UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GUSTAVO NICLODELLI

Investigação da ablação a laser no regime de
femtosegundo em materiais homogêneos e
estruturados

São Carlos
2011

GUSTAVO NICLODELLI

Investigação da ablação a laser no regime de
femtosegundo em materiais homogêneos e
estruturados

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto
de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Física aplicada

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei
Salvador Bagnato

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o programa)

São Carlos
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Nicolodelli, Gustavo

Investigação da ablação a laser no regime de femtossegundo em materiais homogêneos e estruturados./Gustavo Nicolodelli; orientador Vanderlei Salvador Bagnato.- Versão corrigida - São Carlos, 2011.

. 128p.

Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

.

1. Ablação. 2. Femtossegundos. 3. Homogêneos. 4. Estruturados.
I.Título.

Agradeço a Deus por ter tido saúde, entendimento e confiança para a realização deste Trabalho.

Dedico este Trabalho

*Aos meus pais Elmiro e Nereide, e meu irmão Henrique,
motivos de tanta felicidade e esperança.*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste Trabalho, em especial:

Ao Prof. Vanderlei Salvador Bagnato, pela orientação, paciência, amizade, confiança, e incentivo.

A Profa. Cristina Kurachi, pela “co-orientação” em importantes momentos ao longo trabalho, além da amizade e incentivo.

Aos colaboradores Dra. Rosane F. Z. Lizarelli, Dr. Frederico Dias Nunes, Dra. Kilvia M. F. Malgalhões, Dr. Daniel V. Magalhães, Dr. Cléber R. Mendonça e Dr. Lino Misoguti, pelos ensinamentos e proveitosas discussões.

Aos colegas do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, pelo apoio para realizar o trabalho e pela amizade: Mardoqueu, Boto (Éverton), Ruy Mattosinho, Clóvis Grecco, Larissa Marila, Carla Fontana, Denis Jacomassi, Sebastião Prata, Jeison Tribioli, Raquel Rego, Profa. Maristela, Francisco, Maria Tereza, Natália Inada, (Merê) Prof. Emery Lins, José Dirceu, Lilian Moriyama, Gustavo Sabino, Leandro Minatel, Vitor Panhoca, Alessandra, Juçaíra, Vitória Maciel, Michelle, Ana, Fernanda, Paula, Hilde, Cintia, Gustavo, Mariana e Laila.

Ao Sebastião, Ruy e Raquel pela dedicação na revisão do conteúdo do trabalho.

A Fernanda Almeida e ao Renato (Baca) pela amizade, confiança, e incentivo

Aos Colaboradores Dr. Ricardo E. Samad, Dra. Denise Zezell, Dr. A. Freitas e Dr. Nilson Dias Vieira Jr., do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, por fornecerem os laboratórios em um momento oportuno do trabalho. E pela dedicação e atenção do colaborador Ricardo, durante a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Euclides M. Jr. por possibilitar a realização de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A todos os funcionários do IFSC-USP, em especial aos que fazem parte do Grupo de Óptica, Bel, Cris, e Bene, e colaboradores do LAT e LIEPO, pela dedicação, carinho e respeito.

Aos meus familiares, pela confiança e pelo incentivo.

Ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP, Capes, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro e infra-estrutura.

RESUMO

NICOLODELLI, GUSTAVO. **Investigação da ablação a laser no regime de femtossegundo em materiais homogêneos e estruturados**. 2011. 128p. Tese (Doutorado em Ciências). – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Embora a ablação a laser venha sendo bastante utilizada em materiais em geral, pouco é entendido sobre o comportamento deste processo perto de uma interface separando dois materiais distintos. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi realizar um estudo macroscópico e microscópico dos processos que envolvem a ablação a laser em regime de femtossegundos em materiais homogêneos e estruturados. No caso de materiais estruturados, o estudo focou-se em uma situação de interface, na qual ocorrem mudanças nas propriedades de ablação. Baseado nos resultados, nós pretendemos obter subsídios científicos para entender as aplicações da ablação em regime de pulsos ultracurtos para estruturas estratificadas, tais como de dentes, ossos, interface resina-dente, dente-metal, e outras. Diferentes técnicas experimentais foram idealizadas para determinar a progressão da ablação dentro do material e obter dados extraídos da superfície. Utilizando luz espalhada de uma fonte externa, o processo de ablação foi temporalmente monitorado, permitindo determinar a velocidade de ablação em materiais transparentes, assim como perfis típicos de ablação nestes materiais. Em um segundo experimento, nosso estudo permitiu quantificar a variação da geometria de ablação perto de uma interface separando dois materiais distintos. Nossos dados foram suficientes para prever a ocorrência de uma descontinuidade no perfil da ablação entre dois meios: resina A e resina B, mostrando uma repentina descontinuidade do diâmetro da cavidade ablacionada. Adicionalmente, foi realizada uma análise dos aspectos morfológicos de diferentes tecidos biológicos irradiados e nosso estudo mostrou a eficiência da ablação utilizando laser de femtossegundos no processamento de tecidos duros e a possibilidade de utilizar esses sistemas sem causar danos térmicos e mecânicos nos tecidos remanescentes. Finalmente nós aplicamos a microperfuração a laser para produzir micro-poros na superfície de tecidos biológicos (fígados), melhorando a penetração do medicamento ALA e a aumentando a profundidade de tratamento.

Palavras Chave: Ablação. Femtossegundos. Materiais homogêneos. Materiais estruturados.

ABSTRACT

NICOLODELLI, GUSTAVO. **Investigation of the femtosecond laser ablation on homogeneous and structured materials**. 2011. 128p. Tese (Doutorado em Ciências). – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Although laser ablation has been long used in general materials, little is known regarding the behavior of these process near an interface separating two distinct materials. In this context, the main aim of this work was to perform a microscopic and macroscopic study of the processes that include femtosecond laser ablation in homogeneous and/or structured materials. In the case of structured materials, the study focused on an interface situation, in which sudden changes occurred in the properties. Based on the results, we aimed to obtain scientific subsidies to understand the application of ultrashort pulses to stratified structures, such as teeth, bones, resin-teeth or metal-teeth interface, and others. Distinct experimental techniques were used to determinate the ablation progression into the materials and to obtain data extracted from their surface. By using the scattered light from an external source, the ablation process was monitored temporally, allowing to determine the velocity of ablation in transparent materials, besides determining the typical profiles of ablated cavities in these materials. In a second experiment, our study allowed quantifying the overall variation in the ablation geometry that takes place on the interface of two different materials. Our data were sufficient to predict the occurrence of a discontinuity in the ablation profile on the interface between two media: resin A and resin B, showing a sudden discontinuity of the ablated cavity diameter. In addition, an analysis of the morphological aspects of different biological tissues irradiated by femtosecond laser pulses was performed and a comparative study showed the ablation efficiency of the femtosecond lasers in hard tissues processing and the possibility of using these systems with no thermal and mechanic damage. Finally, we applied a laser micromachining producing micro-pores on the tissue surface, improving the ALA penetration and increasing the treatment depth.

Keywords: Ablation. Femtosecond. Homogeneous materials. Structured materials.

Lista de Abreviaturas ou Siglas

fs – femtossegundos

ps – picossegundos

ns – nanossegundos

ms - milissegundos

BisGMA - bisfenol A-glicidil metacrilato

UDMA - uretanodimetacrilato

TEGDMA – trietilenoglicoldimetacrilato

LED – Light Emission Diode

MHz – Megahertz

KHz – QuiloHertz

MJ – MegaJoule

mW – miliWatts

µm – micrometros

nm – nanômetros

UV - Ultravioleta

IV - Infravermelho

CPA – “Chirped Pulse Amplification”

KLM – “Kerr-lens Mode Locking”

SDG - “Synchronization and Delay Generator”

BWD - “bandwidth”

PMMA - Polimetilmetacrilato

CCD – “Charge Coupled Device”

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Nilo – Núcleo Integrado de Laser em Odontologia

TFD - Terapia fotodinâmica

ALA - ácido 5-aminolevulínico

ME - matriz extracelular

FTF - força de tensão final

MAL - metil 5-aminolevulico

SUMÁRIO

1 Introdução.....	19
2 Mecanismos de ablação.....	23
2.1 Características importantes no processo de ablação a laser em tecidos biológicos.....	24
2.2 Mecanismos de ablação a laser em tecidos biológicos duros.....	25
2.3 Ablação induzida por plasma.....	30
2.3.1 Modelo para ablação induzida por plasma.....	34
2.3.2 Características da formação do plasma.....	35
2.3.3 Implicações para ablação do tecido.....	40
2.3.4 Controle da precisão da ablação.....	40
2.4 Ablação a laser em uma escala de tempo.....	42
2.4.1 Processos físicos fundamentais da interação laser-sólido: regime de femtossegundos.....	4
4	
3 Laser Titânio: Safira.....	49
3.1 Sistema laser utilizado nos experimentos.....	50
3.1.1 O modulador “Q-switch” e “mode-locking”.....	52
3.1.2 Características do feixe gaussiano.....	53
4 Ablação a laser em materiais homogêneos transparentes.....	57
4.1 Procedimento experimental.....	58
4.2 Resultados e discussão.....	59
5 Perfil da ablação a laser no regime de femtossegundos perto de uma interface.....	69
5.1 Procedimento experimental.....	70
5.2 Resultados e discussão.....	71

6 Aspectos morfológicos e quantitativos de tecidos biológicos duros e resinas restauradoras odontológicas.....77

6.1 Procedimento experimental.....	78
6.1.1 Tecidos ósseos duros.....	78
6.1.2 Tecidos dentais duros (esmalte e dentina).....	79
6.1.3 Resinas restauradoras odontológicas.....	81
6.2 Resultados e discussão.....	81
6.2.1 Tecidos ósseos.....	81
6.2.1.1 Determinação do limiar de ablação em tecidos ósseos.....	82
6.2.1.2 Aspectos morfológicos da ablação com laser de femtossegundos em tecidos ósseos.....	86
6.2.2 Aspectos morfológicos da ablação com laser de femtossegundos em esmalte e dentina.....	90
6.2.2.1 Dentina humana.....	91
6.2.2.2 Esmalte humano.....	93
6.2.3 Aspectos morfológicos da ablação com laser de nanossegundos e femtossegundos em resinas odontológicas.....	94

7 Ablação a laser em tecidos biológicos moles.....99

7.1 Propriedades dos tecidos biológicos moles e implicações no processo de ablação.....	100
7.2 Procedimentos experimentais.....	101
7.3 Resultados e discussão.....	103
7.3.1 Geometria da ablação em pele.....	103
7.3.2 Limiar de ablação em tecidos moles.....	105
7.3.3 Micro-canais utilizados no auxílio da penetração do medicamento ALA.....	109

8 Conclusões.....115

Referências.....117

1 Introdução

A interação laser matéria é algo de grande interesse, desde a descoberta do laser. É um tema cujo interesse está sempre crescente.

O rápido desenvolvimento de lasers de femtossegundos (fs) nas últimas décadas tem aberto um amplo campo de novas aplicações em indústrias, ciências dos materiais e ciências biomédicas (1).

Um importante efeito físico é a remoção do material, ou ablação, por laser no regime de pulsos ultracurtos. Este efeito pode ser utilizado para a deposição de filmes finos, microfabricação e microcirurgia, entre outras aplicações (1).

Contudo, os atuais sistemas laser clínicos não têm mostrado grande vantagens sobre os instrumentos clínicos em cirurgias ortopédicas ou dentais e maxilo-faciais, e ainda têm um uso limitado nesse campo (2,3). Em particular, para tecidos duros, tais como ossos, a eficiência da remoção do material tem se mostrado ser muito mais lenta do que com instrumentos mecânicos (3,4), limitando a aplicação clínica. Porém é possível, em um futuro próximo, que o desenvolvimento de novos lasers possa mudar esta situação (5).

Recentemente, pesquisas em microfabricação com lasers de fs têm demonstrado cortes muito preciso e com pequeno ou indetectável dano térmico adjacente em vidros, materiais dielétricos e metais (6), assim como em tecidos biológicos tais como dentes (7). Além disso, a engenharia de precisão a laser está sendo extensivamente aplicada em indústrias para microfabricação, devido à vantagem de ser um processo de perfuração livre de contato, juntamente com a disponibilidade de fontes de luz confiáveis e custo-benefício favorável (8).

Lasers de fs apresentam diferentes mecanismos de corte quando comparados com os lasers de pulsos longos (2). Em regime de nanossegundos (ns), por exemplo, o laser aquece o alvo até o ponto de fusão, seguindo depois para a temperatura de vaporização e a subsequentemente ocorre a ablação. Em regime de fs, o processo de ablação pode ocorrer através de uma direta transição sólido-plasma. A rede do material é aquecida na escala de tempo de picossegundos (ps) e um plasma é criado, seguido de uma rápida expansão hidrodinâmica do plasma e ablação (9). O processo de ablação levando à remoção do material ocorre em

ordens de magnitude mais rápidas que a difusão térmica do adjacente tecido. Assim, a condução térmica externa a região do alvo é desprezível e se espera uma significativa redução no dano colateral em torno do tecido pelo excessivo calor (10).

Além de um diferente mecanismo de corte, o processo de absorção dos pulsos ultracurtos no alvo é diferente da que ocorre com pulsos de ns durante a ablação (2). Neste regime ultra-rápido, a energia óptica é fortemente localizada em um pequeno volume, através da absorção multi-fotônica (2), criando desta forma mecanismos de absorção diferentes daqueles que ocorrem com pulsos mais longos. Adicionalmente, a potência de pico do laser pode ser aumentada para um ponto que mesmo materiais nominalmente transparentes, tornam-se seletivamente opacos na região do foco do laser, e assim, a maior parte da energia é absorvida na região de μm ou sub μm a partir da superfície do material (2). Assim, a dependência absorção-material, tal como aparece em laser de pulsos longos, não é mais uma limitação. Consequentemente, a maioria dos materiais pode ser ablacionada num único comprimento de onda, que é tipicamente centrado próximo de 800 nm, que é o caso do laser amplificador de titânio:safira (Ti:Safira).

Paralelamente com pulsos longos, ou sistemas de alta taxa de repetição, a absorção do plasma leva a um efeito conhecido como blindagem por plasma (“plasma shielding”). Neste efeito, parte da luz ou pulso proveniente do laser é retrorrefletida pelo plasma formado dentro do material. Este efeito de blindagem é não-linear e dificulta a deposição correta da fluência do laser para o corte do material e/ou tecido com mínimo dano. A excessiva deposição de calor e efeitos de blindagem por plasma são as duas maiores contribuições para o problema de excessivo aquecimento e perda de precisão geométrica em cortes a laser utilizando pulsos longos. Assim, ambos os problemas são eliminados em regimes de fs, desde que a energia do laser seja completamente depositada antes que a formação do plasma ocorra, e várias ordens de grandeza mais rápida que o transporte térmico adjacente do material. A ablação então dependerá somente da energia depositada e não de outros fatores não lineares.

Para obter um sistema laser que tenha uma eficiente ablação comparável com instrumentos mecânicos, o pulso do laser deve ter taxas de repetição elevadas, porém sem causar danos secundários. Se a taxa de repetição é muito alta, o pulso proveniente do laser deve interagir com o plasma, que é altamente absorvedor, e leva a geração de calor nas amostras. Além disso, a presença da pluma (uma

mistura de material vaporizado e/ou plasma formado durante a ablação) ejetada pelo alvo também pode impedir que os pulsos seguintes atinjam o alvo, e portanto reduz a eficiência da ablação. Assim, um sistema laser ideal precisaria ter uma alta taxa de repetição, suficiente para maximizar a remoção do tecido ou material, porém apresentar um tempo entre os pulsos suficiente para a dissipação do plasma e da pluma.

O sistema de laser com essas características poderá trazer benefícios tanto para a odontologia, quanto para a medicina, pois evita o que tem sido um forte obstáculo para a interação do laser com os dentes e os ossos: os danos secundários aos tecidos remanescentes causados por ondas de choque e calor.

Convencionalmente, a maioria dos estudos existentes de ablação a laser em materiais duros está limitada a análise de superfícies das áreas irradiadas (11). A progressão espacial da ablação dentro do material não tem sido investigada da forma esperada, embora esta informação seja relevante para várias situações aplicadas, (por exemplo, na odontologia e em cirurgias). A dinâmica da progressão da ablação pode impor limitações em certas aplicações. Tecidos biológicos duros, como dentes e ossos, são compostos por camadas estruturadas, ou seja, apresentam interfaces separando regiões com diferentes propriedades, que podem responder diferentemente durante a interação laser-material e modificar a progressão da ablação. A investigação dos fenômenos de ablação próximos a interfaces constitui uma área nova abordada neste tema.

