueal, sendo necessário um procedimento adicional (uso tópico de ureia) para melhorar o umedecimento e a hidratação da área afetada. Como resultado, somente após um período de 12 meses foi observado o crescimento de uma placa ungueal saudável. No caso do paciente ID 02, um paciente mais jovem, o crescimento completo da placa ungueal foi evidenciado em um período de apenas 5 meses. Por fim, o paciente ID 03 atingiu a condição de cura clínica 7 meses após o início do tratamento. A Figura 17 mostra fotografias das unhas dos pacientes tiradas para acompanhar o progresso do tratamento.



**Figura 17.** Fotografias das unhas dos pacientes ID 01, ID 02 e ID 03 tratados com PDT mediada por hipericina. Em (A, D e G), unhas antes do tratamento. Em (B, E e H), unhas após quatro sessões do tratamento, quando foi observada a cura micológica. Em (C, F e I), unhas saudáveis, caracterizando o final do tratamento. Reproduzido da referência [6].

Cabe ressaltar ainda que os paciente não relataram quaisquer efeitos adversos durante as sessões de PDT com hipericina. Portanto, levando em consideração todos os resultados do estudo, essa alternativa terapêutica se mostrou eficaz e também segura para tratar onicomicose, sendo considerada promissora para ser incorporada na prática clínica [6]. No que se refere a esta tese, estes resultados são relevantes porque as informações obtidas com os métodos utilizados podem auxiliar no processo de desenvolvimento das formulações, inclusive para eventual certificação de qualidade e para fins de registro nos órgãos de controle.

## Capítulo 3

# Espectroscopia Raman e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier via Reflectância Total Atenuada para análise de materiais dentários

### 3.1 Cerâmicas odontológicas de zircônia

#### 3.1.1 Introdução

Os pacientes odontológicos têm buscado cada vez mais restaurações que apresentem características semelhantes ao dente natural. Diante dessa realidade e dos avanços tecnológicos realizados nos últimos anos, os materiais totalmente cerâmicos ganharam posição de destaque na confecção de restaurações dentárias. Esses materiais possuem excelentes propriedades estéticas, aliada a uma boa estabilidade química no ambiente oral, propriedades mecânicas adequadas e biocompatibilidade [105–108].

Dentre os diversos materiais cerâmicos restauradores disponíveis no mercado para uso em odontologia, as cerâmicas à base de zircônia, ou dióxido de zircônio ( $ZrO_2$ ), são populares devido principalmente as suas excelentes propriedades mecânicas [109–112], em particular, a cerâmica de zircônia tetragonal policristalina estabilizada com 3% em mol de ítria (3Y-TZP) é a variante tradicional e mais utilizada [108]. Contudo, a principal desvantagem dessa cerâmica é sua alta opacidade. Para superar essa limitação, estas cerâmicas passaram por modificações em sua composição e microestrutura, e como resultado, novas cerâmicas com propriedades ópticas otimizadas foram introduzidas no mercado odontológico. São exemplos desses materiais mais translúcidos as cerâmicas de zircônia parcialmente estabilizada com 4% ou 5% em mol de ítria, (4Y-PSZ) e (5Y-PSZ), respectivamente [113].

A zircônia pura, à pressão ambiente, apresenta três formas cristalográficas dependendo da temperatura de preparação: monoclinica, da temperatura ambiente até 1170 °C; tetragonal, na faixa de temperatura entre 1170 e 2370 °C; e cúbica, para temperaturas superiores a 2370 °C até o seu ponto de fusão [114]. A transformação da fase tetragonal para monoclinica durante o resfriamento de uma massa fundida de zircônia pura é acompanhada por um aumento significativo de volume, o que torna inviável a confecção de cerâmicas sinterizadas compostas de zircônia pura, pois essa mudança volumétrica leva ao aparecimento de tensões excessivamente altas e de trincas indesejadas na estrutura do material [114–116]. Entretanto, essa transformação pode ser evitada pela adição de óxidos metálicos, como o óxido de ítrio ( $Y_2O_3$ ; também conhecido como ítria), ao pó de zircônia, com isso estabiliza-se as fases tetragonal e/ou cúbica à temperatura ambiente [113, 115, 117].

Uma etapa essencial para se obter adesão confiável e durável entre o cimento resinoso e a cerâmica à base de zircônia é a realização de um tratamento da superfície da cerâmica, esse procedimento deve aprimorar sua rugosidade de superfície e a receptividade da ligação [117, 118]. O tratamento mecânico mais utilizado é o jateamento da superfície da cerâmica de zircônia com partículas de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ) [119, 120]. Contudo, devido à metaestabilidade da fase tetragonal, tratamentos que induzem estresse e têm potencial de modificar a superfície podem desencadear zonas de transformação tetragonal-monoclinica. Embora essa transformação resulte na expansão de volume e na formação concomitante de tensões de compressão que dificultam a propagação das trincas, melhorando as propriedades mecânicas do material, como a resistência à flexão, ela pode aumentar a suscetibilidade da zircônia ao envelhecimento [114, 117]. Em função disso e de não existir ainda, até onde se sabe, um consenso do melhor protocolo de tratamento de superfície, busca-se tratamentos alternativos que produzam uma superfície adequada para receber o agente de cimentação, mas sem ocasionar a diminuição da confiabilidade da cerâmica de zircônia a longo prazo.

Neste caso, a Espectroscopia Raman (RS) pode ser empregada para a análise da transformação de fase e da tensão residual [121, 122]. Essa técnica na configuração confocal pode oferecer vantagens como: detectar a mudança de fase em áreas pequenas e localizadas, isto é, identificar e mapear a distribuição das fases na superfície [123, 124], e, medir a taxa de transformação de fase em profundidade no material [123, 125]. Além

disso, cabe ressaltar que é uma técnica não destrutiva e a amostra é analisada diretamente sem preparação adicional.

Diante desse contexto, o objetivo deste estudo é usar a RS para avaliar o efeito do tratamento de superfície com jateamento de partículas de óxido de alumínio ou com plasma de argônio não térmico na transformação de fase e na tensão residual de diferentes cerâmicas odontológicas de zircônia.

O estudo foi desenvolvido em colaboração com o professor Dr. Lourenço Correr Sobrinho e a doutoranda Fernanda Midori Tsuzuki do Programa de Pós-Graduação em Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP). Estes dados eventualmente poderão vir a ser parte da tese da referida aluna.

### **3.1.2 Procedimento experimental**

Três tipos de cerâmica de zircônia disponível comercialmente foram utilizados: 3Y-TZP (HT, Katana, Kuraray Noritake Dental), 4Y-PSZ (STML, Katana, Kuraray Noritake Dental) e 5Y-PSZ (UTML, Katana, Kuraray Noritake). Inicialmente, foram confeccionadas amostras na forma de barras com dimensões de 12 mm de comprimento x 3 mm de largura x 3 mm de espessura. Posteriormente, tais amostras foram sinterizadas em um forno, atingindo 1550°C (taxa de aumento de 10°C/min), permanecendo por 2 h nessa temperatura e seguido de resfriamento (taxa de diminuição de 10°C/min), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a sinterização, as amostras (cujas as dimensões finais eram: 8 mm de comprimento x 2 mm de largura x 2 mm de espessura) foram submetidas a um dos seguintes tratamentos de superfície: (1) jateamento com partículas de óxido de alumínio de 50 µm de diâmetro durante 20 s a 0,3 Mpa e uma distância de 20 mm; (2) plasma de argônio não térmico por 30 s e 10 mm. Uma amostra de cada tipo de zircônia foi mantida sem tratamento e seu espectro usado como referência (controle). Um resumo dos grupos investigados neste estudo está apresentado na Tabela 2.

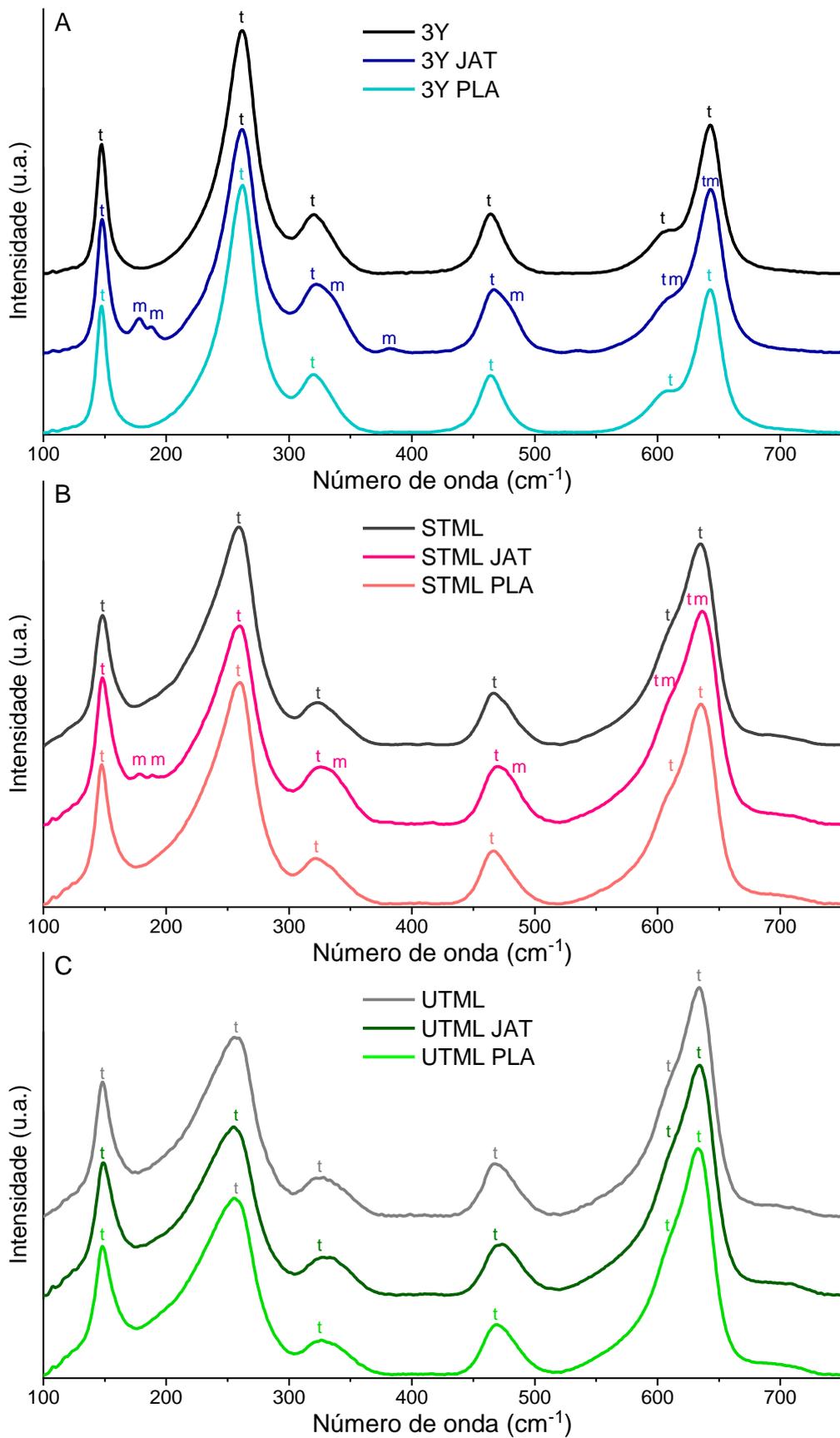
**Tabela 2.** Resumo dos grupos experimentais

<b>Grupo</b>	<b>Tipo de zircônia</b>	<b>Tratamento</b>
3Y JAT (n=10)	zircônia clássica (3Y-TZP)	Jateamento com partículas de óxido de alumínio de 50 µm
3Y PLA (n=10)	zircônia clássica (3Y-TZP)	Aplicação de plasma de argônio não térmico por 30 s
STML JAT (n=10)	zircônia super translúcida (4Y-PSZ)	Jateamento com partículas de óxido de alumínio de 50 µm
STML PLA (n=10)	zircônia super translúcida (4Y-PSZ)	Aplicação de plasma de argônio não térmico por 30 s
UTML JAT (n=10)	zircônia ultra translúcida (5Y-PSZ)	Jateamento com partículas de óxido de alumínio de 50 µm
UTML PLA (n=10)	zircônia ultra translúcida (5Y-PSZ)	Aplicação de plasma de argônio não térmico por 30 s

Os espectros Raman das amostras foram adquiridos por meio de um microscópio Raman confocal (Senterra, Bruker). Para excitar a amostra foi utilizado o laser em 532 nm com potência nominal de 20 mW, o qual foi focado por uma lente objetiva com aumento de 100x. A abertura confocal usada foi um *pinhole* de 50 µm. As medidas foram realizadas selecionando uma linha de três pontos na região central de cada amostra. O espectro de cada ponto é o resultado de 6 varreduras com 60 s de integração, sendo coletado no intervalo espectral de 70 à 1540  $\text{cm}^{-1}$  e com resolução de 3-5  $\text{cm}^{-1}$ . Todos os espectros foram corrigidos por linha de base e normalizados pelo vetor normalização usando o software OPUS (versão 8.5, Bruker Optics GmbH).