O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo tanto em nível microscópico, quanto macroscópico, dos processos envolvendo ablação a laser no regime de femtossegundos, em situação onde o material é homogêneo e quando é estruturado. Na parte de materiais estruturados, nosso estudo ficou focalizado em situação de interface, onde há mudança repentina de propriedades. Com este estudo pretendemos gerar subsídios científicos para que possamos entender os aplicativos de ablação no regime de pulsos ultracurtos em estruturas estratificadas como é o caso de dentes, ossos, interface resina-dente, metal-dente, dentre outros.

Nosso trabalho procurou desenvolver novas metodologias de estudo, dentro dessa área de conhecimento, que gerou resultados inéditos.

Abaixo segue um “layout” da tese:

Capítulo 2 – Descreve uma revisão dos mecanismos envolvidos durante o processo de ablação em tecidos biológicos, assim como a processos físicos da interação laser-sólido em escala de tempo.

Capítulo 3 – O sistema laser utilizado no trabalho e suas características.

Capítulo 4 – Explora os aspectos de ablação induzida por plasma em materiais transparentes e determina temporalmente a velocidade de ablação dentro do material.

Capítulo 5 – Investiga o comportamento da ablação dentro de materiais e a consequência quando o processo ocorre atravessando por uma interface.

Capítulo 6 – Apresenta um estudo quantitativo e dos aspectos morfológicos no processo da ablação a laser com pulsos ultracurtos em diferentes tecidos biológicos duros e resinas odontológicas restauradoras.

Capítulo 7 – Inclui um estudo da ablação a laser em tecidos biológicos moles e utilização dessa técnica no auxílio da Terapia Fotodinâmica.

Capítulo 8 – Conclusão da tese, destacando os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento dos estudos

2 Mecanismos de ablação

Logo após a invenção do laser de rubi pulsado por Maiman em 1960, investigadores foram motivados a investigar o potencial da radiação a laser pulsado para aplicações na medicina e odontologia (12). Desde então ficou estabelecido que lasers fossem capazes de interagir e destruir tecidos biológicos com precisão e seletividade (13,14). Dentro de poucos anos, surgiram na literatura artigos relatando o uso de lasers pulsados para coagulação precisa do tecido em pacientes, junto com o desenvolvimento de sistemas lasers designados para uso clínico (15,16).

Contudo, uma aplicação clinicamente viável da ablação a laser pulsada não foi demonstrada até meados de 1970 (12). Foi somente no início dos anos oitenta que lasers foram rotineiramente utilizados para diversas aplicações médicas, incluindo processos de ablação (12). Já na década de 1980, foram introduzidos os lasers de femtossegundos (17). Desde então estes lasers tiveram um grande interesse devido a suas versáteis aplicações para uma grande variedade de problemas (17). Entre suas principais vantagens, tem-se o seu comprimento de onda perto do infravermelho (IV), que apresenta uma maior profundidade de penetração no tecido em comparação com a radiação visível, e sua curta duração do pulso (17), evitando problemas inerentes aos ocorridos com pulsos curtos/longos.

O entendimento da interação do laser-tecido foi melhor desenvolvido na década de 1990, e alguns autores começaram a relatar os aspectos gerais da ablação a laser (18-20). Aspectos específicos dos processos de ablação também têm sido abordados em compreensivos estudos (12). Aplicações médicas de lasers que geram plasma foram revisadas por Gitone e Jones (21), enquanto processos de ablação resultantes da absorção não linear foram considerados por Vogel *et al* (12).

Apresentaremos a seguir os mecanismos envolvidos na ablação a laser pulsado em tecidos biológicos originários de vários estudos, com o enfoque em ablação mediada por plasma no regime de pulsos ultracurtos. A revisão não é completa, e visa apenas fornecer subsídios para ao entendimento de nossos estudos.

2.1 Características importantes do processo de ablação a laser em tecidos biológicos

Entre os mecanismos fundamentais que governam o processo de deposição e transporte de energia no tecido, temos a distribuição espacial de densidade volumétrica de energia gerada pela irradiação a laser, que direciona todos os processos de ablação com este instrumento. Esta distribuição é controlada pela exposição da radiação incidente, pela absorção óptica e pelas propriedades de espalhamento do tecido (12). Uma compilação das propriedades ópticas dos tecidos, medidas *in vitro* e *in vivo* foi feita por Cheong (21).

As propriedades de absorção óptica do tecido são regidas pelos processos eletrônicos, vibracionais, e rotacionais das moléculas constituintes. Em geral, as propriedades de absorção óptica do tecido biológico são dominadas pela absorção de proteínas, DNA, melanina, hemoglobina e água. Contudo, a dependência de suas propriedades ópticas com o comprimento de onda é completamente diferente (12).

Além da hemoglobina, que contribui significativamente para a absorção óptica dos tecidos vascularizados fora da região de 1000 nm (12), a água e a proteína são os principais absorvedores na região espectral do infravermelho (IV). A água é o absorvedor mais importante no IV e contribui significativamente para absorção do tecido em comprimentos de onda maiores que 900 nm (12).

A distribuição espacial de densidade volumétrica de energia resultante da irradiação a laser pulsada de tecidos também gera um efeito térmico e mecânico significativamente transitório. Estes efeitos transitórios termomecânicos são os responsáveis para todos os processos de ablação a laser que não são mediados por processos fotoquímicos. Em 1983, Anderson e Parrish (23) introduziram o conceito que efeitos micro-cirúrgicos confinados espacialmente podem ser induzidos a partir do laser que apresenta tempo de exposição menor que o tempo de difusão térmica característico do volume aquecido. Para a ablação a laser, o volume aquecido é tipicamente composto de uma camada de tecido de espessura $1/\mu_a$, e o tempo de difusão térmica característico, t_d , é dado por (24) $t_d = 1/\kappa\mu_a^2$, sendo μ_a o coeficiente de absorção e κ difusividade térmica. Assim, podemos ressaltar a importância da largura do pulso do laser no processo de ablação e correlacionar com o tempo de difusão térmica do tecido.

A realização de uma ablação altamente precisa depende da irradiação em um comprimento de onda com pequena profundidade de penetração no tecido, resultando em um maior confinamento da energia depositada (12). Contudo, essa condição ainda não é suficiente. Confinamento térmico também é necessário para ablação precisa, devido a limitar a extensão espacial da difusão térmica durante a irradiação e maximizar a temperatura no volume absorvido. O confinamento por “stress”, por meio de tensão, deve promover uma melhor eficiência no processo de ablação, pois existe ampla evidência que isto reduz a densidade de energia volumétrica requerida para a remoção do material. Isto resulta no aumento da eficiência de ablação e uma redução do efeito térmico no tecido remanescente.

2.2 Mecanismos de ablação a laser em tecidos biológicos duros

Segundo Fried (25), existem três mecanismos de interação entre lasers de alta intensidade e tecidos duros: vaporização explosiva, ejeção hidrodinâmica e ablação explosiva termo-mecânica mediada por água, que serão descritos a seguir. Contudo, também há um quarto mecanismo, que será discutido posteriormente, a Ablação Mediada por Plasma, que ocorre quando pulsos ultracurtos com alta intensidade são entregues no alvo.

Ablação Por Vaporização Explosiva: entende-se como uma vaporização térmica aquela que ocorre com a expulsão de gotas fundidas de material aquecido acima do ponto de fusão e vaporização do tecido à pressão atmosférica. A fusão é quase instantânea, e ocorre em escalas de tempo menores do que picossegundos (ps), uma vez que o ponto de fusão tenha sido atingido. A vaporização, em contraste, tem uma taxa limitada pela cinética, e ocorre somente na interface, durante o rápido aquecimento pelos lasers pulsados e somente na área restritamente irradiada (25). Se o sólido não é poroso, a temperatura interna se eleva acima da temperatura de vaporização, resultando em uma expansão explosiva. O tecido duro dental é poroso, isso significa que esse fenômeno até pode ocorrer, mas dentro dos poros, particularmente nos contornos dos prismas (25). A pressão aumenta nos poros, devido à liberação de gases na subsuperfície, e pode exceder a tensão de fratura do material. Neste caso, pode ocorrer a remoção explosiva de partes do material

(Figura 1). São exemplos deste mecanismo os lasers de CO₂ (9-11 μ m) e de Nd:YAG nos regimes CW e pulsado em micro e em nanossegundos (26).

Figura 1 – Esquema representativo: a) do processo de ablação por vaporização explosiva, e b) dos efeitos em dentes.

O mecanismo de Ejeção Hidrodinâmica, é tipicamente observado quando metais são ablacionados por lasers de pulsos curtos (25). A rápida fusão cria grandes forças de expansão devido à mudança de volume do material sob fusão. A expansão do líquido toma uma direção oposta à energia de tensão da superfície do líquido (Figura 2), pois é onde encontra menor resistência à expansão. O resultado é a formação de micro-porções fluídas que são, portanto, hidrodinamicamente ejetadas (26). Superfícies de implante irradiadas com Laser Excimer (região do ultravioleta) para criar micro-retenções e facilitar a osteo-interação, são exemplos dessa aplicação (26). Observações de MEV de esmalte irradiado com pulsos curtos (100 ns) e pulsos de laser de CO₂ (λ = 9,3 e 9,6 μ m; tempo de exposição do pulso 50-500 μ s) mostraram a formação de gotículas e superfícies ásperas, evidente de ejeção hidrodinâmica (25).

Figura 2 - Esquema representativo do mecanismo de ablação por ejeção hidrodinâmica.

A **Ablação Explosiva Termo-Mecânica**, mediada por água, é o mecanismo mais comum de ablação dos tecidos duros dentais, uma vez que o aquecimento é direcionado seletivamente à água ligada quimicamente à estrutura (água cristalina) e à água livre, que é adicionada ao sistema em fluxo contínuo de entrada e saída (26). Esse fato pode ocorrer a temperaturas abaixo do ponto de fusão da fase mineral do esmalte, portanto, não ocorre mudança da estrutura cristalina do tecido irradiado (25). O laser de Er:YAG, emitindo no comprimento de onda de 2940 nm, é um exemplo desse tipo de interação (26). Vários estudos sobre ablação de tecidos duros indicam que grandes partículas são ejetadas em alta velocidade a partir do tecido irradiado, o que fortalece o mecanismo explosivo mediado por água (Figura 3).

Podemos considerar um laser no regime de microssegundos, como no caso do laser de Er:YAG aprovado para preparos cavitários em odontologia (27), como uma referência para longos pulsos, onde a ablação é dominada pela absorção de calor no material: o material é aquecido até o ponto de ebulição da água para ser vaporizado, e uma vez vaporizado, é explosivamente ejetado da superfície, criando uma cratera irregular (26). Em muitos materiais, a alta temperatura nos tecidos vizinhos conduz à formação de trincas devido ao choque térmico e à mudança de suas características morfológicas originais; adicionalmente aos efeitos térmicos, maiores mudanças podem ocorrer devido ao choque mecânico decorrentes da ejeção muito intensa do material (28).

Figura 3 - Esquema representativo dos efeitos responsáveis pelo processo de ablação explosiva termomecânica, em uma escala de tempo.

Apesar dessa classificação proposta por Fried (25), sabemos que existe uma variedade de mecanismos de interação que ocorrem quando aplicamos a luz do laser em tecidos biológicos. Características específicas do tecido assim como parâmetros do laser contribuem para essa diversidade. Os seguintes parâmetros, os quais são característicos da radiação do laser, são fundamentais para a classificação das interações: comprimento de onda, largura temporal do pulso, energia aplicada, tamanho do “spot” focal, densidade de energia e densidade de potência. Como vimos acima, e discutiremos ao longo desse capítulo, a largura temporal do pulso é um parâmetro crucial para classificarmos o tipo de interação.

Cirurgias precisas a laser são encontradas quando o alvo desejado é exposto a condições otimizadas do laser para um dado modo de interação (17). Embora o número de possíveis combinações para os parâmetros experimentais seja ilimitado, segundo Niens (19), existem cinco principais categorias de tipo de interação entre laser e tecidos. Estas são a interação foto-química, interação térmica, foto-ablação, ablação induzida por plasma e foto-disrupção (19).

A Figura 4 mostra um delineamento das zonas de interação. Esta classificação de interação laser-tecido é empírica e descreve os mecanismos dominantes da interação, e geralmente a ligação com as interações na vizinhança não é definitivamente estabelecida. As linhas tracejadas indicam fluência constante de 1 J/cm^2 e 1000 J/cm^2 (17).

Figura 4 – Mapa da interação laser-tecido. Os círculos representam apenas uma estimativa dos parâmetros do laser associados (19).

No topo da Figura 4 os mecanismos de interação mostrados são a ablação induzida por plasma e a fotodisrupção. Ambos mediados pela ruptura ótica do material, que é possível apenas em altas densidades, excedendo 10^{11} W/cm² (17,19). Tais intensidades podem ser alcançadas utilizando lasers de pulsos ultracurtos. A diferença que separa as duas interações é que para o primeiro caso, a ruptura ótica leva à geração de plasma e a disrupção do material na região focal, enquanto para o segundo caso, a densidade de potência é maior e efeitos adicionais como ondas de choque e bolhas de cavitação estão presentes (18,19).

Para lasers com taxa de repetição baixa (na faixa de 1 KHz) intervalo entre os pulsos é de 1 ms, que é maior que o tempo de difusão térmica dos materiais (na sílica, por exemplo, é da ordem de microssegundos) (17), assim a disrupção localizada por cada pulso é independente, limitando a estrutura criada para a região focal (17). Em altas taxas de repetição, geralmente MHz, o dano é um processo acumulativo devido à rápida deposição de energia. O intervalo entre os pulso é de dezenas ou centenas de nanossegundos, que é significativamente menor que os

microssegundos requeridos para a difusão térmica. As mudanças estruturais resultam do calor gerado pelo sucessivo acúmulo de pulsos na região do volume focal e consequentemente fusão do material (17). Assim, os trens de pulsos em MHz agem como uma fonte de calor no volume focal no interior do material. Neste regime acumulativo, a taxa de repetição, o número de pulsos, e o tempo de irradiação determinam o tamanho e a morfologia da área modificada.

2.3 Ablação induzida por plasma

A ablação a laser mediada/induzida por plasma, também conhecida como “breakdown” induzido por laser, que corresponde a um dos mecanismos citados acima, depende fortemente da absorção não linear no alvo, que ocorre quando o limiar de irradiância de um material específico é excedido (19). Quando obtemos densidades de potência excedendo 10^{11} W/cm² em sólidos e em fluidos, ou 10^{14} W/cm² em gases, ocorre um fenômeno chamado “optical breakdown” (19). Em outras palavras, para a remoção de um átomo de um sólido, por meio de um único pulso do laser, é necessário entregar ao sistema uma energia acima da energia de ligação do átomo (1). Por exemplo, um típico sistema laser de femtossegundo Ti:safira amplificado com pulsos de 100 fs, centrado em 800 nm, com uma potência média de 1 W e uma taxa de repetição de 1 KHz, tem uma potência de pico de 10 GW. Quando esse feixe é focalizado, sua potência de pico torna-se 10^{14} W/cm². Contudo, para ablacionar a mesma quantidade de material, utilizando pulsos com menor duração (largura temporal), devemos aplicar uma maior intensidade do laser, em proporção inversa à duração do pulso. Por exemplo, ablação a laser com pulsos de 100 fs requer uma intensidade na faixa de 10^{13} - 10^{14} W/cm², enquanto para pulsos de 30-100 ns, ablacionar o mesmo material necessita 10^8 - 10^9 W/cm². Em intensidade acima de 10^{13} - 10^{14} W/cm² a ionização da maioria dos materiais (alvos) ocorre no instante inicial do pulso do laser (1). Esse efeito será discutido abaixo e é importante para o entendimento do processo de ablação induzida por plasma e foto-disrupção.

Primeiramente, é interessante destacar que, por meio de ablação induzida por plasma, pode ser realizada uma remoção do tecido muito limpa e bem definida sem

evidências de danos térmicos e mecânicos, quando escolhido parâmetros de laser apropriados (19). O mais importante dos parâmetros de ablação induzida por plasma é o vetor campo elétrico local $\mathbf{E}$ que determina quando o “optical breakdown” é atingido. Se $\mathbf{E}$ excede um certo valor de limiar, isto é, se a força do campo elétrico é aplicada para a ionização de moléculas e átomos, ocorre “breakdown”. A amplitude de campo elétrico está relacionada à densidade local I pela equação básica da eletrodinâmica (19) ;

$$I(r, z, t) = \frac{1}{2} \varepsilon_0 c \vec{E}^2, \quad (1)$$

onde ε_0 é a constante dielétrica, e c é a velocidade da luz. Em geral, a geração de plasma devido a um campo elétrico intenso é chamado “dielectric breakdown”. O termo “optical breakdown” enfatiza que a luz UV, visível e IV são fortemente absorvidas pelo plasma (19).

O início da geração de plasma pode ocorrer por três diferentes processos, ionização termiônica, ionização multifotônica (19) ou ionização por tunelamento (30). Na primeira situação, o processo inicial para geração de elétrons livres é suposto como sendo emissão termiônica, isto é, há liberação de elétrons devido à ionização termiônica, pode ocorrer para pulsos longos e/ou curtos (19). Já a ionização multifotônica pode ocorrer devido ao campo elétrico induzido pelo intenso pulso do laser, como mostrado na Figura 5. Em geral, o termo ionização multifotônica advém do processo em que a absorção coerente de vários fótons fornece a energia necessária para a ionização (19,30). A maior parte da energia depositada não é utilizada para romper as ligações interatômicas, mas para acelerar e ejetar os elétrons. Esse processo básico de absorção de fótons e aceleração de elétrons acontecendo na presença de um átomo é chamado *Bremsstrahlung inverso* (29).

Mesmo quando o número de elétrons livres produzidos por essa absorção é pequeno o feixe ainda provê a semente inicial para a avalanche de elétrons (19). Como resultado, o limiar de ablação é independente, ou seja, não é sensível à absorção linear e aos defeitos e impurezas do material (29). Neste ponto, o tecido biológico se assemelha a um metal.

A quebra de ligação de tecido ou material resulta na formação de plasma de alta temperatura, quarto estado da matéria, o qual é uma mistura de íons e elétrons livres (31). O elétron energético que escapa e cria um grande campo elétrico devido à mudança na separação com o íon gerado. Portanto a física desse regime de

ablação envolve a aceleração de íons no campo eletrostático causada pela separação criada quando o elétron energético escapa do material (32).

Os elétrons são ainda mais acelerados pelo campo elétrico do feixe laser e isto cria o que chamamos de elétrons quentes. Portanto a energia absorvida é transformada em energia térmica do elétron, e o íon permanece frio, fazendo a inibição da expansão térmica convencional (1).

Figura 5 – Iniciação de ionização a) com subsequente crescimento da avalanche de elétrons em b). (modificado de (19)).

O campo eletromagnético criado pela energia de separação do elétron que escapou, leva os íons para fora do tecido. Este processo ocorre durante o pulso com duração menor que 200 fs e intensidade da ordem de $10^{13} - 10^{14} \text{ W/cm}^2$.

Estes elétrons com energia cinética colidem com os átomos circundantes, induzindo novos elétrons a se libertarem. Esta ionização de impacto gera uma avalanche de elétrons livres em um crescimento exponencial (29,33). A ionização continua até que este plasma se torna altamente refletivo à luz laser incidente (33-35).

Este plasma que permanece localizado no limite da microcavidade pode absorver o feixe laser incidente fazendo com que energia seja entregue à superfície (36, 37), ocorre assim a expansão da pluma de ablação. Como resultado, a refletividade aumenta e a profundidade de penetração decai (29). Quando todos os átomos do plasma são ionizados, a profundidade de penetração óptica não decai mais e toda a energia subsequentemente absorvida resulta no aumento da energia dos elétrons livres e a refletividade do plasma também continua subindo (29).

A absorção e a ablação ocorrem sem uma significativa condução térmica ou movimentação hidrodinâmica (33,35). O aquecimento ocorre somente na região de profundidade de penetração óptica, ou região de interação ou campo de trabalho (33).

O aumento da energia do pulso não leva ao aumento linear da profundidade de penetração, mais sim ao aumento da refletividade do plasma. Portanto quanto maior a intensidade dentro do pulso, mais cedo a reflexão ocorre (33).

Depois, a energia final do pulso vinda dos elétrons é transferida para os íons dentro da trama do tecido e a ejeção do material acontece. Este processo leva cerca de 10 ps (33, 35, 29). O plasma expandido expelido esfria e recombina-se num intervalo de aproximadamente 100 ps (35).

O plasma e as partículas ejetadas causam ondas de choque. Através da dissipação da energia das ondas de choque, ocorre um aumento na pressão e a temperatura nas camadas mais profundas. Este fenômeno de ondas de choque acústicas da ablação tem a característica de produzir pequenos ruídos e tem como resultado a emissão de um clarão avermelhado (33).

O aspecto mais fundamental da interação laser-material no regime de pulsos ultracurtos é o tempo de relaxação térmica, ou transporte de calor, que durante o pulso é tão rápido que o material não tem tempo para uma resposta. Portanto, a

energia entregue pelo feixe laser é grande, quebra a ligação do material e vaporiza o tecido (38,29). O restante da energia que seria gasto no aquecimento do material (pulsos longos) não o aquece. O tecido vizinho fica frio pela rapidez com que ocorre a transferência de energia (29, 39) do pulso do laser para o material.

Portanto, a formação de plasma tem um importante papel em interações de lasers de alta potência com a matéria. Em materiais que são fortemente aquecidos através da absorção linear da radiação a laser, a formação de plasma é iniciada ou sustentada pela emissão termiônica de elétrons livres (12). Neste caso, o plasma formado geralmente “blinda” o alvo e impede futuras deposições de energia por absorção não linear. Contudo, um plasma pode também ser formado em materiais que são normalmente transparentes. Isto ocorre em altas intensidades através da ionização multifotônica. A formação de plasma prevê uma possibilidade única para a deposição de energia localizada em materiais transparente ou materiais de baixa absorção. O “breakdown” induzido por laser em meios transparentes permite a realização de procedimentos não-invasivos dentro de células, tecidos, ou mesmo do corpo humano, como os olhos (12).

2.3.1 Modelo para ablação induzida por plasma

Como foi enfatizado, o campo elétrico E é o parâmetro crucial para o início da ablação induzida por plasma. Abaixo descreveremos resumidamente um modelo de ablação induzida por plasma que é baseada nas relações fundamentais da eletrodinâmica e física de plasma.

Segundo Niemz (19) o modelo é baseado em uma versão não homogênea das equações de Maxwell da eletrodinâmica. Foram consideradas algumas aproximações como, o feixe do laser sendo uma onda eletromagnética plana, a permeabilidade magnética relativa do tecido sendo $\mu=1$ e além desses, considerando as ondas eletromagnéticas transversais, isto é o produto vetorial $\mathbf{kE} = 0$, neste caso, encontramos o valor do vetor de onda $k = |\mathbf{k}|$ e o fator dielétrico complexa (ϵ^*), que podem serem expressos por;

$$k^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon^* \quad \text{e} \quad \epsilon^* = \epsilon - i \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \quad (2a,b)$$

Onde ω é a frequência da onda, c a velocidade da luz no vácuo, ε é o fator dielétrico do plasma, σ é a condutividade elétrica do plasma e ε_0 a constante de permissividade elétrica. Desde que o plasma absorva radiação incidente e levando em conta algumas equações fundamentais da eletrodinâmica, encontra-se uma expressão para o coeficiente de absorção do plasma α_{pl} e o índice de absorção do plasma $\tilde{\alpha}_{pl}$ em termos um do outro (19),

$$\alpha_{pl} = -2 \operatorname{Im}(k) = -\frac{2\omega}{c} \tilde{\alpha}_{pl} . \quad (3)$$

Considerando a equação de movimento de um plasma de elétrons e as equações acima demonstradas, encontra-se para laser de plasma frio, isto é $v_{ei} \ll \omega$, a expressão simplificada (19):

$$\alpha_{pl} = \frac{v_{ei}}{nc} \frac{\omega_{pl}^2}{\omega^2}, \quad (4)$$

Onde v_{ei} é a taxa de colisão dos elétrons e íons, e ω_{pl} é a frequência de plasma. Portanto, a absorção de plasma é aumentada na região do IV do espectro. E, desde que $\omega_{pl}^2 \sim N$ (onde N é a densidade de elétrons livres) e $v_{ei} \sim N$, obtêm-se a importante relação:

$$\alpha_{pl} \sim N^2, \quad (5)$$

Essa expressão demonstra que a absorção é uma função não linear da densidade de elétrons livres e, assim, da energia absorvida (19). É interessante destacar que o aumento da absorção do plasma é causado pela densidade de elétrons livres capazes de absorver fótons do laser. Assim, tendo em vista a geração de plasma, um tipo de ablação muito eficiente de plasma é criada.

2.3.2 Características da formação do plasma

O limiar da exposição de radiação para o “breakdown” determina a possível precisão dos efeitos do laser para a ablação ou dissecação (12). Para durações de pulsos na faixa de nanossegundos e picossegundos, o limiar de formação de plasma é reduzido consideravelmente quando o alvo tem um coeficiente de

absorção linear alto, porque os elétrons “semente” para a ionização em avalanche são previstos pela emissão termiônica de elétrons livres (12). Por outro lado, a absorção linear do alvo foi descoberta como não tendo impacto no limiar de absorção no plasma quando pulsos ultracurtos com durações de 100 fs foram utilizados (35). Isto ocorre porque a irradiância necessária para completar a ionização por avalanche durante os pulsos de femtossegundos é tão alta que os elétrons semente são facilmente criados pela ionização multifotônica, e assim a absorção linear não serve para baixar o limiar. É interessante destacar que, mesmo para plasmas de femtossegundos, a ionização por avalanche é um mecanismo que produz a maioria dos elétrons livres durante o pulso do laser (12). A ionização multifotônica predomina durante a parte inicial do pulso, mas a ionização em avalanche retoma posteriormente.

No limiar de “breakdown”, a formação do plasma é restrita na região focal do feixe do laser. Por outro lado, quando a energia por pulso excede o limiar de “breakdown” e está focalizado dentro de um meio transparente, a formação do plasma é caracterizada por um crescimento do plasma a partir da cintura do feixe em direção ao feixe do laser (em direção de “- z”). Quase nenhum plasma surge atrás do foco do laser (z_0), pois a maioria da luz do laser é logo absorvida antes e na cintura do feixe. Assim, a região depois do foco é “blindada” pela absorção por plasma (40).

Uma explicação relativística para a expansão do plasma é prevista pelo “moving breakdown” modelo originalmente proposto por Raizer (41) e posteriormente refinado Docchio et. al. (42 - 43). Como visto na Figura 6, este modelo assume que o “breakdown” óptico é independente do procedimento para formação de plasma e ocorre em todas as posições aonde a irradiância excede o limiar de “breakdown”. Como a potência aumenta durante o pulso do laser, o plasma se desloca para frente ao longo do eixo óptico, na mesma velocidade que a posição onde o limiar de irradiância para “breakdown” é excedido. Isto resulta em um plasma que chega ao seu comprimento máximo no pico da intensidade do pulso do laser. A irradiação a laser entregue posteriormente ao pico de intensidade serve apenas para esquentar o plasma, mas não o alonga ainda mais.

Figura 6 - Evolução temporal da potência do laser (a) e o perfil do plasma (b) durante o processo de “optical breakdown” em energias por pulso acima do limiar (“moving breakdown”). (1) Quando a potência do laser excede o limiar do “optical breakdown”, P_{th} , um plasma é formado no volume focal. (2) Como a potência do laser aumenta durante o pulso, o limiar de irradiância é excedido pouco mais acima do volume focal. (3) A extensão máxima do plasma é alcançada quando a potência do laser alcança seu máximo. Enquanto mais acima do volume focal os contornos do plasma em tempo (1)-(3) correspondem a uma linha iso-irradiante, isto não ocorre para a região “downstream” do volume focal, por causa da absorção da luz pelo plasma (“barramento por plasma”) (40).

Considerando pulsos de femtossegundos, a formação de plasma se inicia antes que o pulso atinja o foco do laser. O plasma se move para frente com o pulso do laser em direção ao foco, sendo que os elétrons livres permanecem na região ablacionada (44). Por outro lado para o “breakdown” em nanossegundos e picossegundos, nos quais os comprimentos físicos do pulso são muito maiores que do plasma e o plasma se move na direção contrária, a partir do foco, ao feixe proveniente do laser. Em ambos os casos, a extensão do plasma no foco do laser é simplesmente determinada pela distância axial máxima da cintura do feixe a qual o limiar do “breakdown” é excedido (12).

Agora, quando consideramos a situação que o plasma é formado em uma superfície do tecido no ar, essa dinâmica de formação de plasma ocorre um pouco diferente. Para densidades de elétrons suficientemente grandes a formação de plasma se estende para regiões no ar ao redor do alvo, porque os elétrons quentes

ejetados a partir do alvo ionizam o ar (12). Assim, apenas para lasers com pulsos de femtossegundos o acoplamento da energia óptica dentro do alvo não é enfraquecido por blindagem por plasma, e como o pulso do laser também é curto, permite a formação de pluma de plasma durante o pulso do laser (45).

A absorção por plasma determina a quantidade de energia acoplada dentro do alvo e transmitida para o volume do alvo. Além de influenciar a eficiência de processos cirúrgicos a laser, absorção por plasma é importante para a segurança, se a cirurgia é realizada próxima a regiões sensíveis, e estruturas biológicas fortemente absorvedoras como a retina (12).

Como vimos anteriormente, outra vantagem aplicada à ablação a laser no regime de femtossegundos está relacionada à dependência do tempo de transferência de energia para o material com a formação do plasma. Na figura 7, apresentamos imagens da formação de plasma durante o processo de ablação nos regimes de micro, nano, pico e femtossegundos. No regime de femtossegundos a formação de plasma ocorre dentro do material, evitando a blindagem por plasma. Este fenômeno, quando ocorre na superfície do material, dificulta que a energia proveniente do feixe seja completamente depositada no material, devido à interação com o plasma formado.

Figura 7 – Imagens representando o comportamento do plasma formado durante o processo de ablação em diferentes regimes de tempo de exposição do laser (46).

Outro aspecto importante do plasma é sua densidade de energia, que está estreitamente ligada à intensidade dos efeitos mecânicos (ondas de choque e cavitação) associada com o “breakdown”. A densidade de energia determina o grau de ruptura criado pelo evento “breakdown” e a quantidade de dano mecânico produzido nas vizinhanças do foco do laser. A deposição de energia óptica dentro do meio é mediada pela geração e subsequentemente pela aceleração de elétrons

livres. O ganho de energia por elétrons é transferido para partículas pesadas de plasma através de colisões e recombinações, e isso resulta no aquecimento dos constituintes iônico e atômico do plasma (12). A constante densidade de elétrons, o número de colisões e eventos de recombinação e a energia resultante transferida para o meio são proporcionais a duração do pulso do laser. A densidade de energia do plasma deve, portanto, aumentar com o aumento da duração do pulso. Para pulsos de femtossegundos, a duração do pulso é menor que os tempos de esfriamento e recombinação do elétron (12). Assim, uma energia mínima é transferida durante o pulso, e a densidade de energia depositada dentro da região de “breakdown” é simplesmente dada pelo número de elétrons livres produzidos, multiplicado pelo ganho médio de energia de cada elétron. Para pulsos com duração maiores que os tempos de resfriamento e recombinação do elétron (vários picossegundos), o equilíbrio dinâmico é estabelecido entre a transferência de energia através de colisões e recombinações por um lado, e pela geração de elétrons livres da irradiação incidente por outro lado (12). Portanto, a densidade de energia é maior do que para pulsos de femtossegundos.

Também precisamos levar em conta que durante a formação de plasma dentro de tecidos biológicos os efeitos mecânicos induzidos pela formação de plasma são geralmente muito mais fortes do que aqueles que surgem pela ablação baseada na absorção linear, porque a densidade de energia volumétrica do plasma é extremamente alta, particularmente para pulsos de nanossegundos e picossegundos, a qual corresponde a temperatura do plasma de milhares de Kelvin, mesmo no limiar de radiação (40).

A expansão explosiva do plasma produz efeitos de ruptura do tecido que expande espacialmente para mais longe que a vaporização e desintegração do tecido que ocorre dentro do volume do plasma (12).

Efeitos mecânicos colaterais são muito menos severos quando o plasma é produzido na superfície do tecido em ar, quando a expansão de plasma não é mecanicamente confinada (47,48). Por fim, a redução da densidade de energia do plasma com a diminuição da duração do pulso explica a forte redução dos efeitos mecânicos utilizando pulsos ultracurtos, oposto aos lasers de nanossegundos.