### 3.1.3 Resultados e discussão

A Figura 18 mostra os espectros Raman obtidos das cerâmicas de zircônia sem e com os tratamentos de superfície e a identificação da fase cristalina referente a cada pico [123, 125, 126].



**Figura 18.** Espectros Raman das superfícies de cerâmicas de zircônia (A) 3Y, (B) STML e (C) UTML antes e após tratamento com jateamento de partículas de óxido de alumínio ou com plasma de argônio. Os picos da zircônia tetragonal e monoclinica são indexados com t e m, respectivamente.

Os espectros Raman dos controles apresentam seis picos provenientes dos modos vibracionais da zircônia tetragonal. Os espectros Raman das cerâmicas de zircônia 3Y e STML (Figura 18A e 16B) submetidas ao jateamento com partículas de óxido de alumínio são diferentes dos seus respectivos controles, pode-se observar dois picos em torno de 178 e 188  $\text{cm}^{-1}$ , ombros próximos à 332 e 476  $\text{cm}^{-1}$ , alargamento de bandas em aproximadamente 612 e 643  $\text{cm}^{-1}$  e, para a zircônia 3Y, um pico adicional em 382  $\text{cm}^{-1}$ . Todas essas alterações espectrais são características da presença da fase monoclinica, indicando a transformação da fase tetragonal para monoclinica em 3Y e STML após o jateamento.

Já para as cerâmicas de zircônia 3Y e STML (Figura 18A e 16B) submetidas ao tratamento com plasma de argônio não térmico, bem como, para a cerâmica da zircônia UTML (Figura 18C) submetidas a ambos os tratamentos de superfície, os espectros Raman apresentam os mesmos picos presentes no espectro do controle, ou seja, não tem evidências da presença da fase monoclinica, e, portanto, indica que a análise Raman não detectou a transformação para fase monoclinica nessas amostras.

Em relação ao tratamento com plasma de argônio não térmico, resultados semelhantes foram relatados por Negreiros e colaboradores [117]. No estudo, os autores aplicaram plasma de argônio por 10 ou 60 segundos na superfície de 3Y-TZP e por meio da análise de DRX também não foi detectada a transição da fase tetragonal para a monoclinica.

Para as amostras com transformação de fase detectável – 3Y-JAT e STML-JAT – é possível realizar uma análise quantitativa baseada no fato de que as fases tetragonal e monoclinica produzem bandas Raman com intensidade proporcional à sua concentração [122]. Diante disso, a fração volumétrica de fase monoclinica ( $V_m$ ) pode ser estimada por meio da seguinte equação [122]:

$$V_m = \frac{I_m^{178} + I_m^{188}}{2.2(I_t^{147}) + I_m^{178} + I_m^{188}} \quad (3)$$

Na qual,  $I_m$  e  $I_t$  correspondem as intensidades integradas dos picos monoclinicos e tetragonais, respectivamente, identificados pelos deslocamentos Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) que se encontram sobrescrito.

Neste estudo, a fração volumétrica de fase monoclinica foi calculada usando a área do pico obtida por meio de integração numérica. O resultado está apresentado na Tabela 3 e revelou que percentual de fase monoclinica foi consideravelmente maior para a cerâmica de zircônia 3Y JAT em comparação a STML JAT.

**Tabela 3.** Média da fração volumétrica de fase monoclinica obtida por meio da equação 3.

<b>Grupo</b>	<b>Número de espectros analisados *</b>	<b><math>V_m</math> (%)</b>
3Y JAT	30	7,1
STML JAT	26	1,7

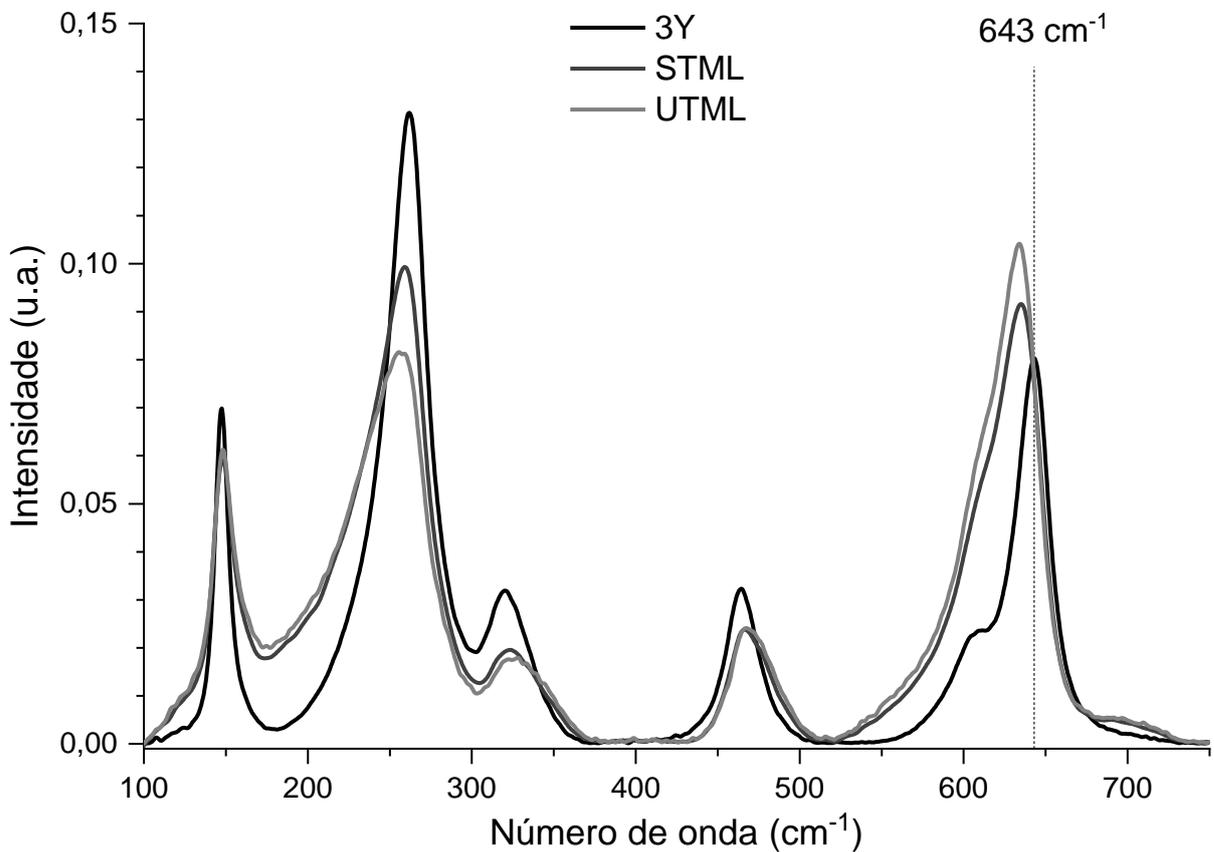
\* corresponde ao número de espectros nos quais picos da fase monoclinica foram observados. Vale ressaltar que foram analisadas 10 amostras por grupo e para cada amostra três pontos foram medidos, portanto, o número máximo de espectros obtidos por grupo é igual a 30.

A variação na transformação de fase observada para as amostras jateadas com partículas de óxido de alumínio provavelmente está relacionada com a diferença de ítria presente nas três classes de cerâmicas de zircônia investigadas. Estudos anteriores [118, 127] mostraram que KATANA HT contém o menor teor de ítria, seguida por KATANA STML e por último, contendo o maior teor de ítria, KATANA UTML. Correlacionando esses dados com o do presente estudo, percebe-se que conforme a quantidade de estabilizante aumenta, a transformação de zircônia tetragonal para monoclinica diminui.

Em geral, de acordo com a literatura, quando se tem um alto conteúdo de ítria, existe pouca quantidade de zircônia tetragonal e há maior presença de zircônia cúbica, a qual não sofre transformação de fase induzida por estresse [112, 113, 127]. Adicionalmente, a ítria também pode se acumular nos grãos tetragonais restantes e levar a uma maior estabilidade desta fase. Dessa forma, o maior teor de ítria reflete em uma baixa transformação da zircônia [112, 118, 121].

Em relação a fase cúbica da zircônia, é possível sua identificação nos espectros Raman das nossas amostras, porém, a análise não é de forma direta devido à sobreposição de picos. A Figura 19 mostra uma comparação entre os espectros Raman das três cerâmicas de zircônia sem nenhum tratamento de superfície (espectros nomeados como controle na Figura 18). O espectro Raman da zircônia 3Y é composto basicamente por bandas referentes a fase tetragonal, e, em relação a ele, as outras zircônias apresentam várias diferenças espectrais, nota-se o alargamento das bandas, a redução de intensidade

das bandas centradas em aproximadamente 262, 320 e 464  $\text{cm}^{-1}$  e o deslocamento com aumento de intensidade da banda em 643  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, essas alterações foram mais acentuadas na zircônia UTML.



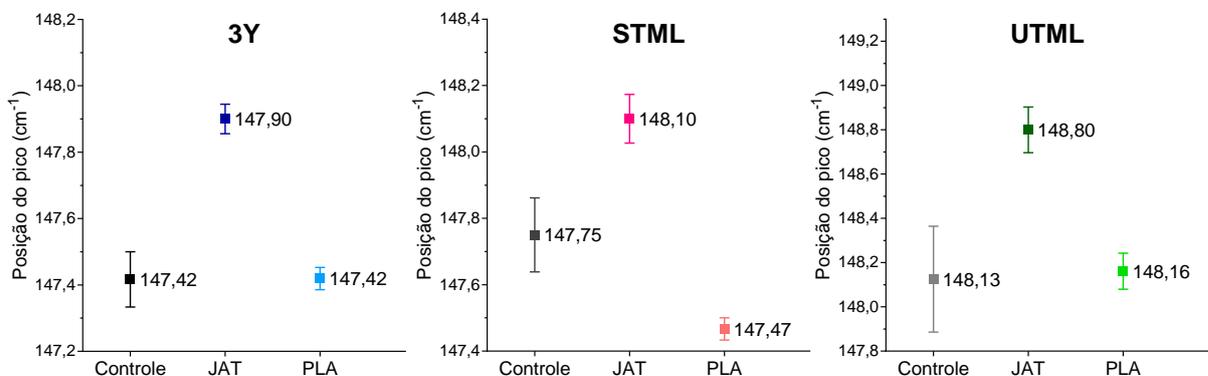
**Figura 19.** Espectros Raman das cerâmicas de zircônia sem tratamento de superfície. A linha pontilhada indica o deslocamento da banda centrada em 643  $\text{cm}^{-1}$ .

De acordo com a literatura [126], o espectro Raman da fase cúbica da zircônia é caracterizado principalmente por uma banda larga e intensa centrada em aproximadamente 600  $\text{cm}^{-1}$  e um perfil de linha de base mais elevado, isto é, pontos de mínimos mais altos. Esta última característica ocorre para as bandas em torno de 150, 250, 360 e 480  $\text{cm}^{-1}$ , as quais não estão bem resolvidas e se apresentam com baixa intensidade. Pode-se perceber que as alterações anteriormente descritas para os espectros das cerâmicas de zircônia STML e UTML estão próximas das regiões espectrais características da zircônia cúbica, em particular a banda em 643  $\text{cm}^{-1}$  mostra um aumento de intensidade e um deslocamento para menores números de onda exatamente na região espectral onde a fase cúbica apresenta sua banda mais proeminente [126]. Assim, os resultados sugerem que a RS detectou a contribuição da fase cúbica nos espectros das

cerâmicas de zircônia STML e UTML, com esta última cerâmica indicando uma maior contribuição.

A análise dos espectros Raman também permite identificar se existe a presença de tensão residual na superfície da zircônia tratada. As bandas Raman dos fônons da estrutura cristalina se alteram quando submetidas a estresse, cada ponto da amostra sólida espalha a luz com um número de onda Raman característico da tensão existente naquele local [123]. O pico relativamente intenso e nítido em torno de  $147\text{ cm}^{-1}$  referente a fase tetragonal, que não se sobrepõe a nenhum da fase monoclinica, pode ser usado para verificar a existência de tensões residuais na superfície de amostras de zircônia, a mudança na posição desse pico para um número de onda maior indica a presença de tensões compressivas residuais [118, 121, 123]. A origem destas tensões pode ser vinculada aos efeitos combinados de impacto/desgaste mecânico e de transformação de fase [123].

A Figura 20 mostra a posição do pico em torno de  $147\text{ cm}^{-1}$  para as cerâmicas de zircônia antes e após os tratamentos de superfície. Um deslocamento significativo desse pico em direção a maiores números de onda foi observado para todas as cerâmicas de zircônia submetidas ao jateamento com partículas de óxido de alumínio, indicando assim, a existência de tensão de compressão na superfície induzida pelo tratamento. Para as cerâmicas de zircônia tratadas com plasma de argônio não térmico esse deslocamento não foi detectado, como esperado, uma vez que não foi observada a transformação da fase tetragonal para monoclinica nessas amostras e também não teve impacto de partículas contra sua superfície.



**Figura 20.** Posição do pico Raman da zircônia tetragonal em torno de  $147\text{ cm}^{-1}$  em função dos tratamentos de superfície. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M;  $n = 10$  amostras/grupo.