2.3.3 Implicações para ablação do tecido

A precisão do corte mediado pelo plasma dentro de estruturas biológicas transparentes pode ser otimizada por diversas maneiras: a) uso de um perfil do feixe simétrico que forneça um tamanho menor possível do “spot” em um dado ângulo de focalização; b) uso do maior ângulo de focalização possível para cada aplicação, porque isso garante um pequeno “spot” focal na direção lateral e axial; c) minimização de aberrações no sistema óptico, incluindo as lentes de contato utilizadas para aplicações intra-oculares; d) uso de pulsos de duração ultracurtos para explorar a diminuição do limiar do “optical breakdown” e a minimização dos efeitos mecânicos observados com a diminuição da duração do pulso; e e) separação dos pontos de aplicação posteriores durante uma série de pulsos, tais que a formação do plasma não é interrompida pelas bolhas de cavitação produzidas por pulsos prévios (49).

Processos mediados por plasma também têm sido aplicados para remoção do material em superfície de tecidos moles e duros no ar (33,50,51). Contudo, a desejada precisão da ablação mediada por plasma deve ser controlada por uma apropriada escolha do ângulo de focalização e energia do pulso. Ambos os parâmetros determinam o crescimento do plasma pela cintura do feixe no ângulo de focalização do feixe proveniente do laser. Para obter uma profundidade de ablação pequena, tal procedimento requer uma precisa busca da superfície do tecido na direção axial do feixe do laser, porque o ponto focal deve estar localizado exatamente na superfície do tecido para encontrar uma ablação precisa.

2.3.4 Controle da precisão da ablação

A alta precisão da ablação a laser pulsada implica em uma pequena profundidade de ablação por pulso, junto com mínimos efeitos térmicos e mecânicos secundários. Quando a absorção linear é utilizada para depositar a energia do laser, alta precisão pode ser alcançada pela escolha de um comprimento de onda do laser

com uma pequena profundidade de penetração óptica, combinado com pulsos de curta duração suficientes para fornecer confinamento térmico (12).

Uma ablação precisa baseada na absorção não-linear (ablação mediada por plasma) requer o uso de pequenas energias por pulso para minimizar os efeitos mecânicos disruptivos. O menor limiar de energia pela formação de plasma é encontrado com a utilização de pulsos de laser ultracurtos focalizados com grande abertura numérica. O uso de laser de pulsos ultracurtos também permite a criação de plasma com densidade de energia baixa, que produz mínimos efeitos térmicos. A combinação de pulsos de curta duração com grande abertura numérica capacita à produção de efeitos no tecido tão pequenos quanto $0.1 \mu\text{m}^3$ (12).

A deposição de energia baseada em absorção linear é aceitável somente para ablação da superfície, enquanto processos mediados por plasma possibilitam a deposição de energia dentro dos materiais que são transparentes em baixas irradiações. A ablação de superfícies mediada por plasma também oferece profundas ablações com pequeno dano térmico. Enquanto absorção linear automaticamente esta restrita a interação laser-tecido na superfície da camada. Além disso, quando grandes áreas ou volumes estão sendo ablacionados, o uso de ablação mediada por plasma requer um tempo de varredura do feixe do laser. Por outro lado, a ablação baseada em absorção linear pode ser feita sobre a área completa utilizando um laser de feixe largo (grande cintura) e com energia por pulso suficiente (12).

O controle dos efeitos secundários que ocorrem durante o processo de ablação é fundamental para uma ablação precisa. A estratégia mais correta para o controle de efeitos térmicos secundários envolve a seleção de uma duração de pulso, que seja suficientemente curta para minimizar a difusão do calor durante a propagação do pulso do laser a partir do volume de deposição de energia dentro do tecido não-ablacionado. Contudo, resultados similares podem também ser obtidos quando se utiliza pulsos mais longos se a velocidade de ablação durante o pulso do laser é comparável ou mais rápida que a difusão térmica dentro do tecido residual (12). Efeitos térmicos secundários podem ser diminuídos posteriormente pela seleção da duração do pulso do laser que são suficientemente curtos para fornecer confinamento térmico e por tensão, porque a diminuição da entalpia de ablação no regime de confinamento de tensão reduz o calor residual no tecido (52).

Quando múltiplos pulsos são entregues em uma única posição, as extensões da zona termicamente danificada e o grau de dano térmico são influenciados pelo acúmulo de calor. A taxa de repetição do pulso deve ser suficientemente baixa para evitar o progressivo acúmulo do calor residual dentro do tecido (33). Uma alternativa estratégica para evitar a acumulação de calor envolve a varredura do feixe do laser para aumentar o intervalo de tempo entre subseqüentes exposições em cada localização da área ablacionada. Por outro lado, a acumulação de calor ocorre quando séries de pulsos do laser são aplicadas podendo ser utilizadas intencionalmente para criar um efeito de coagulação em conjunção com uma precisa ablação. Desde que a precisa ablação do laser requer uma curta profundidade de penetração óptica e uma curta duração do pulso, hemóstases não são frequentemente produzidas na superfície do tecido. Assim, por exemplo, hemóstases podem ser encontradas pela aplicação de uma série de pulsos sub-ablativos com taxa de repetição suficientemente alta (53).

2.4 Ablação a laser em uma escala de tempo

Acima descrevemos os mecanismos responsáveis pela ablação quando utilizamos diferentes lasers, operando em diferentes regimes temporais de pulsos, como por exemplo, micro, nano, pico e femtossegundos, e focamos na ablação mediada por plasma. De uma forma simplificada, é interessante mostrar qual a diferença de interação entre os pulsos longos ou curtos e os pulsos ultracurtos, durante o processo de ablação de um determinado material. No diagrama da Figura 8 apresentamos algumas vantagens da ablação no regime de pulsos ultracurtos, como, reduzida zona termicamente afetada, reduzidas ondas de choque, ausência de micro-rachaduras e material re-depositado.

Figura 8 – Figura representativa das consequências dos danos residuais da interação laser-material, quando comparamos os pulso longo/curto com os de pulsos ultracurtos (54).

Quando tratamos de pulsos ultracurtos, estamos nos referindo a pulsos que apresentam largura temporal de pico e/ou femtossegundos. Para termos uma idéia da velocidade com que a ação de femtossegundos ocorre em escala de tempo, podemos citar alguns exemplos dos processos que ocorrem na natureza. Para os processos físicos, processos de femtossegundos ocorrem mais rápido que movimento rotacional e vibracional de moléculas, já em processos químicos, é mais rápido que vários tipos de reações, incluindo reações de dissociação. E para processos biológicos, é mais rápido que movimentos da proteína e processos de fotossíntese (55).

Os processos em regime de femtossegundos ocorrem muito rapidamente, porém precisamos saber qual é seu diferencial quando falamos em interação laser-matéria. Quando tratamos da interação de laser-sólido, uma excitação inicial é seguida de vários processos secundários, que resultam na modificação do material (56). Devido à importância temporal dos pulsos, que foi abordada acima, no item seguinte introduziremos os processos físicos fundamentais da interação laser-sólido.

2.4.1 Processos físicos fundamentais da interação laser-sólido: regime de femtossegundos

O primeiro passo em qualquer modificação estrutural do material por laser é a deposição de certa quantia de energia do laser. A energia total do laser e a distribuição de energia temporal e espacial determinam que tipo de modificação final será obtida.

O processo de interação primário laser-sólido é a excitação de elétrons de seus estados em equilíbrio para algum estado excitado pela absorção de fótons (56). Por exemplo, em semicondutores elétrons podem ser excitados da banda de valência para a banda de condução por absorção de fótons, como mostrado esquematicamente na Figura 9. Outros possíveis mecanismos de excitação são dois-fótons ou transições eletrônicas multifotônicas de maior ordem (56). Para uma dada fluência do laser, uma curta duração do pulso favorece os processos de excitação multifotônicos, por causa da probabilidade de absorção não linear aumentar fortemente com a intensidade do laser (56).

Figura 9 - Excitação eletrônica primária em semicondutores por absorção de um simples fóton ou multifotônica (57).

Uma excitação eletrônica inicial é seguida de complexos processos secundários, que eventualmente levam à modificação estrutural final do material. A escala de tempo que esta cadeia de eventos acontece pode ser grosseiramente classificada como na Figura 10.

A excitação eletrônica primária está associada à polarização coerente com tempo de vida muito curto. Processos de defasagem destroem a polarização aproximadamente em escalas de tempo de 10^{-14} s (57). Podemos pensar em defasagem pura como um processo que muda a fase dos estados excitados sem afetar a distribuição de energia eletrônica.

A distribuição inicial de estados eletrônicos corresponde com a configuração de estados acoplados pelas transições ópticas. A ocupação deste estado primário é rapidamente modificada por processos de interação portador-portador, e uma situação de quase-equilíbrio é estabelecida entre o elétron na escala de tempo de aproximadamente 10^{-13} s. A distribuição de energia dos portadores sobre os estados disponíveis é descrito pela distribuição de Fermi-Dirac com uma temperatura de elétron T , e é maior que a temperatura da rede (56).

Os elétrons frios em quase-equilíbrio descem em escala de tempo de 10^{-13} para 10^{-12} por emissão de fônons (56). Esfriamento de elétrons por emissão de fônons acontece para a população de certos modos de fônons. Estes fônons relaxam predominantemente pela interação inarmônica com outros modos fônons (56). O estágio final deste processo de termalização é a redistribuição dos fônons sobre toda zona de Brillouin de acordo com a distribuição de Bose-Einstein. Neste ponto a temperatura do material excitado por laser pode ser definida, e a distribuição de energia é caracterizada pela temperatura (56). Assim, em poucos picossegundos após a deposição da energia do laser a distribuição de energia é quase suficiente para o equilíbrio térmico. O equilíbrio térmico para a maioria dos efeitos práticos que se justifica a descrição da evolução futura em termos de processos térmicos. Este ponto de vista não exclui que o estabelecimento de uma aproximação do equilíbrio térmico, incluindo todos os modos de excitação do material, possa demorar mais tempo (56).

Após a termalização a distribuição espacial da energia pode ser caracterizada pelo perfil da temperatura. Para um pulso do laser suficientemente curto, este pode ser determinado pelo perfil da absorção óptica. Assim, muitos gradientes de temperatura podem ser produzidos em materiais fortemente absorvedores. Sobre

essas condições de difusão térmica podem ocorrer em uma escala de tempo da ordem de 10^{-11} s. Os detalhes dependem do coeficiente de transporte térmico e das propriedades do material (56).

Quando uma quantidade suficiente de energia é depositada no material, a temperatura de derretimento é eventualmente atingida, e a transição do estado sólido para líquido ocorre. Derretimento térmico acontece heterogeneamente pela nucleação e o crescimento da fase líquida. O limite de separação de fase se move do líquido para o sólido. O tempo para fundir uma camada de material sólido é relativamente longo, porque o limite superior da velocidade da interface líquido-sólido é da ordem da velocidade do som (56).

Figura 10 – Escala de tempo dos vários processos secundários. (56)

Uma conclusão importante que é traçada a partir das considerações da escala de tempo de termalização de energia é a seguinte. Existe uma linha de divisão distinta em torno de 10^{-12} s separando o regime de processos não-térmicos e os processos térmicos (56). A partir deste ponto de vista de processamento por laser de femtossegundos, o tempo necessário para conseguir uma desejada modificação é um fator importante. Se certa modificação estrutural leva muito mais que 10^{-12} s, devemos concluir que mecanismos térmicos estão operando. Sob estas condições é pouco provável que a duração do pulso na deposição de energia inicial desempenhe um papel importante. Por outro lado, existem mecanismos físicos específicos, ultra-

rápidos, como a ablação mediada por plasma, discutida anteriormente, que podem levar a uma nova aplicação em processamento de materiais a laser (56).

Em processos de ablação a laser em regime de pulsos ultracurtos, existem dois mecanismos que podem ser responsáveis pela remoção do material (30): Por vaporização térmica, onde colisões elétron-fônon aumentam a temperatura local acima do ponto de vaporização, e ocorre a remoção do material. Isto ocorre quando se trabalha em condições de alta fluência (bem acima do limiar de ablação) (30). O outro mecanismo é através de explosões por Coulomb, neste caso os elétrons excitados escapam do interior do material e é criado um intenso campo elétrico que puxa os íons para dentro de uma área de impacto, e através dessas interações é promovida a remoção do material. Normalmente ocorrem em condições perto do limiar de ablação do material alvo (30).

Assim, outro aspecto distinto dos pulsos de curta interação, é que o tempo de transferência de energia dos elétrons para os íons por colisões de Coulomb é significativamente menor que picossegundos, sendo assim maior que a duração do pulso. Portanto, os movimentos convencionais hidrodinâmicos não ocorrem durante o tempo de interação de femtossegundos (1).

Além disso, existem duas forças que são responsáveis pela transferência de momento do campo do laser e os elétrons energéticos para os íons na zona de absorção: uma é devida ao campo elétrico da separação da carga e outro é a força ponderomotiva (onde a força ponderomotiva é uma força não-linear que uma partícula carregada experimenta em um campo eletromagnético oscilante heterogêneo) (1). A separação de carga ocorre se a energia absorvida pelos elétrons excede a energia de Fermi, que é aproximadamente a soma da energia ligante e a função trabalho, então o elétron pode escapar do alvo (1). O campo elétrico da separação de cargas tira os íons do alvo. Ao mesmo tempo, a força ponderomotiva do campo do laser na camada atingida empurra os elétrons mais profundos no alvo. Correspondentemente cria-se um mecanismo para aceleração de íons no alvo. Este mecanismo de ablação de materiais por laser com pulso de femtossegundos é totalmente diferente da ablação térmica por pulsos longos. A ablação a laser no regime de femtossegundos é também sensível a dependência temporal e espacial da intensidade do pulso do laser (1).

3 Laser Titânio:Safira

A invenção do laser de femtossegundos de Titânio-Safira (58,59), no início dos anos 90, fez com que os sistemas de lasers de femtossegundos deixassem de ser um complicado e temperamental instrumento que requeria horas de preparação e ajuste, passando a ser um instrumento muito mais confiável e simples de usar (60). A enorme largura de banda do $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$, o fato de ser baseado num meio ativo de estado sólido, e a descoberta dos espelhos com compensação de varredura de frequência (61,62) trouxeram a possibilidade de se obter pulsos menores que 10 fs a uma potência média de mais de 500 mW e taxas de repetição de centenas de MHz.

No laser de Ti:safira o mecanismo da geração do pulso ultra-curto é o efeito de auto-focalização que ocorre no meio laser devido à intensidade dos pulsos propagantes. Este processo de acoplamento de modos foi denominado de “Kerr lens mode-locking”, ou KLM (63). A idéia básica é que as perdas da cavidade são minimizadas quando a intensidade do pulso é maximizada e o efeito KLM se torna mais intenso (60).

Em sistemas de laser de pulsos curtos de alta intensidade, é a intensidade de pico, e não a energia ou a fluência, que causam distorção no pulso ou danos no laser. O laser amplificado através da técnica “Chirped Pulse Amplification” (CPA), portanto, opera um pulso do laser de acordo com suas componentes de frequência, e re-ordena um pulso de intensidade de pico baixa e com tempo maior com a mesma energia. Este pulso alargado pode então ser amplificado com segurança para altas energias, e então subsequentemente reconstituído como um pulso ultracurto de alta potência de pico (55,60). Em seguida apresentamos uma descrição do que acontece durante esse processo e é mostrado na Figura 11.

Na técnica CPA, assim que o pulso sai do oscilador a sua duração é aumentada (e, conseqüentemente, a potência diminuída) por um fator de cerca de dez mil, em um componente do laser chamado *alargador ou alongador*, baseado em redes de difração (onde ocorre dispersão positiva) (55,60). Em seguida, segue-se a amplificação, de forma segura, numa cadeia de amplificadores de potência, onde a energia cresce enquanto as diferentes frequências se mantêm espaçadas. E, finalmente quando se atinge a energia desejada, as frequências são outra vez

sobrepostas, e a duração diminui até próxima da inicial. Este processo tem lugar no elemento chamado *compressor*, que consiste num par de redes de difração, mas com uma dispersão (negativa) oposta à do *alargador*.

Figura 11 - O princípio da amplificação por pulso com varredura em frequência. O pulso originário do laser (L) é primeiro expandido no tempo (S) de comprimentos de onda no vermelho para o azul, e então amplificado (A) e finalmente comprimido para a original duração (C). (55)

A técnica CPA normalmente utilizada para geração de pulsos curtos pode produzir um pulso principal acompanhado de um pré-pulso de nanossegundos ou pedestal que pode ser intenso suficiente para ablacionar o alvo. Portanto, uma importante condição para a realização prática do modo puro de interação femtossegundos deveria ser que a intensidade em algum pré-pulso seja menor que o limiar de ablação ou ionização em regimes de nanossegundos (1).

3.1 Sistema laser utilizado nos experimentos

O sistema de laser utilizado neste trabalho foi um laser de Ti:Safira, pulsado no regime de femtossegundos (Libra-S, Coherent, Santa Clara, CA). O sistema amplificador de laser Libra-S (Figura 12) contém todos os elementos necessários para amplificar pulsos ultracurtos para o nível de mJ. Os elementos que incluem esse sistema são: Um laser semente Vitesse, um laser bombeador Evolution-15, um amplificador regenerativo (AR), alargadores e compressores de pulsos ópticos. Além

disso, o Libra-S é acompanhado de um “Synchronization and Delay Generator” (SDG) que controla o momento preciso e necessário para amplificação regenerativa.

Figura 12 - Sistema laser comercial Ti:Safira (Libra-S, Coherent, Santa Clara, CA).

O Vitesse é o laser semente para o sistema Libra-S. É composto de um laser de diodo bombeador CW e um oscilador Ti:Safira em modo travado operando em uma taxa de repetição de 80 MHz, com comprimento de onda máximo em 800 nm, largura de pulso < 100 fs, e potência de saída > 250 mW. O laser bombeador Evolution-15 é um sistema que contém um laser de Nd:YLF bombeado por um laser de diodo ALGAs. O laser ressonador opera em regime de chaveamento Q por um modulador acústico-óptico em taxas de repetição de 1-10 KHz. O laser “Q-switched” é utilizado para bombear o AR. O SGD controla o tempo preciso das células Pockels no AR. Além disso, o SDG inclui um suplemento de potência de alta velocidade para as células “pockels” e um detector de “bandwidth” (BWD).

O sistema de laser amplificado com chaveamento “Q” nos proporciona trabalhar com uma taxa de repetição de 1 KHz, energia de feixe maior que 1,0 mJ, potência média maior que 1,0 W e centrado em comprimentos de onda máximo de 800 nm, com pulsos de largura temporal inferior a 100 fs (≈ 70 fs). O feixe emitido tem forma de uma Gaussiana.

3.1.1 O modulador “Q-switch” e “mode-locking”

Os dois tipos de estratégias mais utilizadas para obter pulsos curtos e/ou ultracurtos (na escala de nano, pico ou femtossegundos), são designadas por “Q-Switching” e “mode-locking” (63).

O primeiro “Q-Switching”, e como o nome implica, está relacionada com uma comutação rápida do fator-Q da cavidade laser, entre dois valores: um elevado e outro baixo. Refira-se que o fator-Q é um parâmetro matemático relacionado com a realimentação existente na cavidade: um fator-Q elevado significa baixas perdas internas, espelhos bem alinhados, elevada realimentação; um fator-Q baixo significa o oposto. Um modulador de tipo “Q-Switch” é um dispositivo óptico que se coloca no interior da cavidade laser, e que faz variar com muita rapidez as perdas internas na cavidade entre dois valores ou estados: um de perdas baixas (transparente aos fótons em circulação), o outro de perdas elevadas (opaco aos fótons em circulação) (63).

A segunda forma de gerar pulsos curtos é a “mode-locking” (63,64). Esta técnica pode, inclusive, ser utilizada em simultâneo com “Q-switching”. Como “mode-locking” é uma técnica avançada, apenas a referiremos de forma superficial.

“Mode-locking” baseia-se na sincronização de fase dos diversos modos longitudinais em oscilação num laser. Para tal, ocorre uma modulação sinusoidal das perdas na cavidade (apenas como exemplo, uma vez que a modulação poderá ser de outro tipo), em perfeito sincronismo com o tempo que os fótons demoram a percorrer uma distância igual ao dobro do percurso óptico na cavidade (64).

Fótons atrasados ou adiantados em fase são atenuados pelas perdas, fótons em sincronismo de fase mantêm esse sincronismo. O resultado é que após algumas centenas de percursos completos na cavidade, se estabelece um conjunto de modos que oscilam em perfeito sincronismo de fase (64).

“Mode-locking” veio revolucionar as técnicas laser, intervindo de forma decisiva em áreas muito distintas da ciência e tecnologia. Pela primeira vez é possível gerar pulsos de alta potência e duração ultracurta, que podem ser utilizados para excitar e/ou monitorar uma gama vastíssima de fenômenos físicos, em tempo real (64).

3.1.2 Características do feixe gaussiano

Em óptica, um feixe Gaussiano é um feixe de radiação eletromagnética cujo campo eletromagnético transversal e a distribuição de intensidade (irradiância) são ajustados por funções Gaussianas. Vários lasers emitem feixes que se aproximam de um perfil Gaussiano, neste caso o laser opera no modo transversal fundamental, ou modo TEM₀₀, do ressonador óptico do laser (65). Quando refratado por lentes, um feixe Gaussiano é transformado em outro feixe Gaussiano (caracterizado por diferentes parâmetros), que explica que é conveniente e amplamente utilizado em óptica de lasers (64).

A função matemática que descreve o feixe Gaussiano é uma solução para a formal paraxial da equação de Helmholtz. A solução, na forma da função Gaussiana, representa a amplitude complexa do campo elétrico, que se propaga junto com a correspondente do campo magnético como uma onda eletromagnética no feixe (65).

A correspondente distribuição de média temporal da intensidade é:

$$I(r, z) = \frac{|E(r, z)|^2}{2\eta} I \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left(\frac{-2r^2}{w^2(z)} \right) \quad (6)$$

Onde $E(r, z)$ é amplitude do campo elétrico, η é uma característica da impedância do meio em que o feixe esta se propagando, I_0 é a intensidade central do feixe, r é a distância radial a partir do eixo central do feixe, z é a coordenada ao longo da direção de propagação do feixe, $w(z)$ é o raio onde a amplitude do campo e a intensidade caem para $1/e$ e $1/e^2$ de seus valores axiais, respectivamente, e $w_0 = w(0)$ é o tamanho da cintura.

A geometria e o comportamento de um feixe Gaussiano são determinados por configurações dos parâmetros do feixe do laser, que serão definidos a seguir.

O diâmetro do feixe ou largura do feixe de um feixe eletromagnético é o diâmetro ao longo de alguma linha perpendicular ao eixo do feixe e intercepta ele. Uma das formas utilizadas para determinar a largura do feixe é o método do limite da faca ("knife edge") (66).

Figura 13 – Largura do feixe Gaussiano $w(z)$ como uma função da distância axial z . w_0 : cintura do feixe; b : profundidade do foco; z_R : comprimento Rayleigh; Θ : abertura angular total (65)

Para uma propagação do feixe Gaussiano no espaço livre, o tamanho do “spot” tem em um valor mínimo w_0 , em uma determinada posição ao longo do eixo do feixe, conhecida como cintura do feixe. Para um feixe de comprimento de onda λ em uma distância z ao longo do feixe pela cintura do feixe, a variação do tamanho do “spot” é dada por (65)

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (7)$$

Aqui, a origem do eixo-x é definida, sem perda por generalidade, coincidindo com a cintura do feixe, e onde

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (8)$$

é chamado de comprimento Rayleigh. Em uma distância a partir da cintura igual ao comprimento Rayleigh, a largura w do feixe é

$$w(\pm z_R) = w_0 \sqrt{2} \quad (9)$$

A distância ente estes dois pontos é chamado de parâmetro *confocal* ou *profundidade do foco* do feixe b , e dado por

$$w(\pm z_R) = 2z_R = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} \quad (10)$$

$R(z)$ é o raio de curvatura da frente de onda que engloba o feixe. Este valor é obtido, como uma função da posição por

$$R(z) = z \left[1 + \left(\frac{z_R}{z} \right)^2 \right] . \quad (11)$$

O parâmetro $w(z)$ aproxima-se de uma função linear para $z > z_R$. O ângulo entre essas linhas retas e o eixo central do feixe é chamado de divergência do feixe e é dada por

$$\theta = \lambda / \pi w_0, \quad (12)$$

sendo θ em radianos. A abertura angular total do feixe longe da cintura é então dada por:

$$\Theta = 2\theta. \quad (13)$$

Por causa dessa propriedade, um feixe de laser Gaussiano que é focalizado para uma pequena abertura no “spot”, aumentando rapidamente na direção de propagação do feixe, a partir do “spot”.

4 Ablação a laser em materiais homogêneos transparentes

Engenharia de precisão a laser está sendo extensivamente aplicada em indústrias para microfabricação devido a vantagens de ser um processo de perfuração e livre de contato, junto com a disponibilidade de fontes de luz confiáveis e custo do sistema favorável (8).

Interações de pulsos de lasers ultracurtos com materiais vêm atraindo muito interesse desde o advento dos potentes lasers de femtossegundos (67-69). Polímeros assumiram um papel importante para várias aplicações devido às suas propriedades ajustáveis. O PMMA tem sido extensivamente estudado no processamento com lasers de fs (70-74). Em oftalmologia, PMMA é usado para fabricação de componentes ópticos e lentes intraoculares devido à sua biocompatibilidade, entre outras características (71).

Lasers de femtossegundos, operando em energias bem abaixo da energia de “bandgap” do material, permitem o processamento volumétrico para uma limitada profundidade, trabalhando apenas em limites de distância do elemento focal (72). Devido à alta potência de pico esse pulso de laser focalizado pode ser extremamente alto, excedendo o limiar de “breakdown” do material, assim induzindo processos ópticos não lineares tais como absorção multifotônica não-linear (73). Esta excitação não-linear pode levar a processos físicos tais como a avalanche de elétrons, formação de plasma e induzir ondas de choque (74). Consequentemente, materiais que são normalmente transparentes na região do IV, tais como PMMA, podem ser efetivamente ablacionados utilizando lasers com pulsos de femtossegundos de luz IV (73). Em resumo, os benefícios dessa técnica incluem a habilidade lasers de femtossegundos na região do IV, focalizados, induzirem mudanças estruturais localizadas em materiais transparentes pela absorção multifotônica não-linear, minimizando a influência do calor nas proximidades da região. Além da possibilidade de uma alta precisão no processo de microfabricação.

É interessante destacar também, que em sistema com taxa de repetição da ordem de KHz, a região modificada está diretamente relacionada a densidade de plasma originada pela distribuição de intensidade do feixe focalizado (70).

A velocidade do processo de ablação é um fator decisivo na microperfuração, sendo um fator de extrema importância para microcirurgia de tecidos duros e microfabricação de sólidos em geral (75). E o monitoramento da velocidade de ablação progredindo dentro do material não tem sido relatado na literatura. Assim, o principal objetivo desse capítulo foi monitorar a velocidade de ablação em função do tempo, dentro de materiais dielétricos. Além disso, este estudo analisou os mecanismos responsáveis por aberrações causadas nas paredes internas das cavidades ablacionadas. Este estudo pode acrescentar importantes percepções para futuras aplicações.

4.1 Procedimento experimental

O sistema utilizado neste experimento foi um laser Ti:Safira (Libra-S) emitindo pulsos de aproximadamente 70 fs. A energia do pulso foi atenuada por placas de meio onda e o tempo de irradiação foi controlado por um “shutter” mecânico. Realizamos este experimento utilizando amostras homogêneas de PMMA (40 mm x 14 mm x 8 mm), e as seis superfícies das amostras foram polidas. As amostras foram posicionadas em uma mesa móvel x-y-z. O feixe foi direcionado, por espelhos dielétricos de alta refletividade, para uma lente de distância focal 200 mm antes de atingir o alvo. Esta óptica experimental resultou em um feixe de laser Gaussiano com cintura (w_0) de aproximadamente 17 microns. Os pulsos do laser propagavam-se ao longo da direção + z. O alvo transparente (PMMA) foi verticalmente irradiado com dois LEDs (direção x). E foi utilizada uma câmera CCD (acoplada a lentes, para aumentar a imagem) em outro eixo (direção y), acoplado a um computador, onde a sequência de imagens foi obtida. Os LEDs foram utilizados para melhorar a qualidade da imagem e utilizamos filtros e espelhos para bloquear a maioria da luz IV do laser espalhada.

Considerando a Figura 14 temos um diagrama experimental que foi utilizado para medida da progressão da ablação. A Figura 14b mostra o que acontece com a luz incidente dentro do material (alvo).

Figura 14 – Diagrama experimental utilizado para o monitoramento temporal da ablação em a) e esboço representativa do espalhamento de luz dentro da amostra em b).

As amostras de PMMA foram irradiadas com diferentes potências médias na faixa de 0,1 a 1 W ou energia por pulso < 1 mJ, taxa de repetição de 100 ou 1000 Hz e tempos de exposição (10 s para 15 s), em modo focalizado. A superfície das amostras foi posicionada no foco.

No primeiro experimento, a dependência temporal do diâmetro e profundidade dos micro-furos foi verificada na amostra. O experimento consiste na determinação da velocidade de ablação, a partir do monitoramento da progressão do tempo de ablação. A sequência de imagens foi obtida simultaneamente com o processo de ablação do material através de uma câmera CCD. A partir da medida do diâmetro e da profundidade dos microfuros, utilizando em um microscópio óptico acoplado a um micrômetro, obtivemos um valor referencial. E através de uma rotina do Matlab 7.0 os demais valores foram calculados. Em um segundo experimento, as imagens digitais das micro-cavidades foram obtidas utilizando uma câmera CCD acoplada a um microscópio óptico. A partir das imagens analisamos a geometria da micro-cavidade ablacionada.

4.2 Resultados e discussão

Na Figura 15 apresentamos uma sequência de imagens revelando a progressão temporal para os micro-canais durante a ablação. Para este caso, uma energia por pulso de $500 \mu\text{J}$ foi utilizada em uma taxa de repetição de 100 Hz. Para a imagem em $t = 0$, nós observamos que o espalhamento de luz para fora do material (direção z contrária ao feixe de luz proveniente do laser), causado pelo

plasma ejetado. Que é severamente contido após a ablação progredir para dentro do material. Isto representa um exemplo dos dados obtidos.

Figura 15 – Sequência de imagens ópticas obtidas durante o processo de ablação temporal em PMMA (os parâmetros de irradiação foram: taxa de repetição de 100 Hz, energia por pulso de 500 μ J e tempo de irradiação de 10 s).

O gráfico da Figura 16 mostra a dependência do diâmetro como função do tempo, nas posições pré-estabelecidas dentro do material ($z = 1,2; 1,6; 2,0$ mm). Para este específico experimento a energia por pulso também foi de 400 μ J para uma taxa de repetição de 100 Hz. Para todas as posições um aumento do diâmetro ablacionado com o passar do tempo foi observado. É interessante observar que para regiões mais profundas ($z = 2,0$ mm) o crescimento do diâmetro com o tempo é maior do que quando comparado com profundidade perto da superfície. Este efeito é conhecido como “efeito barril”. O feixe proveniente do laser é blindado pelo plasma formado dentro do material, levando a um desvio da trajetória do feixe e consequentemente a um aumento do volume ablacionado naquela região. Contudo, é interessante notar que em maiores tempo o regime de afunilamento se restabelece, onde para posição longe da superfície (z_0) os diâmetros finais são menores que os iniciais, mostrando um perfil de geometria cônica.

Figura 16 – Gráfico da dependência do diâmetro ablaçado como uma função do tempo nas posições pré-estabelecidas dentro do material ($z = 1,2; 1,6; 2,0$ mm). Os parâmetros de irradiação foram: taxa de repetição de 100 Hz e energia por pulso de 400 μ J.

A dependência da profundidade de ablação como função do tempo é mostrada na Figura 17a. Neste experimento a potência média de 53 mW foi utilizada em uma taxa de repetição de 100 Hz. Isto corresponde a uma energia por pulso de 530 μ J. A partir destes dados determinamos a velocidade de ablação progredindo dentro do material como uma função do tempo de irradiação (Figura 17b).