Além da identificação da presença ou não de uma determinada banda no espectro Raman, informações também podem ser extraídas a partir de alterações nos parâmetros como a posição da banda, sua intensidade e seu formato. Assim, nesse estudo mostrou-se algumas das possibilidades associadas à análise Raman de cerâmicas de zircônia ao mesmo tempo que forneceu dados sobre o efeito do jateamento com óxido de alumínio e da aplicação de plasma de argônio não térmico na superfície da cerâmica, tendo em vista contribuir para uma melhor compreensão e adaptação de suas propriedades no âmbito da odontologia.

## 3.2 Cimentos resinosos

### 3.2.1 Introdução

Restaurações cerâmicas isentas de metal, as quais incluem facetas, *inlays*, *onlays* e coroas, tornaram-se comuns na prática odontológica diária em razão da demanda por estética e às excelentes propriedades ópticas, físicas, químicas e biológicas que as cerâmicas dentárias apresentam. No entanto, nessas restaurações, não apenas as propriedades das cerâmicas são importantes, mas também as propriedades do agente adesivo usado para unir esse material ao tecido dentário. O sucesso a longo prazo das restaurações cerâmicas depende em grande parte de uma interface adesiva de qualidade [106, 128–130].

Dentre os diferentes cimentos dentários disponíveis para reter as restaurações cerâmicas em uma posição estável, os cimentos à base de resina, chamados de cimentos resinosos, têm sido amplamente utilizados [131–133]. As características adesivas, a baixa micro infiltração, a baixa solubilidade em meio aquoso e a biocompatibilidade são algumas das vantagens que justificam a escolha desse material [106, 134].

De acordo com o modo de ativação do processo de polimerização, os cimentos resinosos são classificados em: autopolimerizáveis, fotopolimerizáveis e dual-polimerizáveis. Os cimentos resinosos autopolimerizáveis possuem ativação química, iniciando a reação de polimerização após a mistura de duas pastas, uma delas contendo um iniciador (geralmente peróxido de benzoíla) e outra contendo uma amina terciária. Os cimentos resinosos fotopolimerizáveis possuem ativação física, neste caso, tem-se apenas uma pasta, que é composta por uma molécula fotossensível (geralmente canforoquinona) e uma amina terciária. Na presença de luz com comprimento de onda apropriado (geralmente na região do ultravioleta-azul), esses dois componentes reagem e promovem o início da reação de polimerização. Por fim, os cimentos resinosos duais combinam ambas as ativações, dessa forma, a reação de polimerização inicia-se pela exposição à luz e pela autopolimerização [131, 135].

No processo de polimerização, os radicais livres produzidos após a ativação do sistema interagem com os monômeros do material quebrando as duplas ligações carbono-carbono. Em seguida, os monômeros se ligam a outros monômeros em sucessão para

formar a cadeia polimérica, ou seja, nesse processo os monômeros são convertidos em polímeros. O grau de conversão é o parâmetro associado a esse efeito [131, 135]. Uma polimerização inadequada, evidenciada pelo baixo grau de conversão, ocasiona a diminuição das propriedades mecânicas do material, o aumento da sorção de água e da solubilidade, além de ser uma condição crítica para a biocompatibilidade, pois uma quantidade elevada de monômeros que não reagiram pode provocar efeitos adversos locais, como por exemplo irritação e a inflamação do tecido pulpar [136]. Logo, a polimerização adequada é fundamental.

Existem múltiplos fatores que podem afetar a eficiência da polimerização de um cimento resinoso. Alguns deles estão relacionados ao próprio cimento resinoso, como composição, modo de ativação e tempo de presa, outros relacionados a cerâmica, como tipo, espessura, tonalidade e translucidez, ou ainda, ao protocolo de fotoativação, como a potência e a distância da fonte de luz [131, 136]. Sabe-se que no processo de fotoativação do cimento sob uma cerâmica, uma parte da luz é perdida por dispersão e absorção, contudo, na literatura ainda não há um consenso sobre o quanto a atenuação na transmissão de luz através de cerâmicas com diferentes níveis de translucidez e espessuras pode afetar as propriedades do material cimentante. Assim, é de particular interesse estudar como essa atenuação pode interferir no grau de conversão do cimento resinoso [106].

Tem sido uma prática comum analisar o processo de polimerização por meio das técnicas espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier via reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e espectroscopia Raman (RS) [137–139]. Ambas as técnicas fornecem informações sobre os modos vibracionais associados as ligações químicas da molécula, o que permite avaliar o grau de conversão do material. A diferença entre elas está no fato de que FTIR-ATR é uma técnica de absorção de luz, enquanto RS é uma técnica de espalhamento de luz. No entanto, as frequências vibracionais de uma molécula observadas por essas técnicas são as mesmas, o que pode diferir no espectro é a presença ou não de uma banda referente à uma determinada ligação e as intensidades das bandas, devido as regras de seleção associadas aos fenômenos de absorção ou espalhamento característicos de cada uma destas técnicas [137].

Nesse viés, este estudo tem como objetivo principal avaliar o grau de conversão de cimentos resinosos fotoativados sob cerâmicas odontológicas de zircônia ou dissilicato

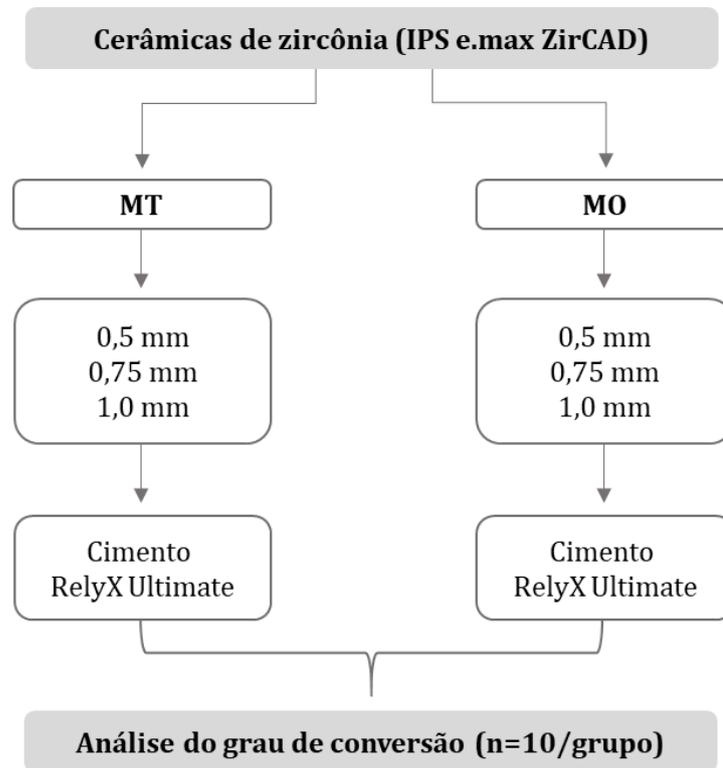
de lítio com diversos níveis de translucidez e espessuras por meio de técnicas de espectroscopia vibracional, abrangendo a FTIR-ATR (parte I) e a RS (parte II).

Ambas as partes deste estudo foram desenvolvidas em parceria. A primeira com o professor Dr. Lourenço Correr Sobrinho e sua aluna Fernanda Midori Tsuzuki do Programa de Pós-Graduação em Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. A segunda parte com o professor Dr. Paulo Henrique dos Santos e sua aluna Mariana Elias Queiroz do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os dados da primeira parte eventualmente poderão vir a ser incluídos na tese da referida aluna, enquanto os da segunda fazem parte da dissertação da referida aluna [140] e de um artigo já publicado [106].

### **3.2.2 Procedimento experimental**

Na parte I, amostras de cerâmicas de zircônia com dois níveis de translucidez (média translucidez – MT; média opacidade – MO) e três espessuras (0,5 mm; 0,75 mm; 1,0 mm) foram fabricadas conforme descrito em [141]. Para a confecção das amostras fotoativadas utilizando essas cerâmicas foi empregado o cimento resinoso RelyX Ultimate (3M ESPE, St. Paul, MN, USA). Este foi inserido em um molde de elastômero com um orifício de 5,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de profundidade, que estava posicionado sobre uma fita de poliéster sobre uma placa de vidro. Após preencher toda a matriz, sua parte superior foi coberta com outra tira de poliéster seguida de uma cerâmica e o cimento resinoso foi fotoativado por 20s com a ponta do fotopolimerizador (Bluephase G2, Ivoclar) em contato direto com a superfície da cerâmica. Ao término do processo de fotoativação, a amostra de cimento resinoso foi retirada da matriz e armazenada em recipiente escuro contendo água deionizada por 30 dias. Dez amostras de cimento resinoso foram preparadas para cada cerâmica. Para melhor entendimento dos grupos experimentais, um fluxograma desta parte é apresentado na Figura 21.

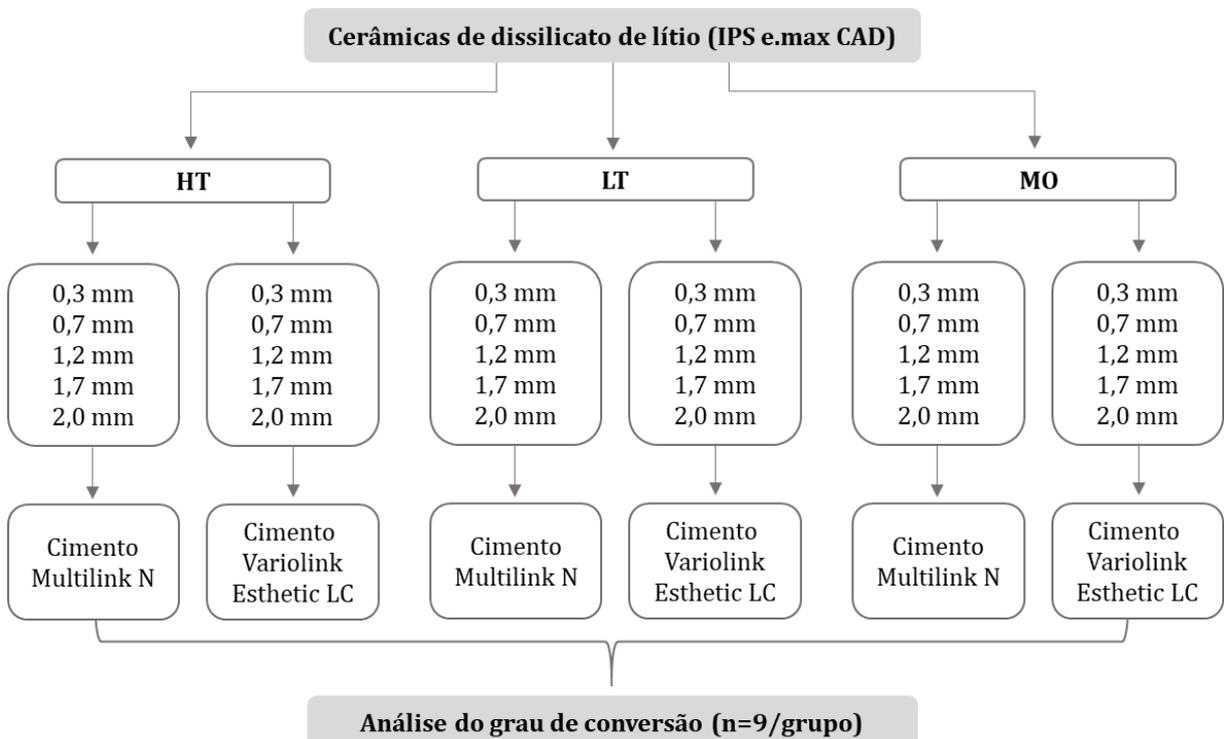
Os espectros para a análise do grau de conversão dessas amostras foram adquiridos no espectrômetro FTIR-ATR (Vertex 70v, Bruker). As medidas foram realizadas na superfície irradiada da amostra. Os espectros foram coletados no intervalo espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 128 varreduras e resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 21.** Fluxograma detalhando a divisão dos grupos experimentais.

Na parte II deste estudo, amostras de cerâmicas de dissilicato de lítio com três níveis de translucidez (alta translucidez – HT; baixa translucidez – LT; média opacidade – MO) e cinco espessuras (0,3 mm; 0,7 mm; 1,2 mm; 1,7 mm; 2,0 mm) foram previamente confeccionadas por Queiroz [106, 140]. Para a análise do grau de conversão, amostras dos cimentos resinosos Multilink N e Variolink Esthetic LC Neutral (ambos de Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) foram fotoativadas sob essas cerâmicas. Para isso, o cimento resinoso foi inserido em uma matriz de silicone com profundidade de 0,1 mm. Após o preenchimento completo da matriz, uma tira de poliéster seguida de uma cerâmica foi posicionada sobre o cimento resinoso. A seguir, este foi fotoativado sob a cerâmica durante 40 s utilizando o fotopolimerizador LED polywave Valo® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) em modo de potência *Standard* (irradiância de 1000 mW/cm<sup>2</sup>). Por fim, a amostra foi removida da matriz e armazenada no escuro por 24 horas. Nove amostras – de cada cimento resinoso – foram preparadas para cada opacidade e espessura da cerâmica [106, 140]. Novamente, com o intuito de auxiliar na compreensão das divisões dos grupos experimentais, um fluxograma desta parte é mostrado na Figura 22.