A velocidade de ablação aumenta nos primeiros instantes e, em torno de 2,5 s, o seu valor máximo é encontrado. Após esse período de tempo, a velocidade de ablação em função do tempo se mantém praticamente constante durante o tempo de irradiação restante. Contudo se aumentássemos o tempo de irradiação, é provável que em certo instante a velocidade de ablação diminuiria tendendo a zero. Isto deveria ocorrer quando o material tende a não ser mais removido na direção z , devido a limitações das características do foco da lente e dos parâmetros do laser utilizados neste experimento.

Figura 17 – Gráfico da dependência da profundidade ablacionada como uma função do tempo de irradiação, para uma taxa de repetição de 100 Hz a). E a dependência da velocidade de ablação como uma função do tempo em b).

Na Figura 18a nós mostramos a dependência da profundidade de ablação como uma função do tempo para uma potência média de 165 mW e uma taxa de repetição de 1 KHz. A correspondente velocidade de ablação dentro no material como uma função do tempo de irradiação é apresentada na Figura 18b. Quando aumentamos a potência e a taxa de repetição, o comportamento é completamente diferente. A profundidade de ablação aumenta tendendo para um valor máximo de aproximadamente 2,5 mm. Isto ocorre devido a limitações do foco do feixe gaussiano utilizado nesse experimento. Nosso feixe tem um comprimento Rayleigh de 1,1 mm calculado a partir de dados da cintura do feixe ($w_0 = 17 \mu\text{m}$). Além disso, lasers de femtossegundos permitem o processamento volumétrico para uma profundidade limitada pela distância de trabalho do elemento focalizador (73). Na Figura 18b, nós observamos que a velocidade de ablação diminui exponencialmente com o passar do tempo, tendendo a zero. Enquanto nos primeiros instantes a

ablação velocidade diminui, em torno de 2,5 s a profundidade máxima é encontrada e a velocidade tende para zero. Neste caso, o efeito de blindagem é um dos responsáveis pela diminuição da velocidade de progressão. Pois, para longos tempos de irradiação, temos um acúmulo de pulsos do laser, e consequentemente leva a um aumento da temperatura do plasma e de material ejetado. Um segundo efeito contribuinte para essa desaceleração da velocidade de ablação é a desfocalização do laser para regiões mais profundas. Assim, fora dessa região focal, mecanismos como ondas de choque são os maiores responsáveis pela cavitação do material, diminuindo a eficiência da ablação. A ocorrência de absorção não linear e outras características ópticos-mecânicos do material também podem ser levados em conta. Estes efeitos devem influenciar o limiar de ablação e a profundidade dos microfuros.

Figura 18 – Gráfico da dependência da profundidade ablacionada como uma função do tempo de irradiação, para uma taxa de repetição de 1000 Hz a). E a dependência da velocidade de ablação como uma função do tempo em b).

Na Figura 19 apresentamos os gráficos do comportamento da profundidade máxima de ablação a) e do diâmetro da superfície ablacionada b), respectivamente, quando variamos a potência média (ou fluência do laser), quando irradiamos a superfície das amostras de PMMA utilizando um laser de femtossegundos em uma taxa de repetição de 1 KHz. Enquanto a profundidade satura em maiores potências (Figura 19a), o diâmetro (Figura 19b) mostra um crescimento contínuo com a potência média. Esta é uma indicação da limitação presente na progressão longitudinal que não está presente na superfície.

Figura 19 – Gráfico do comportamento da profundidade a) e diâmetro na superfície b) da cavidade ablacionada, como uma função da potência média, quando amostras de PMMA foram irradiadas utilizando uma taxa de repetição de 1 KHz e tempo de irradiação 10s.

Alterando a posição do foco o máximo da profundidade e o mínimo do diâmetro na superfície é mostrado na Figura 20a e 20b. Enquanto o feixe incidente esta convergindo ou divergindo na amostra, diferente profundidade de ablação é obtida, como esperado. Contudo, é interessante o comportamento assimétrico do diâmetro da superfície ablacionada nas proximidades do foco. O comportamento (figura 20b) sugere que mais fatores, além da geometria do feixe, devem ser levados em conta durante o processo de ablação. Um dos fatores responsáveis por esta assimetria é a formação de plasma no ar, pois estamos trabalhando com densidades de potência da ordem de 10^{14} W/cm², assim menos energia é entregue ao PMMA, levando a diminuição da profundidade ablacionada após o foco.

Figura 20 – Gráfico do comportamento da profundidade a) e diâmetro na superfície b) da cavidade ablacionada, como uma função da posição focal do alvo, quando amostras de PMMA foram irradiadas

A micrografia resultante do perfil de uma micro-cavidade ablacionada com laser de femtossegundos em PMMA é mostrada na Figura 21. Os parâmetros de irradiação foram 330 mW de potência média, 1 KHz de taxa de repetição e 10 s de tempo de irradiação.

O PMMA pode apresentar, aleatoriamente, defeitos na sua microestrutura. Esses defeitos associados aos efeitos de atenuação durante o percurso que o feixe do laser vai percorrendo dentro do material e podem mudar o tipo de mecanismo de interação, gerando calor e subprodutos, como os vapores, ao longo da microcavidades.

Figura 21 – Imagens das micro-cavidades resultante da ablação laser em PMMA, utilizando pulsos de 70 fs, com potência média de 330 mW (330 μ J), taxa de repetição de 1 KHz e tempo de irradiação de 10 s, sendo o o diâmetro da superfície em “a” e o perfil da cavidade mostrado em “b”.

A partir da figura 5 do artigo de Canestri (76), é possível fazer uma analogia com o que pode ter ocorrido no perfil da cavidade da Figura 21. O calor da pluma de ablação pode ser responsável pela alteração do formato da cavidade, que neste caso, de acordo com observado na amostra de PMMA, Figura 21, não possui um formato perfeitamente cônico. A curvatura no interior da cavidade ocorreu no lado oposto da irregularidade superficial do material. Este fato pode ser explicado devido a processos de turbulência do fluido no interior da cavidade que deslocaria lateralmente o vapor quente do material ablacionado durante sua saída, promovendo na região mediana, uma deposição do material ablacionado. Então, a deposição ocorrendo lateralmente nas paredes da cavidade, promoveria um aumento da turbulência interna, e com isso resultaria na formação de uma curvatura da cavidade (Figura 5.a (76)). Atenuação da pluma durante a entrada do feixe do laser, trajetória de escape da fumaça gerada pelo calor, fenômenos de interferência interna do feixe, blindagem por plasma, mudanças micro-estruturais do meio e, talvez a combinação desses fatores possa explicar esse fenômeno.

5 Perfil da ablação a laser no regime de femtossegundos através de uma interface

Ablação promovida por lasers de pulsos ultracurtos operando em regime de femtossegundos é um novo e relevante campo para o processamento de materiais (11).

Para o tratamento de dentes utilizando lasers, um atrativo campo de estudo é a interação seletiva com materiais e tecidos. Exemplo da aplicação de lasers é a remoção seletiva de materiais restaurativos odontológicos ou de cáries dentais requerendo uma preparação cavitária visando a preservação do tecido sadio (77,78). Existem, contudo, várias questões para serem levadas em consideração a respeito da dinâmica de propagação dos volumes ablacionados dentro dos materiais.

Convencionalmente, a maioria dos estudos existentes de ablação a laser em materiais duros estão limitados a análise de superfícies das áreas irradiadas (11). A progressão espacial da ablação dentro do material “bulk” não tem sido completamente investigada, embora esta informação seja relevante para várias situações (por exemplo, na odontologia e em cirurgias). A dinâmica da progressão da ablação pode impor limitações em certas aplicações. Tecidos biológicos duros, como dentes e ossos, apresentam interfaces separando regiões com diferentes propriedades (11), que podem responder diferentemente durante a interação laser-material.

Neste capítulo investigamos o comportamento da ablação ao cruzar uma superfície com dois materiais, e propomos um método alternativo para quantificar a progressão da ablação, especialmente perto de uma interface entre os dois materiais distintos. Nós utilizamos um método que correlaciona propriedades de ablação dos materiais na superfície livre e dentro do “bulk” do material. A aplicação desse método permite prever a ocorrência de uma descontinuidade da geometria da ablação na interface entre os dois meios. Pelo nosso conhecimento, a análise deste fenômeno de ablação na interface entre dois materiais não tem sido investigado, e isto motivou nossa pesquisa. Neste estudo, o método é aplicado para o entendimento de variações na geometria de ablação que ocorrem na interface de materiais restaurativos dentais, e pode, em princípio, ser aplicado em distintos

materiais, ou mesmo em estruturas de multicamadas de materiais. Primeiramente apresentaremos o sistema utilizado e a metodologia, seguida dos resultados combinados com a discussão. No final relatamos o impacto do estudo.

5.1 Procedimento experimental

O sistema utilizado neste experimento foi um laser Ti:Safira (Libra-S) emitindo pulsos de aproximadamente 70 fs. O feixe foi direcionado, por espelhos dielétricos de alta refletividade, para uma lente de distância focal 200 mm antes de atingir o alvo. O arranjo óptico experimental resultou em um feixe de laser Gaussiano com cintura (w_0) de aproximadamente 17 μm .

Nós realizamos o experimentos utilizando amostras comerciais de resinas restauradoras odontológicas Z-250 (3M/USA), resina A, e uma resina manipulada composta de Bisfenol A-glicidil metacrilato (Bis-GMA) (60 % em peso), trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA) (30% em peso) e uretanodimetacrilato (UDMA) (10% em peso) com canforoquinona e amina, resina B. As amostras de resinas foram inseridas em um molde de metal com formato cilíndrico e um diâmetro de 8 mm por 1 mm e 2 mm de altura. A foto-polimerização foi realizada utilizando um LED azul (MM Optics, São Carlos, Brasil) por 40 s de foto-ativação para a resina A e 20 s para a Resina B (seguindo as instruções do manual).

Nós preparamos individualmente as amostras de resinas, assim como, amostras com resinas intercaladas; 1 mm de resina A e 1 mm de resina B.

As amostras de resinas forma irradiadas com diferentes potências médias (entre 0 – 1 W), taxa de repetição de 1 KHz e tempos de exposição (10 s e 15 s), no modo focalizado como indicado na Figura 22.

Figure 22 – Diagrama representativo de uma amostra localizada no foco do feixe Gaussiano (11).

Primeiramente, para cada resina (A e B), nós investigamos o diâmetro da superfície ablacionada como uma função da intensidade e um tempo de irradiação, fixado em 15 s. Em uma segunda etapa, preparamos uma amostra composta de duas resinas, resultando em um material com duas camadas e consequentemente uma interface. Após a irradiação com o laser de femtossegundos, as amostras foram longitudinalmente polidas com lixas, permitindo a observação da região ablacionada e o seu perfil ao longo dos materiais. Um microscópio óptico foi utilizado para a determinação do diâmetro e da profundidade da microcavidade criada. Como resultado, o perfil da microcavidade ablacionada foi determinado. Este corresponde à progressão da ablação a laser ao longo da profundidade do material, ou seja, na direção da propagação da luz dentro do material. Imagens digitais das microcavidades foram obtidas utilizando uma câmera CCD acoplada a um microscópio óptico. Para cada posição ablacionada foi associado um diâmetro com uma intensidade, e a análise realizada para cada posição-z com uma superfície livre (interface ar/resina) utilizando os dados do experimento prévio. A intensidade obtida desta forma foi chamada “intensidade efetiva”. O perfil desta “intensidade efetiva” pode ser obtido a partir da superfície, passando através da interface.

5.2 Resultados e Discussão

O perfil típico esperado para uma cavidade ablacionada é de geometria cônica (78). O diâmetro diminui em função da posição z (profundidade), e esta geometria depende das características da interação laser-material. O perfil de ablação obtido no material com dupla camada é mostrado na Figura 23. Uma

abrupta variação do diâmetro na interface pode ser observada na Figura 23a e os detalhes na Figura 23b. Essa variação abrupta do diâmetro da cavidade pode ser vista também na interface entre uma resina odontológica e um material transparente (PMMA), porém não apresentaremos aqui. A variação do diâmetro como uma função da profundidade é apresentada na Figura 24.

Figura 23 – Imagem do perfil da cavidade ablacionada para uma amostra composta de uma interface resina A/resina B (11). Parâmetros de irradiação: Taxa de repetição de 1 KHz, potência média de 780 mW e tempo de irradiação de 10 s.

Figura 24 – Diâmetro ablacionado como uma função da profundidade para uma amostra composta de dois diferentes resinas após irradiado com laser operando com taxa de repetição de 1KHz, potência média de 640 mW e um tempo de irradiação de 15 s.

Com o objetivo de analisar a abrupta variação do diâmetro ablacionado perto da interface entre dois materiais, é conveniente introduzir um método que possa prever a geometria da ablação, correlacionando a ablação e as propriedades básicas da interação laser-material. O primeiro ponto para ser considerado é o fato que o feixe Gaussiano focalizado em uma superfície deve estar desfocalizado dentro do material, resultando em menores intensidades durante o processo de ablação. Isto leva à diminuição do diâmetro ablacionado no interior do material.

Começamos considerando a equação da intensidade para um feixe de perfil Gaussiano,

$$I(r, z) = I_0(z) e^{-2r^2/w^2(z)}, \quad (14)$$

Onde I é a intensidade para cada posição, I_0 é a intensidade do pico do feixe, r é a coordenada radial e z é a coordenada ao longo da direção de propagação do feixe. $w(z)$ é a cintura do feixe Gaussiano, onde $w(z)$ varia ao longo da direção de propagação e é dada por uma equação bem conhecida (77). Em termos da potência incidente (P_0), $I(r, z)$ pode ser escrito como,

$$I(r, z) = \frac{2P_0}{\pi w^2(z)} e^{-2r^2/w^2(z)}, \quad (15)$$

com $w_0 = 0,017$ mm (determinado pelo método de varredura “knife-edge” para um feixe Gaussiano (65)) e $z_R = 1,1$ mm (comprimento Rayleigh). Estes valores caracterizam o feixe Gaussiano utilizado em nosso experimento, e ainda a intensidade ao longo da direção z quando o feixe não interage com o sólido.

A divergência do feixe e a correlação com o perfil de ablação podem ser quantificadas. Para um tempo de irradiação fixo existe uma mínima intensidade para a ablação (limiar de intensidade, I_{th}), sendo que abaixo deste a ablação não é observada e acima ocorre ablação. Neste sentido, a intensidade mínima necessária para a ablação do material pode ser determinada assumindo $I_{th} = I(r = R, z)$, onde R é o raio do feixe para cada posição. Removendo I_{th} , a partir desta equação nós obtemos, assumindo que o feixe do laser não é afetado, o raio do feixe, expresso em termos das características do feixe Gaussiano.

Assim, a geometria observada na figura 23, não pode ser explicada, apenas baseada na possível divergência do feixe, quando empregando um feixe Gaussiano (Figura 22).

Para aplicar esse método, primeiramente é feita a correlação entre os diâmetros da superfície livre ablacionada, que é obtida quando o laser é focalizado na superfície dos individuais materiais. O resultado desta medida para as duas diferentes resinas são mostrados na Figura 25.

Figura 25 – Diâmetro da superfície ablacionada como uma função da intensidade média aplicada na superfície para a resina A e para a resina B.

O gráfico da Figura 25 apresenta os resultados da microcavidade ablacionada, correlacionando a intensidade do laser (I_0) com o diâmetro ablacionado na superfície do material. Para distâncias $z \leq z_R$, que é o caso na superfície, nós podemos assumir que $w(z) \approx w_0$. Nós podemos associar para posição da profundidade de ablação, uma “intensidade local” que induziu o diâmetro de ablação, como observado na superfície. O resultado final é um gráfico da “intensidade efetiva” como uma função da profundidade (Figura 26).

A descontinuidade do diâmetro, indicada na Figura 24, corresponde à interface real entre dois materiais. A descontinuidade no diâmetro é observada em torno de $z = 1,1 \text{ mm}$, onde a interface resina A/resina B é localizada. Baseado em dados experimentais do perfil de ablação da microcavidade e a intensidade do laser na posição $z = 0$ (Figura 24), a intensidade efetiva para cada posição z pode ser determinada.

Figura 26 - Gráfico da “intensidade efetiva” como uma função da profundidade para a amostra composta resina A/resina B.

A Figura 26 mostra o comportamento da inferida “intensidade efetiva” como uma função da profundidade para a amostra composta resina A/resina B. O gráfico mostra a diminuição da intensidade efetiva ao longo da profundidade de ablação, como um resultado do progresso da ablação. A “intensidade efetiva” (Figura 26) apresenta um comportamento suave na região da interface. A variação no diâmetro da região ablacionada como uma função da profundidade da cavidade acontece essencialmente a partir de um mecanismo, que causa uma atenuação da intensidade efetiva, como uma consequência de uma série de efeitos complexos. Mecanismos como o produto da ablação blindam as ações seguintes dos consecutivos pulsos do feixe do laser, e alguns outros mecanismos são somados quando tratamos de uma intensidade efetiva (11).

As resinas utilizadas neste estudo não são transparente em $\lambda = 800 \text{ nm}$. De fato, nós medimos o coeficiente de atenuação $\alpha = 15 \text{ cm}^{-1}$ (resina A) e $\alpha = 2 \text{ cm}^{-1}$ (resina B). Se os materiais fossem transparentes, nós deveríamos considerar principalmente uma absorção multifotônica, e uma diferente análise para atenuação da “intensidade efetiva” seria realizada. O principal aspecto de nossa metodologia está baseado no fato que nós não necessitamos referir aos atuais mecanismos

envolvidos, já que eles influenciam a intensidade efetiva, que pode ser extraída a partir de dados da ablação na superfície.

A intensidade local efetiva basicamente permanece a mesma na interface, mas causa diferentes efeitos em cada material. Isto significa que a variação da geometria no material ablacionado é determinada pela variação do limiar de ablação dos materiais. O valor encontrado para a resina A foi $0,25 \text{ J/cm}^2$ e para resina B foi $0,05 \text{ J/cm}^2$.

Na Figura 26, também observamos que o efetivo decaimento ao longo da penetração é específico para cada material, caracterizando as diferenças no coeficiente de absorção de cada material.

Quando o feixe do laser proveniente de um material entra em outro com diferentes propriedades de ablação, uma série de interações acontece na interface. Contudo, a mudança do índice de refração em um feixe Gaussiano implica em um deslocamento do plano focal na direção do feixe incidente (z ou $-z$), consequentemente a cintura do feixe nesta posição também muda, mas isto não afeta a análise da intensidade efetiva.

Observamos que o processo de ablação mostrou um interessante comportamento quando inicia em uma superfície (resina A), e progride dentro do material e alcança a resina B. Uma razão para essa descontinuidade do diâmetro são os diferentes limiares de ablação dos materiais. Quando utilizamos informações da Figura 24 e Figura 26 nós observamos que o gráfico da Figura 25 contém informações suficientes para prever a descontinuidade do diâmetro de ablação que ocorre na interface de dois diferentes materiais. Os resultados são completamente consistentes com as observações. Estudos mais detalhados do processo de ablação na interface entre dois materiais são necessários, em ordem a melhorar o entendimento desse fenômeno, e apoiar a aplicação de lasers de femtossegundos em camadas material/tecidos. Nosso trabalho mostrou que uma análise baseada na intensidade efetiva deve ser bastante útil.

6 Aspectos morfológicos e quantitativos de tecidos biológicos duros e resinas restauradoras odontológicas

Vários sistemas lasers utilizados para remoção e preparo dos tecidos dentais duros e ossos, estão comumente sob intensa investigação, e para alguns destes, procedimentos já estão em uso clínico (80-82). O laser, como instrumento substituto dos aparatos mecânicos em muitas aplicações em tecidos duros, é ainda fortemente debatido (83). Uma das maiores limitações é a lenta taxa de remoção de material, e, em muitos casos, os inaceitáveis danos colaterais usualmente causados pelo sobreaquecimento.

Altas densidades de potência (intensidade ou irradiância) podem promover a ablação induzida por plasma, resultando numa remoção mais precisa e com limites bem definidos. Os pulsos ultracurtos têm sido certamente uma opção, e muitas das aplicações dos pulsos em regime de femtossegundos estão atualmente sob investigação (2,11,77,78).

A ablação dos tecidos duros no regime de femtossegundos está ainda nos seus estágios iniciais de entendimento. Enquanto comparações dos aspectos morfológicos empregando pulsos em micro, nano e picossegundos tem sido amplamente estudadas, não existem ainda detalhes minuciosos e adequados dos aspectos morfológicos resultantes da ablação no regime de femtossegundos (77).

A proposta desse estudo é apresentar interessantes aspectos sobre a ablação a laser de tecidos biológicos duros e resinas restauradoras odontológicas: morfologia, ablação seletiva e controlada. Neste capítulo começaremos com uma descrição do procedimento experimental utilizado para cada material. Em seguida, entraremos em uma discussão do limiar de ablação para tecidos ósseos e seu aspecto morfológico, depois de irradiado com laser de femtossegundos. Também apresentaremos uma comparação dos aspectos morfológicos, após a micro-perfuração, em esmalte e dentina humana. Por fim, um estudo comparativo das mudanças morfológicas, em resinas odontológicas, quando utilizados laser com diferente largura de pulsos, nanossegundos e femtossegundos.

6.1 Procedimentos experimentais

6.1.1 Tecidos ósseos duros

O osso é um material muito heterogêneo e geralmente tem duas diferentes porções: a parte externa mais densa (cortical) e a interna mais mole (estrutura porosa). Estruturalmente, o osso cortical é composto de 70% de material inorgânico e 30% proteína. A maior porção do mineral inorgânico é composta de hidroxiapatita (OHAP) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, enquanto que a proteína é essencialmente a matriz colágeno entrelaçada entre cristais de apatita (OHAP). Por causa desses diferentes componentes, o osso tem um amplo espectro de absorção no IV, com três principais regiões de absorção: água em 3 μm , proteína ligadas em 6-8 μm e fosfato de cálcio em 10 μm (84).

Neste estudo foram utilizados pedaços de fêmur bovino com dimensão de 10 mm x 5 mm x 2,0 mm. Os corpos de prova foram incluídos em resina de poliéster, para que a superfície das amostras pudesse ficar rigorosamente perpendicular ao feixe do laser. As amostras foram desgastadas, utilizando-se lixas d'água com granulação decrescente, até obter uma superfície plana e homogênea.

Foi utilizado o sistema laser de femtossegundos de Ti:Safira, Libra-S, como descrito anteriormente. A energia do pulso foi atenuada por lâminas meio de onda e o tempo de irradiação foi controlado por um “shutter” mecânico. As amostras foram posicionadas em um aparato móvel x-y-z. O feixe foi direcionado, por espelhos dielétricos de alta refletividade, para uma lente de distância focal 200 mm antes de atingir o alvo. O laser operou sem nenhum sistema de resfriamento adicional.

As amostras foram irradiadas com diferentes níveis de energia ($< 1 \text{ mJ}$), com o laser operando em modo de “pulso único” ou com taxa de repetição entre 10-1000 Hz, para um tempo de irradiação de 1 s.

Após a ablação, os corpos de prova foram preparados e levados para o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), como descrito a baixo, para a avaliação das variações morfológicas do tecido irradiado.

As amostras foram desidratadas em crescente graduação alcoólica. Foram levadas em soluções de álcool etílico a 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e

100% (álcool absoluto). Após essa etapa, as amostras foram então levadas a uma estufa a 37°C onde permaneceram por 12 horas. Por fim, as amostras foram metalizadas recebendo uma camada de ouro. O intuito desse procedimento é o de produzir condutividade elétrica, dando vazão aos elétrons provenientes do feixe do microscópio, melhorando a resolução das imagens. As amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (LEO 440, 10 kV e 100 pA) e as imagens foram obtidas.

O limiar de ablação é definido neste experimento como a fluência mínima necessária para modificar e/ou ablacionar a superfície do tecido. O limiar de ablação foi determinado a partir das micrografias obtidas no MEV e será discutido no item 6.2.1.1.

6.1.2 Tecidos dentais duros (esmalte e dentina)

Esmalte é o tecido que reveste e protege a coroa do dente. É extremamente duro, pois é o tecido mais mineralizado encontrado no organismo **(85)**. É avascular, branco, cinza, azulado ou amarelo devido à dentina subjacente. Tem espessura máxima de 2 a 3 mm. Do ponto de vista estrutural, apresenta uma massa compacta de cristais de apatita com um padrão altamente organizado e orientado. A unidade básica do esmalte é o prisma ou bastão. Cada prisma é formado por quatro ameloblastos, que são células epiteliais cilíndricas localizadas na camada mais interna do órgão do esmalte. Por ser extremamente duro e quebradiço, o esmalte necessita de camada sob ele, a dentina, que funciona como amortecedor. Do ponto de vista estrutural químico, ele é composto por material inorgânico: 96% de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita, e 4% de material orgânico e água (85).

Dentina é a substância localizada entre o esmalte (que se encontra situado na coroa), ou cemento (que se encontra na raiz) em um dente, e a cavidade pulpar. É um tecido conjuntivo avascular mineralizado. Sua superfície interna delimita a cavidade pulpar onde se aloja a polpa dentária. Por ser um tecido vivo, contém prolongamentos de células especializadas e substância intercelular. A formação da dentina ocorre pela dentificação. A dentina é composta de materiais inorgânicos (70%), orgânicos (20%) e água (10%). A porção inorgânica consiste de sais minerais

sob a forma de cristais de hidroxiapatita. Cada cristal é composto por vários milhares de unidades e cada unidade básica fundamental tem como fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Contem também pequenas quantidades de fosfatos, carbonatos e sulfatos, além de elementos como F, Cu, Zn, Fe e outros. A porção orgânica consta de fibras colágenas (17%), dispostas em pequenos feixes ao redor e entre os prolongamentos odontoblásticos. Estas fibras são unidas e cimentadas pela substância amorfa de natureza glicoproteica (lipídios, glicosaminoglicanas e compostos protéicos). Os odontoblastos são as células responsáveis pela formação orgânica da dentina, que consiste em tecido colagenoso. Do ponto de vista estrutural físico a dentina é um tecido muito duro, mais que o osso e o cimento, embora seja mais mole e, portanto mais radiolúcida do que o esmalte. Apresenta considerável elasticidade, devido ao arranjo em rede das suas fibras colágenas, cedendo mediante pressões, e com isso, amortece as forças mastigatórias impostas sobre o esmalte, impedindo que o mesmo se fracture. A dentina é canalicular, e, portanto permeável; substâncias podem penetrar através dos canalículos e atingir a polpa (86).

Foram utilizados 12 dentes humanos (3º molar), recém-extraídos, por indicação ortodôntica. Os dentes humanos foram coletados junto ao Nilo, com autorização do Comitê de Ética em Odontologia (nº do protocolo: 13/08) da UNESP (Campus de Araraquara - Faculdade de Odontologia).

Todos os dentes foram incluídos em resina de poliéster, para que a superfície dos dentes pudesse ficar rigorosamente perpendicular ao feixe do laser. As amostras foram desgastadas, em uma politriz, utilizando-se lixas d'água com granulação decrescente, até expor o esmalte (6 dentes) e/ou a dentina (6 dentes).

O laser e a montagem experimental são os mesmos descritos para tecidos ósseos.

As amostras foram irradiadas com diferentes energias por pulso ($< 1 \text{ mJ}$) e tempos de irradiação tanto para dentina, quanto para o esmalte. O laser operou em modo de “único pulso” ou com taxa de repetição entre 10-1000 Hz.

Os corpos de prova foram preparados e levados para o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), como descrito anteriormente, para a avaliação das variações morfológicas do tecido irradiado.

6.1.3 Resinas restauradoras odontológicas

O experimento foi realizado utilizando amostras comerciais de resina dental restauradora Z-250 (3M/USA), e outras diferentes resinas manipuladas compostas por Bis-GMA, TEGDMA e UDMA. As amostras de resina foram inseridas em moldes de metal com formato cilíndricos e diâmetro de 8 mm por 1 mm e/ou 2 mm de altura. A fotopolimerização foi realizada utilizando um LED azul (MM Optics, São Carlos, Brasil) durante 40 ou 20 s de fotoativação para as correspondentes resinas (seguindo as instruções do fabricante).

O sistema e a montagem experimental para irradiação com o laser de femtossegundos é a mesma já descrita para os tecidos biológicos. As amostras foram irradiadas com diferentes níveis de energia (< 1 mJ) com o laser de femtossegundos operando com taxa de repetição entre 100-1000 Hz. Porém neste experimento fizemos um estudo comparativo utilizando um laser de nanossegundos de Nd:YAG, com largura de pulso de aproximadamente 10 ns, em um comprimento de onda centrado em 532 nm e com taxa de repetição de 10 Hz. Nós utilizamos níveis de energia por pulso de 2,7 a 9,1 mJ. Utilizamos uma lente de distância focal de 200 mm, em ambos os sistemas. A cintura do feixe w_0 estimada é 5 μm .

Os corpos de prova foram levados a um microscópio óptico e as imagens das micro-cavidades foram obtidas. E em seguida foram preparados e levados para o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), como descrito anteriormente (menos o processo de desidratação), para a avaliação das variações morfológicas do tecido irradiado.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Tecidos ósseos

Neste tópico, nos concentraremos no possível uso do sistema laser de femtossegundos em sua capacidade de cortar ossos para aplicações cirúrgicas.

Este tem potencialmente várias vantagens sobre instrumentos mecânicos. A vibração mecânica pode reduzir a precisão cirúrgica (85), e as trajetórias rotacionais sobre o tecido podem levar a danos colaterais. Assim, por exemplo, alguns procedimentos otológicos envolvendo o corte de pequenas estruturas poderiam ser realizados mais facilmente, como os processos ósseos que envolvem o complexo craniofacial, onde delicados nervos e vasos sanguíneos estão presentes, também deveriam ser beneficiados pelo aumento da precisão (2). Além desses casos, existe uma doença comum ocorrendo principalmente em pacientes idosos que é conhecida como osteoartrite (5). Este tipo de doença é mais provável afetar as juntas do joelho. Apesar da avançada tecnologia das próteses propriamente ditas, os procedimentos para cortar o osso do joelho e de implantar a prótese permanecem rudimentares (5).

6.2.1.1 Determinação do limiar de ablação em tecidos ósseos

As vantagens da microcirurgia com laser de femtossegundos, incluindo alta precisão estrutural e uma pequena zona termicamente afetada, podem ser mais efetivamente obtidas durante a micro-fabricação perto das condições do limiar de ablação, ou seja, utilizando uma fluência mínima necessária para que ocorra o processo de ablação do material. Para determinar as condições limiares de ablação (88) dos tecidos biológicos duros, tanto ablação com simples, quanto com múltiplos pulsos foram conduzidas em vários regimes de fluência do laser. Para uma precisa determinação quantitativa do limiar de fluência, o diâmetro do feixe do laser na superfície do alvo e a energia do pulso do laser precisam ser conhecidos. Para um feixe de laser Gaussiano, a variação espacial da fluência do laser pode ser representada por (89):

$$F(r) = F_0 \exp\left(\frac{-2r^2}{w_0^2}\right), \quad F_0 = \frac{2E_p}{\pi w_0^2}, \quad (16)$$

onde r representa a distância a partir do centro do feixe, w_0 é a cintura do feixe, ou seja, o raio do feixe do laser na superfície do alvo que corresponde a largura do feixe no $1/e^2$ do pico de fluência F_0 , e E_p é a energia do pulso do laser incidente.

Quando o limiar da fluência do laser é denotado de F_{th} , o raio (r_a) ou diâmetro (D) da cavidade de ablação, pode ser escrito em termos da fluência de pico como (89,90):

$$D^2 = 2w_0^2 \ln (F_0/F_{th}) \quad (17)$$

Para aplicar a eq. (2) na determinação do raio do “spot” do laser w_0 , medidas precisas do diâmetro são necessárias, especialmente quando consideramos a típica assimetria das cavidades. Para estas medidas, a forma das cavidades foi aproximada como circular, assim como a imagem de MEV, apesar das cavidades reais não serem perfeitamente circulares.

A Figura 27 mostra a medida do diâmetro da cavidade elevado ao quadrado, como função da fluência de pico do laser, em escala semi-logarítmica. Este gráfico permite estimar o raio do feixe do laser a partir da inclinação das retas obtidas pelo ajuste dos dados das fluências. O raio do “spot” do laser foi estimado como sendo $45 \pm 1 \mu\text{m}$ e $44 \pm 1,6 \mu\text{m}$ para as amostras irradiadas com 1 KHz e 100 Hz, respectivamente. Para 10 Hz e “pulso único” o raio do “spot” foi estimado como sendo $51 \pm 5,9 \mu\text{m}$ e $35 \pm 2,6 \mu\text{m}$, respectivamente. A diferença no raio do “spot” do laser entre os experimentos é entendida como sendo devida ao posicionamento incorreto (impreciso) que ocorreu durante a instalação e a remoção do alvo. E pode ser devido à variação do perfil do feixe Gaussiano, influenciado pela mudança da taxa de repetição do sistema.