As medidas dessas amostras foram efetuadas utilizando o microscópio Raman confocal (Senterra, Bruker), equipado com um laser de excitação em 532 nm e uma lente objetiva com magnitude de 20x. Foi utilizada a potência nominal de 20 mW e a abertura confocal na forma de fenda retangular de 50x1000  $\mu\text{m}$ . Os espectros foram adquiridos no intervalo espectral de 1740 a 290  $\text{cm}^{-1}$  e com resolução espectral de 3-5  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada amostra foram selecionados três pontos de medida na face irradiada, sendo o espectro de cada ponto o resultado de 20 varreduras com tempo de integração de 3 s.



**Figura 22.** Fluxograma do estudo. Adaptado da referência [140].

Em ambas as partes deste estudo, foram realizadas medidas de cada cimento resinoso não fotoativado para a avaliação do grau de conversão. Além disso, todos os espectros foram submetidos à correção de linha de base e normalização.

Os dados do grau de conversão foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Resultados e discussão

O estudo da polimerização de um material dentário com técnicas vibracionais baseia-se no monitoramento da intensidade de uma banda referente as vibrações de duplas ligações carbônicas, isso porque estas ligações são convertidas em ligações simples de carbono para formar o polímero. Normalmente na região do infravermelho médio, utiliza-se a banda em torno de  $1638\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída a vibração de estiramento das ligações C=C alifáticas [142, 143].

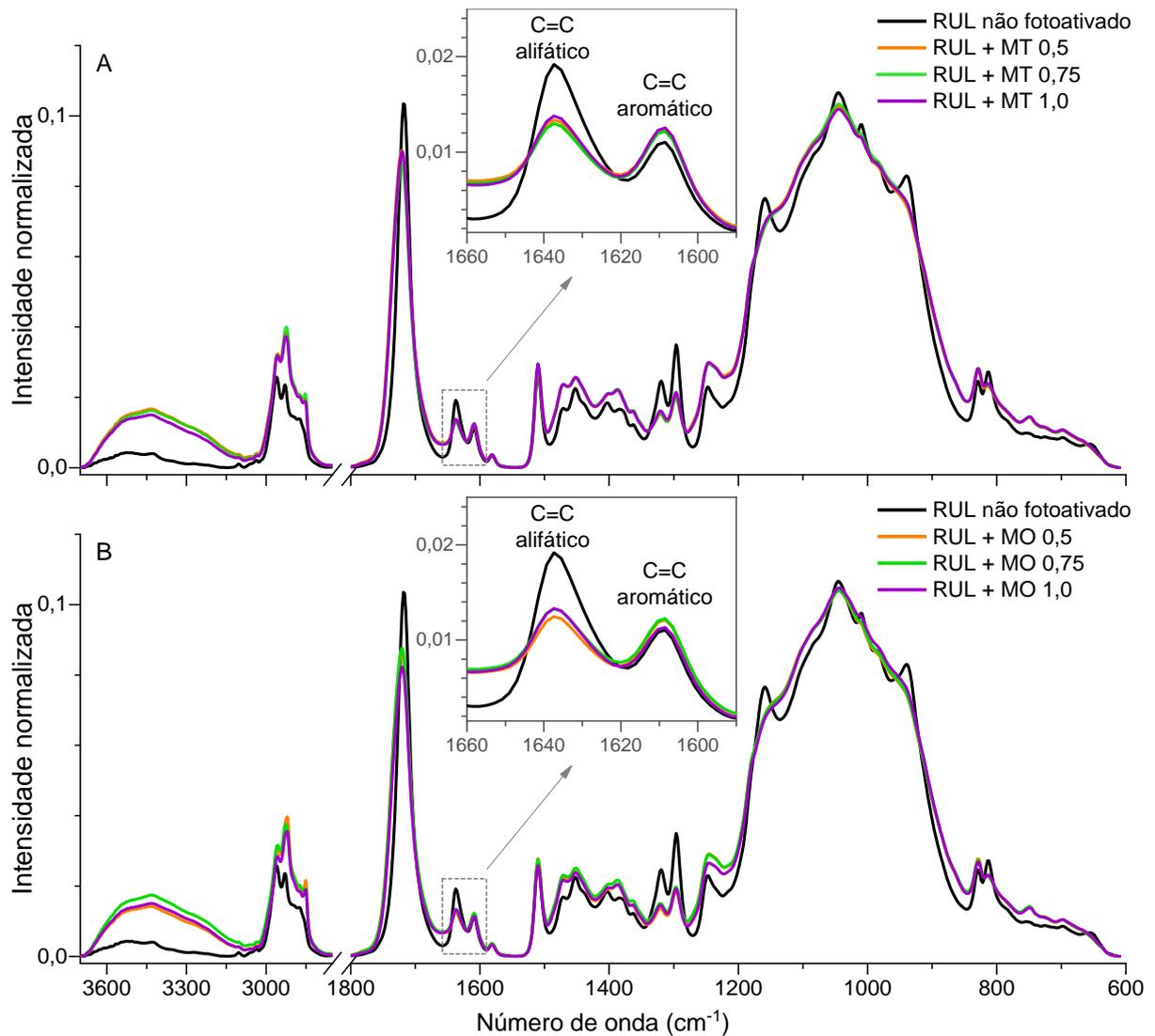
A análise é realizada de forma comparativa, isto é, considera-se a intensidade das ligações C=C alifáticas restantes no material polimerizado em relação à intensidade dessas ligações no material não polimerizado. Além disso, geralmente utiliza-se uma banda estável, isto é, uma banda que não participa diretamente da reação de polimerização e por isso sua intensidade não se altera no processo de polimerização, como padrão interno de normalização. Nessa região espectral, a banda em torno de  $1608\text{ cm}^{-1}$  é uma das principais utilizadas para essa finalidade. Essa banda é atribuída as vibrações de estiramento de ligações C=C de anéis aromáticos. Na ausência de estruturas aromáticas, a banda em torno de  $1715\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$  atribuída as vibrações de estiramento de ligações C=O, pode ser utilizada como padrão interno. Contudo, independentemente do padrão interno usado, é importante observar se ele realmente permanece estável durante a polimerização, pois há casos em que a banda do padrão interno pode apresentar variação de intensidade [142, 143].

O grau de conversão é matematicamente definido como [137]:

$$GC(\%) = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{R_{\text{polimerizado}}}{R_{\text{não polimerizado}}} \right) \right] \quad (4)$$

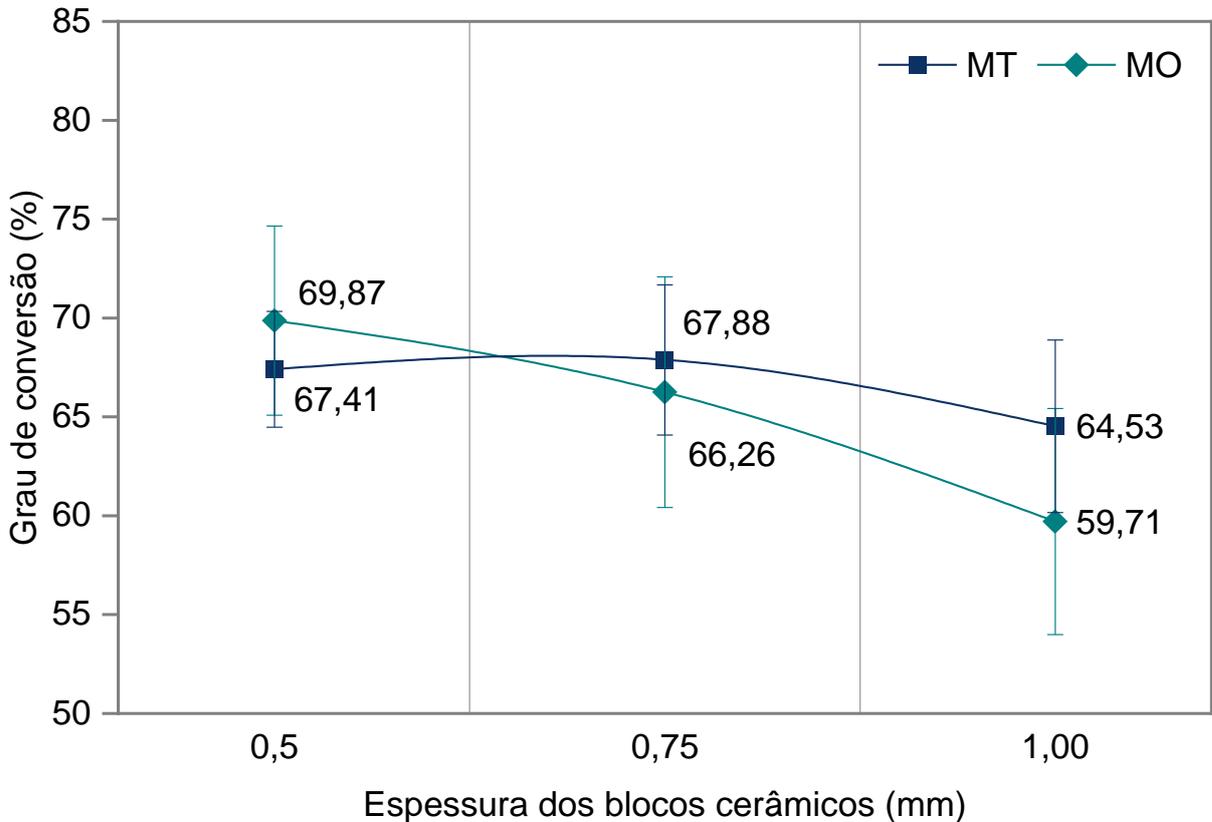
Em que R é a razão entre as bandas em  $1638$  e  $1608\text{ cm}^{-1}$ , referentes as vibrações das ligações C=C alifática e C=C aromática, respectivamente.

Os espectros de FTIR-ATR das amostras de cimento resinoso RelyX Ultimate antes e após sua fotoativação através das cerâmicas de zircônia MT e MO com espessuras de 0,5, 0,75 e 1,0 mm estão apresentados na Figura 23, além disso, nessa figura também há uma ampliação da região de interesse para a análise do grau de conversão. Por meio da ampliação observa-se claramente a redução de intensidade da banda em  $1637\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das amostras fotoativadas, o que evidencia o efeito da polimerização.



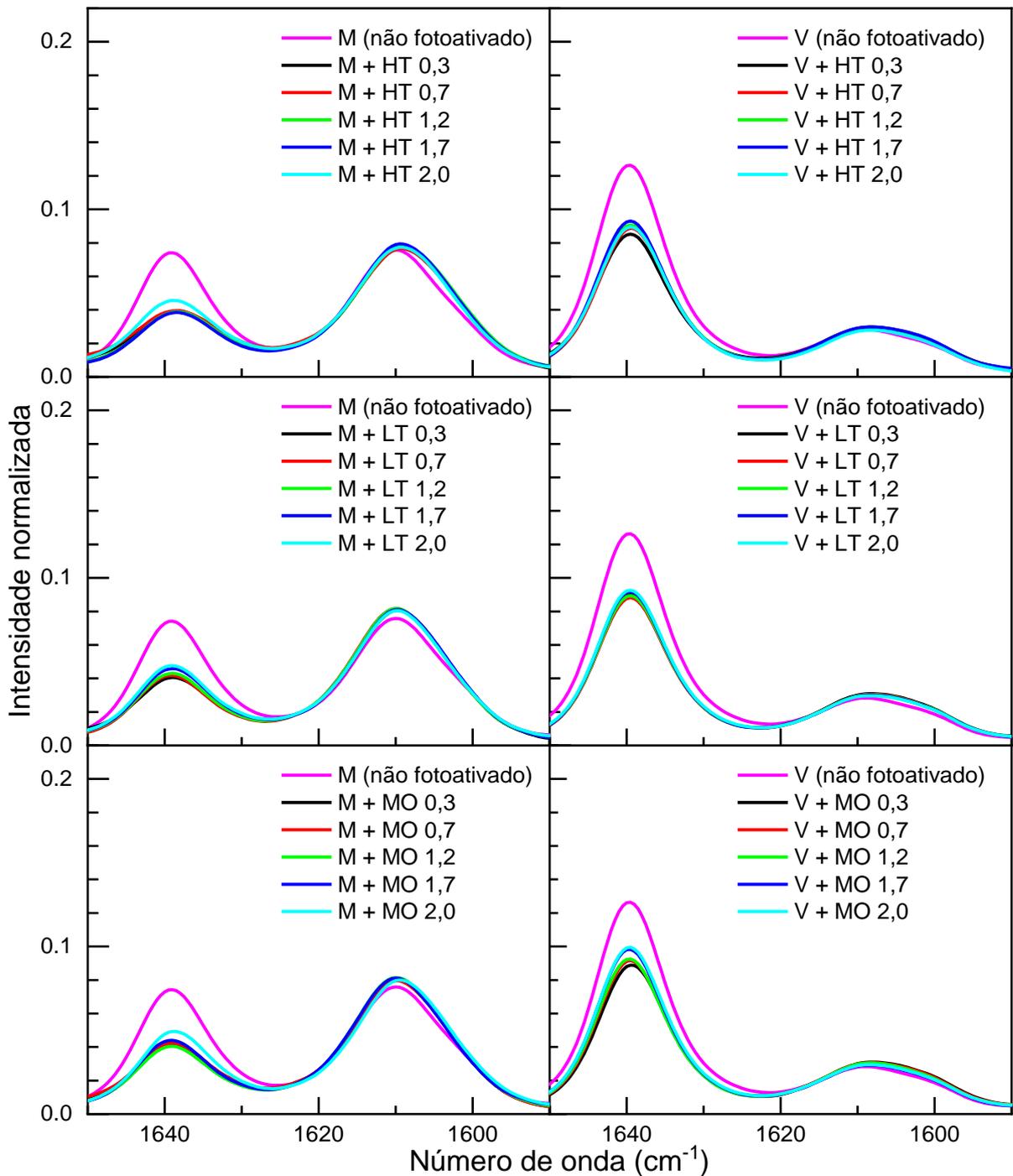
**Figura 23.** Espectros obtidos por FTIR-ATR das amostras de cimento resinoso RelyX Ultimate (RUL) antes e após fotoativação sob as cerâmicas de zircônia (A) MT e (B) MO com diferentes espessuras. A ampliação evidencia os picos em  $1637\text{ cm}^{-1}$  (C=C alifático) e  $1608\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromático).

Para calcular o grau de conversão dessas amostras foi feita a integração da área sob as bandas em  $1637$  e  $1608\text{ cm}^{-1}$ . Os resultados mostraram valores de grau de conversão variando entre aproximadamente 60 e 70%, conforme apresentado na Figura 24. As amostras de cimento resinoso fotoativadas sob a cerâmica de zircônia MO mostraram uma tendência decrescente nos valores do grau de conversão à medida que a espessura da cerâmica aumentou, sendo estatisticamente menor o grau de conversão da espessura de 1 mm com relação as demais espessuras. Já para a cerâmica de zircônia MT, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores grau de conversão das três espessuras. Na comparação entre as cerâmicas, em uma mesma espessura, também não houve diferença significativa entre os valores do grau de conversão.



**Figura 24.** Grau de conversão de amostras de cimento resinoso RelyX Ultimate em função das espessuras das cerâmicas de zircônia MT e MO. Cada ponto representa a média  $\pm$  D.P.M de 10 amostras por grupo.

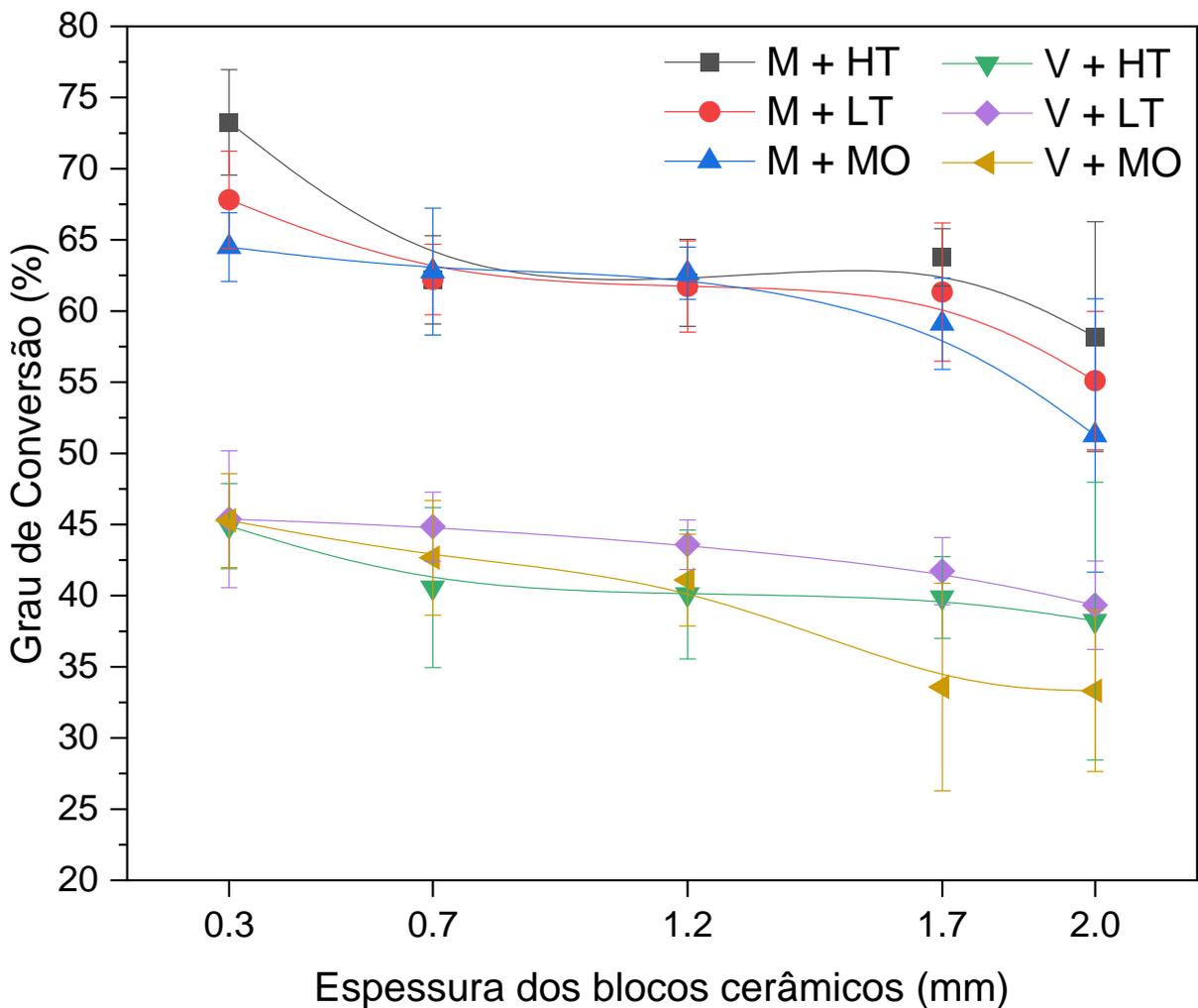
Em relação à outra parte do estudo, a Figura 25 mostra os espectros obtidos por meio da RS para as amostras dos cimentos resinosos Multilink N e Variolink Esthetic LC antes e após fotoativação sob as cerâmicas de dissilicato de lítio com diferentes níveis de translucidez (HT; LT; MO) e espessuras (0,3 mm; 0,7 mm; 1,2 mm; 1,7 mm; 2,0 mm), no intervalo espectral de interesse, 1650 – 1590  $\text{cm}^{-1}$ . Como se pode observar a intensidade da banda em 1639  $\text{cm}^{-1}$  diminuiu após a fotoativação do cimento resinoso nas diferentes condições analisadas, o que indica a sua polimerização.



**Figura 25.** Espectros Raman das amostras dos cimentos resinosos Multilink N (M) e Variolink Esthetic LC (V) evidenciando os picos em  $1638\text{ cm}^{-1}$  (C=C alifático) e  $1609\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromático), antes e após a fotoativação sob as cerâmicas de dissilicato de lítio HT, LT e MO com diferentes espessuras [140].

O grau de conversão dessas amostras foi calculado utilizando a área das bandas em  $1638$  e  $1609\text{ cm}^{-1}$  obtida por meio de integração numérica. A Figura 26 mostra o comportamento do grau de conversão dos cimentos resinosos em função das espessuras das cerâmicas de dissilicato de lítio HT, LT e MO. Nota-se que – independentemente da

condição avaliada – Multilink N apresentou grau de conversão significativamente maior que Variolink Esthetic LC. Observa-se também que as curvas tem uma tendência decrescente, na qual as cerâmicas mais finas apresentam maiores valores de grau de conversão em comparação com as cerâmicas mais espessas. Além disso, comparando entre as cerâmicas, tem-se que as principais diferenças no grau de conversão são para o cimento resinoso Multilink N fotoativado sob as espessuras de 0,3 e 2,0 mm, o qual apresenta maiores valores para a cerâmica HT em relação à LT e MO, e para o cimento resinoso Variolink Esthetic LC fotoativado sob as cerâmicas com espessuras de 1,7 e 2,0 mm, o qual mostra maiores valores de grau de conversão para a cerâmica HT e LT em relação à MO. Detalhes sobre a análise estatística do grau de conversão podem ser encontrados em [106].



**Figura 26.** Grau de conversão dos cimentos resinosos Multilink N (M) e Variolink Esthetic LC (V) em função das espessuras das cerâmicas de dissilicato de lítio (HT, LT e MO). Cada ponto representa a média  $\pm$  D.P.M de 9 amostras por grupo.

Embora na literatura seja relatado que a espessura, a opacidade e a estrutura da cerâmica interferem na quantidade de luz que passa através deste material [134, 144, 145], ainda falta um consenso sobre o quanto isso pode influenciar nas características do cimento resinoso [106]. Em relação ao grau de conversão, os resultados dos estudos são contraditórios. Tem-se casos em que o aumento da espessura da cerâmica resulta na redução do grau de conversão, enquanto outros, indicam não haver impacto significativo da espessura nesse parâmetro. Além disso, alguns estudos indicam maiores valores de grau de conversão para cimentos fotopolimerizáveis, enquanto outros, para os cimentos de dupla polimerização. Essa divergência de resultados surge em razão da grande variação dos parâmetros de teste e dos materiais usados nas pesquisas [130, 145, 146].

De forma geral, no presente estudo, os resultados mostraram uma redução significativa no grau de conversão do cimento resinoso quando fotoativado sob cerâmicas mais espessas e opacas. Esta redução provavelmente se deve a possível atenuação da luz transmitida através da estrutura dessas cerâmicas [106].

Os resultados encontrados estão de acordo com estudos científicos anteriores. Sulaiman e colaboradores [147] investigaram o grau de conversão de cimentos resinosos de dupla polimerização fotoativados sob cerâmicas monolíticas de zircônia de diferentes marcas e com diferentes espessuras (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mm). Os autores detectaram uma redução significativa no grau de conversão com o aumento da espessura da cerâmica. Resultados semelhantes foram relatados por Oh e colaboradores [145] ao utilizar um cimento resinoso fotopolimerizável e cerâmicas de dissilicato de lítio de alta e baixa translucidez (HT e LT) com diferentes espessuras (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mm). Além disso, ao comparar a translucidez, esses autores também relataram que essas cerâmicas não promoveram diferenças significativas nos valores do grau de conversão do cimento resinoso, corroborando os resultados do presente estudo, pois, para Variolink Esthetic LC (cimento do tipo fotopolimerizável), não se observou diferenças significativas no grau de conversão quando utilizadas as cerâmicas HT e LT. Em um estudo realizado por De Jesus e colaboradores [148] utilizando cerâmicas de dissilicato de lítio com espessura de 1,5 mm e três níveis de translucidez (HT, LT e MO), também não foi observada influência significativa da translucidez das cerâmicas no grau de conversão dos cimentos resinosos avaliados. Tal resultado foi atribuído a espessura reduzida da cerâmica, o que em parte corrobora os resultados do presente estudo, onde se nota que para as cerâmicas com

espessuras inferiores a 1,2 mm, a translucidez do material não afetou significativamente a maioria dos valores do grau de conversão dos cimentos resinosos.

Ao comparar entre os cimentos, Variolink Esthetic LC apresentou menores valores de grau de conversão. Em relação a esse fato, pode-se considerar dois pontos relevantes. Em primeiro lugar o tipo do cimento, os cimentos Multilink N e RelyX Ultimate são do tipo dual-polimerizável, enquanto Variolink Esthetic LC é do tipo fotopolimerizável. Estudos anteriores usando cerâmicas de dissilicato de lítio [148, 149] também relataram maior grau de conversão para os cimentos resinosos duais quando comparado aqueles que são somente fotoativados. Segundo De Souza e colaboradores [131] quando a quantidade de luz que chega até o cimento é significativamente comprometida, o ativador químico dos cimentos duais promove um melhor grau de conversão. No entanto, essa ativação química adicional pode não ser suficiente para compensar a atenuação da luz, percebe-se nos resultados do presente estudo que o componente autopolimerizável dos cimentos de dupla polimerização não conseguiu garantir a polimerização máxima do cimento quando utilizadas cerâmicas que tendem a apresentar menor passagem de luz (mais espessas e opacas). O segundo ponto a se considerar é a composição do cimento, pesquisas científicas já relataram que a quantidade de sistema fotoiniciador, o tipo de monômero e a concentração de preenchimento inorgânico são fatores que afetam o grau de conversão, e, portanto, diferenças na composição dos cimentos pode ser uma possível explicação para o comportamento observado [130, 142].

Em conclusão, no presente estudo determinadas espessuras e níveis de translucidez dos materiais cerâmicos afetaram negativamente o grau de conversão dos cimentos resinosos, além disso, os cimentos duais apresentaram uma melhor polimerização. Portanto, é fundamental para o profissional odontológico conhecer as diferenças, vantagens e desvantagens dos materiais a sua disposição, a fim de fazer a escolha adequada para cada situação clínica. Nota-se, portanto, que os estudos com as técnicas no infravermelho foram determinantes para se avaliar as modificações ocorridas na estrutura destes cimentos resinosos.

# Capítulo 4

## Conclusão

A presente tese demonstrou que as técnicas biofototérmicas e espectroscópicas convencionais podem ser aplicadas no estudo da difusão de formulações farmacêuticas de uso tópico elaboradas visando estabelecer novas abordagens terapêuticas para a onicomicose e também na análise de fatores que podem influenciar o desempenho de materiais dentários usados em restaurações cerâmicas.

Na primeira etapa, as análises de Espectroscopia Fotoacústica, realizadas em diferentes regiões do espectro eletromagnético, reforçaram o potencial dessa técnica na caracterização e na determinação de difusão de formulações tópicas. Os resultados indicaram a permeação de: formulações de esmaltes contendo nanopartículas de prata biogênicas e óleos essenciais de orégano e de alecrim em unhas saudáveis; nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato glicólico de própolis em unhas saudáveis; solução de hipericina em unhas saudáveis das mãos e dos pés e também em unhas dos pés com onicomicose causada por *Fusarium solani* e *Trichophyton rubrum*. Para este último estudo, também foram mostradas, por FTIR-ATR, alterações espectrais relacionadas a lipídios, proteínas e carboidratos, resultantes da interação entre os fungos e a unha.

A segunda etapa foi composta por dois estudos. No primeiro, por RS constatou-se que dos dois tratamentos de superfície realizados em cerâmicas de zircônia dos tipos 3Y, STML e UTML apenas o plasma de argônio não térmico não provocou mudança da fase tetragonal para monoclínica e nem tensão residual de superfície. Além disso, dentre as amostras em que a transformação de fase foi detectada, a zircônia 3Y JAT apresentou o maior percentual de fase monoclínica. De forma complementar, os resultados desse estudo também indicaram que a RS detectou a presença da fase cúbica nas amostras, sendo a presença desta mais evidente na cerâmica UTML. No segundo estudo, por FTIR-ATR e RS verificou-se que a espessura e a opacidade do material cerâmico influenciaram o grau de conversão do cimento resinoso, com os menores valores desse parâmetro sendo encontrado para as cerâmicas mais espessas e opacas, adicionalmente, também se obteve maiores valores de grau de conversão para os cimentos duais em comparação ao cimento

fotoativado.

Finalmente, nessa tese foram exploradas algumas das possibilidades de aplicações das técnicas biofototérmicas e espectroscópicas e, em paralelo, fornecidas informações de grande relevância para os campos farmacêutico e odontológico. Destacando, mais uma vez, a importância dessas técnicas em direção a um futuro próximo de efetiva aplicação em diagnóstico clínico.

# Apêndice A

## Artigos Publicados

Ao longo deste doutorado foram publicados os artigos listados abaixo, alguns deles não foram incluídos na tese.

1. C. B. Galinari, P. C. V. Conrado, G. S. Arita, V. A. B Mosca, R. C. Melo, T. de P. Bianchi, D. R. Faria, K. M. Sakita, L. C. Malacarne, R. S. Gonçalves, P. C. de S. Pereira, G. B. Cesar, W. Caetano, M. de Souza, R. da S. Palácios, M. L. Baesso, T. I. E. Svidzinski, É. S. K. Cotica, P. de S. Bonfim-Mendonça, “Nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy for the treatment of dermatophytosis,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 215, 2021.
2. F. M. Tsuzuki, R. C. Pascotto, L. C. Malacarne, A. C. Bento, A. Medina Neto, L. V. de Castro-Hoshino, M. Souza, J. W. Nicholson, and M. L. Baesso, “Studies of the early stages of the dynamic setting process of chemically activated restorative glass-ionomer cements,” *Biomaterial Investigations in Dentistry*, vol. 8, no. 1, pp. 39–47, 2021.
3. L. Z. Fogaça, J. C. Marinozi Vicentini, C. Fabiano de Freitas, M. de Souza, M. L. Baesso, W. Caetano, V. R. Batistela, and M. H. N. Olsen Scaliante, “Reduced graphene oxide impregnated in TiO<sub>2</sub> for photodegradation of dyes monitored in UV-LED mini-reactor,” *Materials Chemistry and Physics*, vol. 272, 2021.
4. C. M. Ribeiro, M. Souza, B. L. Pelegrini, R. S. Palacios, S. M. Lima, F. Sato, A. C. Bento, M. L. Baesso, and M. M. S. Lima, “Ex vivo UV-vis and FTIR photoacoustic spectroscopy of natural nanoemulsions from cellulose nanocrystals and saponins topically applied into the skin: Diffusion rates and physicochemical evaluation,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 236, 2022.
5. I. L. E. Barros, F. F. Veiga, L. V. de Castro-Hoshino, M. Souza, A. M. Malacrida, B. V. Diniz, R. S. dos Santos, M. L. Bruschi, M. L. Baesso, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, “Performance of Two Extracts Derived from Propolis on Mature Biofilm Produced by *Candida albicans*,” *Antibiotics*, vol. 12, 2023
6. P. C. V. Conrado, A. A. Vaine, G. S. Arita, K. M. Sakita, R. S. Gonçalves, W. Caetano, M. de Souza, M. L. Baesso, L. C. Malacarne, E. Razzolini, V. A. Vicente, E. S. Kioshima, and P.

de S. B. de Mendonça, "Promising onychomycosis treatment with hypericin-mediated photodynamic therapy: case reports," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 42, 2023.

7. M. E. Queiroz, A. T. Maluly-Proni, M. S. C. Tsutsumi, E. Dallazen, L. V. de Castro-Hoshino, M. de Souza, M. L. Baesso, and P. H. dos Santos, "Influence of thickness and degree of opacity of lithium disilicate on the degree of conversion and bond strength of resin cements," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 143, 2023.
8. L. Z. Fogaça, J. C. M. Vicentini, C. F. de Freitas, T. L. Braga, F. A. da Silva, M. de Souza, M. L. Baesso, W. Caetano, V. R. Batistela, and M. H. N. O. Scaliante, "Nanocomposites of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and ZnO with reduced graphene oxide for heterogeneous photocatalysis of dyes," *Catalysis Communications*, vol. 185, 2023.

## Referências Bibliográficas

- [1] P. Bouzy, I. D. Lyburn, S. E. Pinder, R. Scott, J. Mansfield, J. Moger, C. Greenwood, I. Bouybayoune, E. Cornford, K. Rogers, and N. Stone, "Exploration of utility of combined optical photothermal infrared and Raman imaging for investigating the chemical composition of microcalcifications in breast cancer," *Analytical Methods*, vol. 15, no. 13, pp. 1620–1630, 2023.
- [2] E. Brozgol, P. Kumar, D. Necula, I. Bronshtein-Berger, M. Lindner, S. Medalion, L. Twito, Y. Shapira, H. Gondra, I. Barshack, and Y. Garini, "Cancer detection from stained biopsies using high-speed spectral imaging," *Biomedical Optics Express*, vol. 13, no. 4, 2022.
- [3] C. Li, D. Zhang, M. N. Slipchenko, and J. X. Cheng, "Mid-Infrared Photothermal Imaging of Active Pharmaceutical Ingredients at Submicrometer Spatial Resolution," *Analytical Chemistry*, vol. 89, pp. 4863–4867, 2017.
- [4] M. J. Baker, H. J. Byrne, J. Chalmers, P. Gardner, R. Goodacre, A. Henderson, S. G. Kazarian, F. L. Martin, J. Moger, N. Stone, and J. Sulé-Suso, "Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: State of play and future challenges," *Analyst*, vol. 143, pp. 1735–1757, 2018.
- [5] F. F. Veiga, M. C. Gadelha, M. R. T. da Silva, M. I. Costa, B. Kischkel, L. V. de Castro-Hoshino, F. Sato, M. L. Baesso, M. F. Voidaleski, V. Vasconcellos-Pontello, V. A. Vicente, M. L. Bruschi, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, "Propolis extract for onychomycosis topical treatment: From bench to clinic," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
- [6] P. C. V. Conrado, A. A. Vaine, G. S. Arita, K. M. Sakita, R. S. Gonçalves, W. Caetano, M. de Souza, M. L. Baesso, L. C. Malacarne, E. Razzolini, V. A. Vicente, E. S. Kioshima, and P. de S. B. de Mendonça, "Promising onychomycosis treatment with hypericin-mediated photodynamic therapy: case reports," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 42, 2023.
- [7] C. B. Galinari, P. C. V. Conrado, G. S. Arita, et al., "Nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy for the treatment of dermatophytosis," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 215, 2021.
- [8] A. C. Bento, D. T. Dias, L. Olenka, A. N. Medina, and M. L. Baesso, "On the application of the photoacoustic methods for the determination of thermo-optical properties of polymers," *Brazilian Journal of Physics*, vol. 32, no. 2B, pp. 483–494, 2002.

- [9] C. M. Ribeiro, M. Souza, B. L. Pelegrini, R. S. Palacios, S. M. Lima, F. Sato, A. C. Bento, M. L. Baesso, and M. M. S. Lima, "Ex vivo UV-vis and FTIR photoacoustic spectroscopy of natural nanoemulsions from cellulose nanocrystals and saponins topically applied into the skin: Diffusion rates and physicochemical evaluation," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 236, 2022.
- [10] C. Kendall, M. Isabelle, F. Bazant-Hegemark, J. Hutchings, L. Orr, J. Babrah, R. Baker, and N. Stone, "Vibrational spectroscopy: A clinical tool for cancer diagnostics," *Analyst*, vol. 134, pp. 1029–1045, 2009.
- [11] P. Larkin, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2011.
- [12] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2004.
- [13] O. Sala, *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. Editora Unesp, 2 ed., 2008.
- [14] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2005.
- [15] M. G. Sowa, J. Wang, C. P. Schultz, M. K. Ahmed, and H. H. Mantsch, "Infrared spectroscopic investigation of in vivo and ex vivo human nails," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 10, pp. 49–56, 1995.
- [16] E. Sehn, K. C. Silva, V. S. Retuci, A. N. Medina, A. C. Bento, M. L. Baesso, A. Storck, and J. L. Gesztes, "Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment," *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 1, pp. 758–760, 2003.
- [17] V. Balan, C. T. Mihai, F. D. Cojocaru, C. M. Uritu, G. Dodi, D. Botezat, and I. Gardikiotis, "Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice," *Materials*, vol. 12, 2019.
- [18] S. Baswan, G. B. Kasting, S. K. Li, R. Wickett, B. Adams, S. Eurich, and R. Schamper, "Understanding the formidable nail barrier: a review of the nail microstructure, composition and diseases," *Mycoses*, vol. 60, no. 5, pp. 284–295, 2017.
- [19] H. A. E. Benson, M. S. Roberts, V. R. Leite-Silva, and K. A. Walters, *Cosmetic formulation: principles and practice*, CRC Press, 2019.
- [20] R. Baran and R. Nakamura, *Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento*, Elsevier, 2011.

- [21] D. De Berker, B. S. Ruben, and R. Baran, "Science of the nail apparatus," in *Baran & Dawber's diseases of the nails and their management*, pp. 1–58, 2019.
- [22] D. De Berker, "Nail anatomy," *Clinics in Dermatology*, vol. 31, no. 5, pp. 509–515, 2013.
- [23] A. K. Gupta, S. Polla Ravi, S. Y. Choi, A. Konda, and E. A. Cooper, "Strategies for the enhancement of nail plate permeation of drugs to treat onychomycosis," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 37, no. 2, pp. 243–255, 2023.
- [24] J. Lipoff, *Dermatology simplified: outlines and mnemonics*. 2016.
- [25] D. K. Lee and S. R. Lipner, "Optimal diagnosis and management of common nail disorders," *Annals of Medicine*, vol. 54, no. 1, pp. 694–712, 2022.
- [26] A. K. Gupta, S. G. Versteeg, and N. H. Shear, "Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment," *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, vol. 21, no. 6, pp. 525–539, 2017.
- [27] B. Sigurgeirsson and R. Baran, "The prevalence of onychomycosis in the global population – A literature study," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 28, no. 11, pp. 1480–1491, 2014.
- [28] A. K. Gupta, N. Stec, R. C. Summerbell, N. H. Shear, V. Piguet, A. Tosti, and B. M. Piraccini, "Onychomycosis: a review," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 34, no. 9, pp. 1972–1990, 2020.
- [29] P. de S. Costa, V. Mendes, F. F. Veiga, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, "Relevant insights into onychomycosis' pathogenesis related to the effectiveness topical treatment," *Microbial Pathogenesis*, vol. 169, 2022.
- [30] A. Tosti, T. C. Vlahovic, and R. Arenas, *Onychomycosis: an illustrated guide to diagnosis and treatment*. 2017.
- [31] B. M. Piraccini and A. Alessandrini, "Onychomycosis: A review," *Journal of Fungi*, vol. 1, no. 1, pp. 30–43, 2015.
- [32] F. F. Veiga, L. V. De Castro-Hoshino, F. Sato, A. Bombassaro, V. A. Vicente, V. Mendes, M. L. Baesso, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, "Fusarium oxysporum is an onychomycosis etiopathogenic agent," *Future Microbiology*, vol. 13, no. 16, pp. 1745–1756, 2018.
- [33] J. Galletti, M. Negri, F. L. Grassi, S. Kioshima-Cotica, and T. I. E. Svidzinski, "Fusarium spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients,"

*European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 34, no. 9, pp. 1767–1772, 2015.

- [34] C. R. Stewart, L. Algu, R. Kamran, C. F. Leveille, K. Abid, C. Rae, and S. R. Lipner, “Effect of onychomycosis and treatment on patient-reported quality-of-life outcomes: A systematic review,” *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 85, no. 5, pp. 1227–1239, 2021.
- [35] J. M. Falotico and S. R. Lipner, “Updated perspectives on the diagnosis and management of onychomycosis,” *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, vol. 15, pp. 1933–1957, 2022.
- [36] N. R. de Oliveira, “*Desenvolvimento de formulação de esmalte contendo princípios ativos naturais como alternativa no tratamento da onicomiose.*” Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2020.
- [37] A. P. da Silva, “*Novas estratégias para o diagnóstico de onicomiose e tratamento por terapia fotodinâmica.*” Tese de Doutorado, Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2017.
- [38] R. Aggarwal, M. Targhotra, B. Kumar, P. K. Sahoo, and M. K. Chauhan, “Treatment and management strategies of onychomycosis,” *Journal de Mycologie Medicale*, vol. 30, no. 2, 2020.
- [39] A. K. Gupta, M. Paquet, and F. C. Simpson, “Therapies for the treatment of onychomycosis,” *Clinics in Dermatology*, vol. 31, no. 5, pp. 544–554, 2013.
- [40] A. K. Bhatta, U. Keyal, X. Wang, and E. Gellén, “A review of the mechanism of action of lasers and photodynamic therapy for onychomycosis,” *Lasers in Medical Science*, vol. 32, no. 2, pp. 469–474, 2017.
- [41] R. K. Dhamoon, H. Popli, and M. Gupta, “Novel drug delivery strategies for the treatment of onychomycosis,” *Pharmaceutical Nanotechnology*, vol. 7, no. 1, pp. 24–38, 2019.
- [42] A. K. Gupta, M. Venkataraman, H. J. Renaud, R. Summerbell, N. H. Shear, and V. Piguet, “A Paradigm shift in the treatment and management of onychomycosis,” *Skin Appendage Disorders*, vol. 7, no. 5, pp. 351–358, 2021.
- [43] W. H. Abd-Elsalam and S. M. Abouelatta, “Contemporary techniques and potential transungual drug delivery nanosystems for the treatment of onychomycosis,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 24, no. 6, p. 150, 2023.

- [44] P. D. Marcato, M. Durán, S. Huber, M. Rai, P. S. Melo, O. L. Alves, and N. Durán, "Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug," *Journal of Nano Research*, vol. 20, pp. 99–107, 2012.
- [45] J. K. Christenson, G. M. Peterson, M. Naunton, M. Bushell, S. Kosari, K. E. Baby, and J. Thomas, "Challenges and opportunities in the management of onychomycosis," *Journal of Fungi*, vol. 4, 2018.
- [46] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils - A review," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 2, pp. 446–475, 2008.
- [47] F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, and V. De Feo, "Essential oils and antifungal activity," *Pharmaceuticals*, vol. 10, 2017.
- [48] H. Falleh, M. Ben Jemaa, M. Saada, and R. Ksouri, "Essential oils: A promising eco-friendly food preservative," *Food Chemistry*, vol. 330, 2020.
- [49] S. Burt, "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, pp. 223–253, 2004.
- [50] M. Knez Hrnčič, D. Cör, J. Simonovska, Ž. Knez, Z. Kavrakovski, and V. Rafajlovska, "Extraction techniques and analytical methods for characterization of active compounds in origanum species," *Molecules*, vol. 25, no. 20, 2020.
- [51] E. Aziz, R. Batool, W. Akhtar, et al., "Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications," *South African Journal of Botany*, vol. 151, pp. 3–18, 2022.
- [52] S. Ahmad, S. Munir, N. Zeb, A. Ullah, B. Khan, J. Ali, M. Bilal, M. Omer, M. Alamzeb, S. M. Salman, and S. Ali, "Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles — An ecofriendly approach," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, pp. 5087–5107, 2019.
- [53] S. S. Salem and A. Fouda, "Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: An Overview," *Biological Trace Element Research*, vol. 199, pp. 344–370, 2021.
- [54] J. Mussin and G. Giusiano, "Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents," *Frontiers in Chemistry*, vol. 10, 2022.
- [55] F. Q. Ames, F. Sato, L. V. de Castro, L. L. M. de Arruda, B. A. da Rocha, R. K. N. Cuman, M. L. Baesso, and C. A. Bersani-Amado, "Evidence of anti-inflammatory effect and percutaneous penetration of a topically applied fish oil preparation: a photoacoustic spectroscopy study," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 5, 2017.

- [56] D. T. Dias, A. Steimacher, A. C. Bento, A. M. Neto, and M. L. Baesso, "Thermal characterization in vitro of human nail: Photoacoustic study of the aging process," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 83, no. 5, pp. 1144–1148, 2007.
- [57] S. Murdan, "Enhancing the nail permeability of topically applied drugs," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 5, no. 11, pp. 1267–1282, 2008.
- [58] D. Miron, R. Cornelio, J. Troleis, J. Mariath, A. R. Zimmer, P. Mayorga, and E. E. S. Schapoval, "Influence of penetration enhancers and molecular weight in antifungals permeation through bovine hoof membranes and prediction of efficacy in human nails," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 51, pp. 20–25, 2014.
- [59] F. C. Flores, R. C. R. Beck, and C. de B. da Silva, "Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review," *Mycopathologia*, vol. 181, pp. 9–15, 2016.
- [60] A. A. Mohamed and B. M. Alotaibi, "Essential oils of some medicinal plants and their biological activities: a mini review," *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, vol. 9, pp. 40–49, 2023.
- [61] M. Sienkiewicz, M. Łysakowska, M. Pastuszka, W. Bienias, and E. Kowalczyk, "The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents," *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9334–9351, 2013.
- [62] H. N. Shivakumar, A. Juluri, B. G. Desai, and S. N. Murthy, "Ungual and Transungual drug delivery," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 38, no. 8, pp. 901–911, 2012.
- [63] S. Murdan, G. Milcovich, and G. S. Goriparthi, "An assessment of the human nail plate pH," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 24, pp. 175–181, 2011.
- [64] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, pp. 908–931, 2019.
- [65] N. Baig, I. Kammakam, and W. Falath, "Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges," *Materials Advances*, vol. 2, no. 6, pp. 1821–1871, 2021.
- [66] S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, and S. Ikram, "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise," *Journal of Advanced Research*, vol. 7, pp. 17–28, 2016.
- [67] X.-F. Zhang, Z.-G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, "Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 9, 2016.

- [68] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, and M. M. Q. Xing, "Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, pp. 2399–2407, 2014.
- [69] A. C. Burduşel, O. Gherasim, A. M. Grumezescu, L. Mogoantă, A. Ficai, and E. Andronescu, "Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview," *Nanomaterials*, vol. 8, 2018.
- [70] N. S. R. Rosman, N. A. Harun, I. Idris, and W. I. Wan Ismail, "Nanobiotechnology: nature-inspired silver nanoparticles towards green synthesis," *Energy and Environment*, vol. 32, no. 7, pp. 1183–1206, 2021.
- [71] A. Ahmed, M. Usman, Z. Ji, M. Rafiq, B. Yu, Y. Shen, and H. Cong, "Nature-inspired biogenic synthesis of silver nanoparticles for antibacterial applications," *Materials Today Chemistry*, vol. 27, 2023.
- [72] P. Singh and I. Mijakovic, "Green synthesis and antibacterial applications of gold and silver nanoparticles from *Ligustrum vulgare* berries," *Scientific Reports*, vol. 12, 2022.
- [73] M. Ożarowski, T. M. Karpiński, R. Alam, and M. Łochyńska, "Antifungal properties of chemically defined propolis from various geographical regions," *Microorganisms*, vol. 10, 2022.
- [74] S. I. Anjum, A. Ullah, K. A. Khan, M. Attaullah, H. Khan, H. Ali, M. A. Bashir, M. Tahir, M. J. Ansari, H. A. Ghramh, N. Adgaba, and C. K. Dash, "Composition and functional properties of propolis (bee glue): a review," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, pp. 1695–1703, 2019.
- [75] A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, and W. Krol, "Historical aspects of propolis research in modern times," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013.
- [76] R. Cauich-Kumul and M. R. Segura Campos, "Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects," in *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*, pp. 227–243, Elsevier, 2019.
- [77] D. Kasote, V. Bankova, and A. M. Viljoen, "Propolis: chemical diversity and challenges in quality control," *Phytochemistry Reviews*, vol. 21, pp. 1887–1911, 2022.
- [78] A. Salatino, M. L. F. Salatino, and G. Negri, "How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis?," *Apidologie*, vol. 52, pp. 1075–1097, 2021.

- [79] B. Kischkel, P. F. D. De Castilho, K. M. P. De Oliveira, P. S. T. Rezende, M. L. Bruschi, T. I. E. Svidzinski, M. Negri, and M. Negri, "Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections," *Future Microbiology*, vol. 15, no. 7, pp. 521–539, 2020.
- [80] K. Ramanauskiene, A. M. Inkeniene, V. Petrikaite, and V. Briedis, "Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013.
- [81] F. Galeotti, F. Maccari, A. Fachini, and N. Volpi, "Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products," *Foods*, vol. 7, 2018.
- [82] L. Kubiliene, V. Laugaliene, A. Pavilonis, A. Maruska, D. Majiene, K. Barcauskaite, R. Kubilius, G. Kasparaviciene, and A. Savickas, "Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, 2015.
- [83] B. Tosi, A. Donini, C. Romagnoli, and A. Bruni, "Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents," *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, vol. 10, pp. 335–336, 1996.
- [84] M. Sandrini, "*Estudo de efeitos de nanopartículas de prata sobre as propriedades espectroscópicas de vidros cálcio boroaluminato dopados com európio.*" Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- [85] M. A. Garcia, "Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 44, no. 28, pp. 1–20, 2011.
- [86] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 3974–3983, 2014.
- [87] S. Jain and M. S. Mehata, "Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 15867, 2017.
- [88] V. G. Pol, D. N. Srivastava, O. Palchik, V. Palchik, M. A. Slifkin, A. M. Weiss, and A. Gedanken, "Sonochemical deposition of silver nanoparticles on silica spheres," *Langmuir*, vol. 18, no. 8, pp. 3352–3357, 2002.
- [89] A. Okasha, M. B. Mohamed, S. Negm, and H. Talaat, "Weak exciton-plasmon and exciton-phonon coupling in chemically synthesized Ag/CdSe metal/semiconductor hybrid nanocomposite," *Physica E*, vol. 44, pp. 2094–2098, 2012.

- [90] R. Li Voti, G. Leahu, C. Sibilia, R. Matassa, G. Familiari, S. Cerra, T. A. Salamone, and I. Fratoddi, "Photoacoustics for listening to metal nanoparticle super-aggregates," *Nanoscale Advances*, vol. 3, no. 16, pp. 4692–4701, 2021.
- [91] P. K. Upputuri and M. Pramanik, "Recent advances in photoacoustic contrast agents for in vivo imaging," *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 4, 2020.
- [92] T. A. El-Brolossy, T. Abdallah, M. B. Mohamed, S. Abdallah, K. Easawi, S. Negm, and H. Talaat, "Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique," *The European Physical Journal Special Topics*, vol. 153, pp. 361–364, 2008.
- [93] B. Kischkel, T. E. Kawasaki, P. F. de Castilho, K. M. P. de Oliveira, M. L. Bruschi, L. V. de Castro-Hoshino, M. de Souza, M. L. Baesso, and M. Negri, "Silver nanoparticles combined with propolis is a promising antimicrobial: Cytotoxic, mutagenic, antifungal and antibiofilm activity," *Trabalho em preparação*.
- [94] I. L. E. Barros, F. F. Veiga, L. V. de Castro-Hoshino, M. Souza, A. M. Malacrida, B. V. Diniz, R. S. dos Santos, M. L. Bruschi, M. L. Baesso, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, "Performance of Two Extracts Derived from Propolis on Mature Biofilm Produced by *Candida albicans*," *Antibiotics*, vol. 12, 2023.
- [95] J. J. Shen, G. B. E. Jemec, M. C. Arendrup, and D. M. L. Saunte, "Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 31, 2020.
- [96] A. G. Niculescu and A. M. Grumezescu, "Photodynamic therapy—an up-to-date review," *Applied Sciences*, vol. 11, no. 8, 2021.
- [97] A. K. Bhatta, U. Keyal, and X. L. Wang, "Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 15, pp. 228–235, 2016.
- [98] T. Dai, B. B. Fuchs, J. J. Coleman, R. A. Prates, C. Astrakas, T. G. St. Denis, M. S. Ribeiro, E. Mylonakis, M. R. Hamblin, and G. P. Tegos, "Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform," *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, 2012.
- [99] C. B. Galinari, T. de P. Biachi, R. S. Gonçalves, G. B. Cesar, E. V. Bergmann, L. C. Malacarne, É. S. Kioshima Cotica, P. de S. Bonfim-Mendonça, and T. I. E. Svidzinski, "Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 49, no. 1, pp. 38–56, 2023.

- [100] J. A. Fernandes, P. C. V. Conrado, B. S. Perina, A. C. V. de Oliveira, G. S. Arita, I. R. G. Capoci, R. S. Gonçalves, W. Caetano, T. I. E. Svidzinski, E. S. K. Cotica, and P. de S. Bonfim-Mendonça, "Photodynamic inactivation by hypericin-P123 on azole-resistant isolates of the *Trichophyton rubrum* complex as planktonic cells and biofilm," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 44, 2023.
- [101] N. Nafee, A. Youssef, H. El-Gowelli, H. Asem, and S. Kandil, "Antibiotic-free nanotherapeutics: Hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 454, no. 1, pp. 249–258, 2013.
- [102] F. F. Veiga, L. V. de Castro-Hoshino, F. Sato, M. L. Baesso, S. Silva, M. Negri, and T. I. E. Svidzinski, "Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails," *International Journal of Dermatology*, vol. 61, no. 2, pp. 191–198, 2022.
- [103] S. De Bruyne, R. Speeckaert, J. Boelens, M. P. Hayette, M. Speeckaert, and J. Delanghe, "Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis," *British Journal of Dermatology*, vol. 180, no. 3, pp. 637–646, 2019.
- [104] K. Phan, K. Kaur, K. Wright, S. Tran, B. Stewart, M. Brown, and T. C. Vlahovic, "The penetrance of topical nail therapy: limitations and current enhancements," *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, vol. 38, no. 4, pp. 535–540, 2021.
- [105] A. Bacchi and P. F. Cesar, "Advances in ceramics for dental applications," *Dental Clinics of North America*, vol. 66, no. 4, pp. 591–602, 2022.
- [106] M. E. Queiroz, A. T. Maluly-Proni, M. S. C. Tsutsumi, E. Dallazen, L. V. de Castro-Hoshino, M. de Souza, M. L. Baesso, and P. H. dos Santos, "Influence of thickness and degree of opacity of lithium disilicate on the degree of conversion and bond strength of resin cements," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 143, 2023.
- [107] G. J. Christensen, "The all-ceramic restoration dilemma: where are we?," *The Journal of the American Dental Association*, vol. 142, no. 6, pp. 668–671, 2011.
- [108] F. Zhang, B. Van Meerbeek, and J. Vleugels, "Importance of tetragonal phase in high-translucent partially stabilized zirconia for dental restorations," *Dental Materials*, vol. 36, no. 4, pp. 491–500, 2020.
- [109] I. Denry and J. R. Kelly, "Emerging ceramic-based materials for dentistry," *Journal of Dental Research*, vol. 93, no. 12, pp. 1235–1242, 2014.
- [110] M. F. R. P. Alves, S. Ribeiroa, P. A. Suzuki, K. Strecker, and C. dos Santos, "Effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> addition and sintering temperature on mechanical properties and

- translucence of zirconia dental ceramics with different Y2O3 content," *Materials Research*, vol. 24, no. 2, 2021.
- [111] A. Moshaverinia, "Review of the modern dental ceramic restorative materials for esthetic dentistry in the minimally invasive age," *Dental Clinics of North America*, vol. 64, no. 4, pp. 621–631, 2020.
- [112] S. Ban, "Classification and properties of dental zirconia as implant fixtures and superstructures," *Materials*, vol. 14, no. 17, 2021.
- [113] Y. Zhang and B. R. Lawn, "Novel Zirconia Materials in Dentistry," *Journal of Dental Research*, vol. 97, no. 2, pp. 140–147, 2018.
- [114] I. Denry and J. R. Kelly, "State of the art of zirconia for dental applications," *Dental Materials*, vol. 24, no. 3, pp. 299–307, 2008.
- [115] B. Stawarczyk, C. Keul, M. Eichberger, D. Figge, D. Edelhoff, and N. Lümke, "Three generations of zirconia: From veneered to monolithic. Part I," *Quintessence International*, vol. 48, no. 5, pp. 369–380, 2017.
- [116] W. Huang, H. Qiu, Y. Zhang, L. Nan, L. Gao, J. Chen, M. Omran, and G. Chen, "Preparation of nano zirconia by binary doping: Effect of controlled sintering on structure and phase transformation," *Ceramics International*, vol. 48, no. 17, pp. 25374–25381, 2022.
- [117] W. M. Negreiros, M. A. Cotta, F. A. Rueggeberg, J. J. Bonvent, F. D. Nascimento, and M. Giannini, "Effects of argon plasma and aging on the mechanical properties and phase transformation of 3Y-TZP zirconia," *Brazilian Dental Journal*, vol. 33, no. 5, pp. 100–107, 2022.
- [118] M. Inokoshi, M. Shimizubata, K. Nozaki, T. Takagaki, K. Yoshihara, S. Minakuchi, J. Vleugels, B. Van Meerbeek, and F. Zhang, "Impact of sandblasting on the flexural strength of highly translucent zirconia," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 115, 2021.
- [119] I. L. Aurélio, A. M. E. Marchionatti, A. F. Montagner, L. G. May, and F. Z. M. Soares, "Does air particle abrasion affect the flexural strength and phase transformation of Y-TZP? A systematic review and meta-analysis," *Dental Materials*, vol. 32, no. 6, pp. 827–845, 2016.
- [120] H. K. Kim and B. Ahn, "Effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sandblasting particle size on the surface topography and residual compressive stresses of three different dental zirconia grades," *Materials*, vol. 14, pp. 1–19, 2021.

- [121] M. Inokoshi, H. Shimizu, K. Nozaki, T. Takagaki, K. Yoshihara, N. Nagaoka, F. Zhang, J. Vleugels, B. Van Meerbeek, and S. Minakuchi, "Crystallographic and morphological analysis of sandblasted highly translucent dental zirconia," *Dental Materials*, vol. 34, no. 3, pp. 508–518, 2018.
- [122] J. A. Muñoz Tabares and M. J. Anglada, "Quantitative analysis of monoclinic phase in 3Y-TZP by Raman spectroscopy," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 93, no. 6, pp. 1790–1795, 2010.
- [123] G. Pezzotti and A. A. Porporati, "Raman spectroscopic analysis of phase-transformation and stress patterns in zirconia hip joints," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, no. 2, p. 372, 2004.
- [124] S. K. Nemli, H. Yilmaz, C. Aydin, B. T. Bal, and T. Tıraş, "Effect of fatigue on fracture toughness and phase transformation of Y-TZP ceramics by X-ray diffraction and Raman spectroscopy," *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, vol. 100 B, no. 2, pp. 416–424, 2012.
- [125] C. Wulfman, M. Sadoun, and M. Lamy De La Chapelle, "Interest of Raman spectroscopy for the study of dental material: The zirconia material example," *IRBM*, vol. 31, no. 5–6, pp. 257–262, 2010.
- [126] M. T. Dorn and K. G. Nickel, "Zirconia ceramics: Phase transitions and Raman microspectroscopy." in *High-pressure surface science and engineering*, pp. 467–520, IOP Publishing Ltd, 2004.
- [127] S. M. Čokić, M. Córdor, J. Vleugels, B. Van Meerbeek, H. Van Oosterwyck, M. Inokoshi, and F. Zhang, "Mechanical properties–translucency–microstructure relationships in commercial monolayer and multilayer monolithic zirconia ceramics," *Dental Materials*, vol. 38, no. 5, pp. 797–810, 2022.
- [128] P. C. S. Liporoni, A. C. R. Ponce, M. R. de Freitas, R. F. Zanatta, M. C. S. Pereira, and A. Catelan, "Influence of thickness and translucency of lithium disilicate ceramic on degree of conversion of resinous materials," *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, vol. 12, no. 8, pp. e745–e748, 2020.
- [129] M. Özcan and M. Bernasconi, "Adhesion to zirconia used for dental restorations: a systematic review and meta-analysis.," *The Journal of Adhesive Dentistry*, vol. 17, no. 1, pp. 7–26, 2015.
- [130] M. David-Pérez, J. P. Ramírez-Suárez, F. Latorre-Correa, and A. A. Agudelo-Suárez, "Degree of conversion of resin-cements (light-cured/dual-cured) under different thicknesses of vitreous ceramics: systematic review," *Journal of Prosthodontic Research*, vol. 66, no. 3, pp. 385–394, 2022.

- [131] G. M. De Souza, R. R. Braga, P. F. Cesar, and G. C. Lopes, "Correlation between clinical performance and degree of conversion of resin cements: A literature review," *Journal of Applied Oral Science*, vol. 23, no. 4, pp. 358–368, 2015.
- [132] A. P. Manso, N. R. F. A. Silva, E. A. Bonfante, T. A. Pegoraro, R. A. Dias, and R. M. Carvalho, "Cements and adhesives for all-ceramic restorations," *Dental Clinics of North America*, vol. 55, no. 2, pp. 311–332, 2011.
- [133] A. Heboyan, A. Vardanyan, M. I. Karobari, A. Marya, T. Avagyan, H. Tebyaniyan, M. Mustafa, D. Rokaya, and A. Avetisyan, "Dental Luting Cements: An Updated Comprehensive Review," *Molecules*, vol. 28, no. 4, 2023.
- [134] L. M. de Mendonça, I. S. Ramalho, L. A. S. N. Lima, L. A. Pires, T. A. Pegoraro, and L. F. Pegoraro, "Influence of the composition and shades of ceramics on light transmission and degree of conversion of dual-cured resin cements," *Journal of Applied Oral Science*, vol. 27, 2019.
- [135] T. Y. Kwon, R. Bagheri, Y. K. Kim, K. H. Kim, and M. F. Burrow, "Cure mechanisms in materials for use in esthetic dentistry," *Journal of investigative and clinical dentistry*, vol. 3, no. 1, pp. 3–16, 2012.
- [136] C. de C. A. Lopes, R. B. Rodrigues, A. L. Faria e Silva, P. C. Simamoto Júnior, C. J. Soares, and V. R. Novais, "Degree of conversion and mechanical properties of resin cements cured through different all-ceramic systems," *Brazilian Dental Journal*, vol. 26, no. 5, pp. 484–489, 2015.
- [137] C. Pianelli, J. Devaux, S. Bebelman, and G. Leloup, "The micro-Raman spectroscopy, a useful tool to determine the degree of conversion of light-activated composite resins," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 48, no. 5, pp. 675–681, 1999.
- [138] J. Durner, J. Obermaier, M. Draenert, and N. Ilie, "Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites," *Dental Materials*, vol. 28, no. 11, pp. 1146–1153, 2012.
- [139] M. A. Gauthier, I. Stangel, T. H. Ellis, and X. X. Zhu, "A new method for quantifying the intensity of the C=C band of dimethacrylate dental monomers in their FTIR and Raman spectra," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6440–6448, 2005.
- [140] M. E. Queiroz, "Influência da espessura e diferentes graus de opacidade do dissilicato de lítio no grau de conversão e resistência de união de cimentos resinosos." Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2022.
- [141] C. K. Vatanabi, L. Correr-Sobrinho, and F. M. Tsuzuki, "Influência de diferentes espessuras da zircônia na polimerização do cimento resinoso," in *Anais do XXX*

*Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP*, Campinas, SP, 2022. Disponível: <https://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xxxcongresso/inscritos.php>

- [142] I. M. Barszczewska-Rybarek, "A guide through the dental dimethacrylate polymer network structural characterization and interpretation of physico-mechanical properties," *Materials*, vol. 12, no. 24, 2019.
- [143] L. G. P. Moraes, R. S. F. Rocha, L. M. Menegazzo, E. B. de Araújo, K. Yukimitu, and J. C. S. Moraes, "Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites," *Journal of Applied Oral Science*, vol. 16, pp. 145–9, 2008.
- [144] C. M. Tafur-Zelada, O. Carvalho, F. S. Silva, B. Henriques, M. Özcan, and J. C. M. Souza, "The influence of zirconia veneer thickness on the degree of conversion of resin-matrix cements: an integrative review," *Clinical Oral Investigations*, vol. 25, pp. 3395–3408, 2021.
- [145] S. Oh, S. M. Shin, H. J. Kim, J. Paek, S. J. Kim, T. H. Yoon, and S. Y. Kim, "Influence of glass-based dental ceramic type and thickness with identical shade on the light transmittance and the degree of conversion of resin cement," *International Journal of Oral Science*, vol. 10, 2018.
- [146] Y. Yan, H. Zhang, J. Yang, and C. Chen, "Evaluating the Bonding Performance of a Novel Dual-curing Composite Cement to Zirconia.," *The journal of adhesive dentistry*, vol. 23, no. 6, pp. 569–578, 2021.
- [147] T. A. Sulaiman, A. A. Abdulmajeed, T. E. Donovan, A. V Ritter, L. V Lassila, P. K. Vallittu, and T. O. Närhi, "Degree of conversion of dual-polymerizing cements light polymerized through monolithic zirconia of different thicknesses and types," *The Journal of Prosthetic Dentistry*, vol. 114, pp. 103–108, 2015.
- [148] R. H. de Jesus, A. S. Quirino, V. Salgado, L. M. Cavalcante, W. M. Palin, and L. F. Schneider, "Does ceramic translucency affect the degree of conversion of luting agents?," *Applied Adhesion Science*, vol. 8, no. 4, pp. 1–10, 2020.
- [149] V. R. Novais, L. H. A. Raposo, R. R. de Miranda, C. de C. A. Lopes, P. C. Simamoto Júnior, and C. J. Soares, "Degree of conversion and bond strength of resin-cements to feldspathic ceramic using different curing modes," *Journal of Applied Oral Science*, vol. 25, no. 1, pp. 61–68, 2017.