Figura 27 – Gráficos do diâmetro quadrado das cavidades *versus* fluência, quando irradiamos osso com em laser de femtossegundos para, a) $N = 1000$ pulsos, b) $N = 100$, c) $N = 10$ e d) $N = 1$ pulso.

A partir dos gráficos da Figura 27, o limiar da fluência de ablação F_{th} foi determinado localizando o valor da fluência onde a linha de ajuste intercepta o eixo x. Para um pulso, 10, 100 e 1000 pulsos os valores obtidos do limiar de fluência foram 1,06, 0,59, 0,27 e 0,23 J/cm^2 , respectivamente. Esse método para determinar o limiar de ablação é usualmente aplicado em vários materiais, como em cerâmicas (90), dielétricos (91) e tecidos dentais duros (92). Existem outros métodos geométricos que também são utilizados para determinação do limiar de dano da ablação, como o sugerido por R. E. Samad e N. D. Vieira, Jr (93). Este consiste na formação de um perfil de dano superficial por um movimento da amostra atravessando o foco do laser. Uma simples medida da máxima dimensão transversal deste perfil de dano, que depende somente da potência do feixe do laser, é utilizada para calcular o limiar de intensidade local. Girard e colaboradores determinaram o limiar de ablação para tecidos cardeais ósseos com sendo 0,69 J/cm^2 , através de inspeção direta das imagens de MEV (2). O valor encontrado pelo autor foi maior do

que o deste trabalho ($0,23 \text{ J/cm}^2$), ambos trabalhando com uma taxa de repetição 1 KHz, porém ele utilizou uma largura do pulso de 200 fs.

Figura 28 – Gráficos do limiar de fluência versus número de pulsos para tecidos ósseos.

Efeitos de incubação, como a diminuição do limiar de fluência de ablação com múltiplos pulsos (90), a partir da ablação com simples pulso, foi observado na ablação desses tecidos, e mostrado na Figura 28, onde o limiar de fluência diminui continuamente quando o número **N** de pulsos é aumentado de 1 para 10, 100, ou 1000. Este limiar reduzido durante a ablação acumulativa ($F_{th,N}$) pode ser representado por (89-91)

$$F_{th,N} = F_{th,1} N^{S-1}, \quad (18)$$

onde o expoente **S** caracteriza a resposta do material para ablação cumulativa, baseada nas seguintes condições: (1) para $S < 1$, para os quais efeitos de incubação existem; (2) para $S = 1$, para o qual o limiar de fluência é independente do número de pulsos; e (3) para $S > 1$, para o qual o material torna-se mais resistente durante a ablação cumulativa, ou seja, a eficiência de ablação diminui (90).

A partir dos valores obtidos na Figura 28 para o limiar de ablação de ossos para diferentes números de pulsos, foi esboçado, em escala semi-logaritma, de acordo com a eq. (18), o gráfico da Figura 29.

Figura 29 – Gráficos do acumulativo limiar de fluência ($F_{th} \times N$) versus número de pulsos para tecidos ósseos.

A partir da equação (18) e da Figura 29, o fator de incubação S foi estimado com sendo 0,77 para o fêmur bovino. Este resultado indica que o efeito de incubação também é substancial durante a ablação de ossos com laser de femtossegundos.

6.2.1.2 Aspectos morfológicos da ablação com laser de femtossegundos em tecidos ósseos

A fim de obter um sistema laser que tenha uma eficiente ablação comparável com instrumentos mecânicos, a taxa de repetição deve ser máxima sem causar danos térmicos. Se a taxa de repetição é muito alta, o pulso proveniente do laser pode interagir com o plasma, que é altamente absorvedor, e leva a geração de calor na amostra (2). Além disso, a presença da pluma ejetada a partir do alvo também pode impedir o pulso proveniente do laser nas proximidades do alvo, reduzindo a eficiência da ablação. Assim, o sistema laser ideal deveria ter uma alta taxa de

repetição suficiente para maximizar a remoção do tecido, contudo que tenha tempo suficiente para o plasma e a pluma se dissiparem. Portanto, nesse item faremos uma análise da variação dos aspectos morfológicos da ablação a laser no regime de femtossegundos em ossos bovinos, quando sujeitos a um “pulso único” e/ou com diferentes taxas de repetição.

Na Figura 30 “a-e” apresentamos micrografias obtidas por MEV de tecidos ósseos irradiados com laser de femtossegundos em modo focalizado, com o laser operando em diferentes modos, variando a taxa de repetição do sistema laser.

A partir da Figura 30 verificamos que utilizando apenas um pulso (Figura 30 ‘a’) de femtossegundos com fluência de (1 J/cm^2), foi suficiente para modificar a superfície do tecido biológico. Quando trabalhamos com uma taxa de repetição de 10 Hz, verificamos as variações morfológicas do tecido (Figura 30 “b”) e em detalhes na Figura 30 “c”. A partir dessas imagens notamos que ocorre a cavitação do tecido, onde as bordas da cavidade apresentam limites relativamente bem definidos, com pequenas esfoliações, quando comparada com N=1. Além disso, em uma análise mais minuciosa, verificamos que ocorre a exposição das trabéculas ósseas “c”, e nenhuma evidência de dano térmico, ou seja, carbonização do mesmo. Isto é importante porque quando obtemos uma ablação apenas superficial “c” nós podemos aumentar a capacidade de adesão celular para facilitar a integração óssea, no caso de implantes ósseos, por exemplo. Quando aplicamos 50 pulsos (1s, 50 Hz) no tecido “d”, apesar do perfil do feixe não estar perfeitamente arredondado, verificou-se que a cavidade não apresenta sinais de carbonização e redeposição do material na sua superfície e em suas paredes internas. O mesmo ocorre para 100 Hz (Figura 30 “e-f”), sem a presença de danos térmicos (carbonização) e mecânicos (trincas), com bordas bem definidas “e” e paredes internas preservadas “f”.

Como queremos utilizar o laser como uma ferramenta cirúrgica, sabemos que é interessante trabalhar com altas taxas de repetição, com o objetivo de promover uma maior taxa de ablação por pulso. Na Figura 31 “a-d” apresentamos microimagens obtidas por MEV de tecidos ósseos irradiados com laser de femtossegundos em modo focalizado, com o laser operando com maior taxa de repetição, 1 KHz.

Figura 30 - Micro-imagens obtidas por MEV de tecidos ósseos irradiados com laser de femtossegundos em modo focalizado: a) Energia por pulso $E_{pp} = 0,41$ mJ, número de pulso $N = 1$, b) $E_{pp} = X 0,1$ mJ, $N = 10$ e em detalhes em “c”; d) $E_{pp} = 0,085$ mJ, $N = 50$; e) $E_{pp} = 0,06$ mJ, $N = 100$ e em detalhes em “f”.

Na Figura 31 “a” para uma energia por pulso de 0,178 mJ e número de pulso $N = 1000$, em detalhes em “b”, verificamos que a cavidade continua apresentando bordas bem definidas e sem redeposição de material. Além disso, apesar da alta taxa de repetição (1 KHz), não ocorreu o surgimento de zonas termicamente afetadas e nenhum dano mecânico, como trincas. O mesmo pode ser visto na Figura

31 “c” e detalhes em “d”, quando variamos a fluência do laser, e verificamos em detalhes a preservação do tecido nas paredes internas da cavidade, e pequenas regiões com sinais de derretimento, que ajudam a impermeabilizar o tecido. Esta análise é interessante, pois para obtermos uma ablação precisa baseada na absorção não-linear (ablação mediada por plasma), é necessário o uso de pequenas energias por pulso para minimizar os efeitos mecânicos de ruptura (94). Porém quando múltiplos pulsos são entregues para uma única posição, o grau de dano térmico pode ser influenciado pelo acúmulo de calor. A taxa de repetição do pulso deve ser suficientemente baixa para evitar o progressivo acúmulo do calor residual dentro do tecido. Uma alternativa estratégica para evitar o acúmulo de calor em processos cirúrgicos de tecidos duros envolve a varredura do feixe do laser em ordem de estender o intervalo de tempo entre subsequentes exposições em cada localização da área ablacionada (5). Outros sistemas também vêm sendo estudado no processamento de ossos, como é o caso dos lasers de excímers, que apresentam grande absorção no UV das transições eletrônicas de quase todas as moléculas, e têm demonstrado corte muito preciso, porém gerando zonas de dano térmico de aproximadamente 50 μm (95,96). Lasers de CO_2 (10,6 μm), tendo como objetivo o componente mineral do tecido, mostraram sucesso na remoção do tecido, porém pode ocorrer bastante carbonização do tecido (97,98). O Er:YAG (2,94 μm), com uma forte absorção de água, ganhou popularidade no passar dos anos pela possível uso em ortopedias, cirurgias maxilofaxial e odontológicas (99,100), assim como aplicações em cirurgias periodontais (101). Apesar de tudo, carbonizações ainda foram observadas com esses tipos de laser (97, 102), diferente do que aconteceu em nosso trabalho, utilizando laser de femtossegundos.

Figura 31 - Micro-imagens obtidas por MEV de tecidos ósseos irradiados com laser de femtossegundos em modo focalizado: a) Energia por pulso $E_{pp} = 0,178$ mJ, número de pulso $N = 1000$, e em detalhes em “b”; c) $E_{pp} = 0,120$ mJ, $N = 1000$, e em detalhes em “d”.

6.2.2 Aspectos morfológicos da ablação com laser de femtossegundos em esmalte e dentina

A aplicação de pulsos de laser para a modificação e estruturação de vários materiais tem apresentado um grande avanço (103). Lasers são promissores substitutos dos aparelhos de perfuração em odontologia, pois permitem a realização de uma remoção do material mais controlada. Minimização de dor pelo paciente, que são causadas pela vibração e calor de atrito, seria outra vantagem desse sistema (92). O estudo dos efeitos térmicos e mecânicos, a nível morfológico, da influência do laser de femtossegundos na microperfuração de tecidos dentais é o principal objetivo desse item.

6.2.2.1 Dentina humana

Na Figura 32 a-e apresentamos micrografias obtidas por MEV de dentina humana irradiada com laser de femtossegundos em modo focalizado, com o laser operando em diferentes modos de operação do sistema.

A partir da Figura 32 verificamos que utilizando apenas um pulso (Figura 32.a) de femtossegundos com alta energia por pulso (0,6 mJ), foi suficiente para modificar a superfície do tecido. Quando aplicamos 5 pulsos, em um intervalo de 1 s por pulso, avaliamos as variações morfológicas do tecido (Figura 32 b) e em detalhes na Figura 32 c. A partir dessas imagens obtidas por MEV notamos que ocorre a cavitação do tecido, onde as bordas da cavidade apresentam limites bem definidos. Além disso, em uma análise mais minuciosa, verificamos que ocorre a preservação dos túbulos dentinários, identificando a evidência de nenhum dano térmico na superfície ablacionada. Porém, em algumas regiões, os túbulos não foram expostos, porque deve ter ocorrido uma redeposição do material, devida a insuficiente energia necessária para ejetar o material. A exposição desses túbulos pode ser aplicada em odontologia, pois deve ajudar a penetrabilidade de sistemas adesivos utilizados em restaurações adesivas. Para N = 10 pulsos, também ocorre a exposição dos túbulos e a preservação do tecido sadio (Figura 32 d). Quando aplicamos 50 pulsos (50 Hz) no tecido “e”, verificou-se que a cavidade não apresenta sinais de carbonização e redeposição do material na sua superfície e em suas paredes internas. O mesmo ocorre para 100 Hz (Figura 30 f), sem a presença de danos térmicos (carbonização) e mecânicos (trincas), com bordas bem definidas e paredes internas preservadas. Resultados similares foram encontrados durante a ablação a laser de tecidos dentais em regime de femtossegundos (92). Para lasers operando em regime de pulso de nanossegundos, a ablação de tecidos dentais apresenta menor eficiência, e pode ser acompanhada de dano colateral no tecido, isto é, “stress” mecânico e fraturas (104). Já, para ablação a laser em regime de picossegundos, a destruição do material adjacente é minimizada, devido à formação de plasma durante o processo de ablação (83). Porém para ambos os regimes (ns e ps), ainda encontramos evidências de danos térmicos nos tecidos adjacentes (99, 104).

Figura 32 - Micro-imagens feitas por MEV de dentina humana irradiados com laser de femtossegundos em modo focalizado: a) Energia por pulso $E_{pp} = 0,6$ mJ, número de pulsos $N = 1$; b) $E_{pp} = 0,6$ mJ, $N = 5$ e c) em detalhes; d) $E_{pp} = 0,6$ mJ, $N = 10$; e) $E_{pp} = 0,6$ mJ, $N = 50$; f) $E_{pp} = 0,6$ mJ, $N = 100$.

A ablação a laser em regime de femtossegundos também apresenta vantagens quando comparado com ataques químicos, como a remoção de íons de cálcio formadores, que são muito importantes para manter a resistência cariogênica desses tecidos dentro da cavidade oral (77).

6.2.2.2 - Esmalte Humano

Na Figura 33a e 33b apresentamos micrografias obtidas por MEV de esmalte dental humano irradiado com laser de femtossegundos em modo focalizado, com o laser operando com taxa de repetição de 1 Hz e com um tempo de irradiação de 15 s.

Figura 33 - Micro-imagens feitas por MEV de esmalte humano irradiado com laser de femtossegundos em modo focalizado: Energia por pulso $E_{pp} = 0.165$ mJ, número de pulsos $N = 15000$ e magnitude da imagem 900 x em a) e 3000 x em b)

Para promover uma maior remoção do tecido, precisamos aumentar sua taxa de ablação por pulso, uma das maneiras é aumentar a taxa de repetição do sistema para 1 KHz, como vimos para o osso. Porém até agora apenas havíamos feito análise morfológica de cavidades irradiadas com no máximo 1000 pulsos. A partir da figura 33 “a” e “b” (em detalhes), verificamos que mesmo com uma ablação acumulativa de pulsos (15000 pulsos no total), conseguimos obter uma ablação limpa e bem definida, sem evidência de danos térmicos e mecânicos no tecido. Também foi promovida uma ablação com maior volume de tecido removido, devido a maior profundidade alcançada pelo acúmulo de pulsos na cavidade. Nas paredes internas da cavitação apresentam uma superfície limpa com sinais de derretimento do tecido, o qual é importante para impermeabilização do mesmo, porém sem sinais de carbonização e trincas. Diferente do que acontece durante a ablação a laser em esmalte dental em regime de pulsos de nanossegundos, onde danos secundários (

por exemplo, carbonização) no tecido podem ser encontrados (104, 105), assim como ocorre com a dentina.

Para lasers de fs a redução da influência térmica é devido a um menor calor encontrado quando comparado com pulsos longos, pois com lasers de fs a fluência necessária para a microperfuração apresenta grandezas menores do que em lasers de ns, para mesma taxa de repetição e comprimento de onda. A omissão de micro-rachaduras para pulsos curtos é de grande importância em odontologia, pois elas podem ser fontes de novas cáries (92). Este sistema de ablação a laser em regime de pulsos ultracurtos mostrou-se eficiente e promissor em processos cirúrgicos para remoção e corte de tecidos duros.

6.2.3 Aspectos morfológicos da ablação com laser de nanossegundos e femtossegundos em resinas odontológicas restauradoras

Micro-imagens obtidas por MEV de uma resina restauradora odontológica (experimental) irradiada com laser de nanossegundos, com aumento da imagem de 600 X são mostradas na Figura 34a, e uma análise mais detalhada da amostra com aumento de 1000 x na Figura 34b.

Figura 34 - Micro-imagens obtidas por MEV da resina restauradora odontológica (experimental) irradiada com laser de nanossegundos, com magnitude da imagem de 600 x a), e uma análise mais detalhada da amostra com magnitude da imagem de 1000 x b).

A partir da Figura 34a, verificamos que a cavidade ablacionada não apresenta uma forma regular (arredondada) na sua superfície. Esta irregularidade deve estar associada aos modos do laser e pelo regime de iteração dos pulsos (nanossegundos). O nosso principal alvo foi investigar os danos causados durante o processo de ablação com pulsos longos. Assim, a partir da Figura 34b, onde obtivemos uma imagem mais detalhada, fica evidente o aparecimento de material re-solidificado e derretimento nas paredes internas da cavidade. Este “derretimento” foi devido a efeitos de aquecimento no material e é típico de ablação para lasers operando em regime de nanossegundos. Neste caso trabalhamos com baixa taxa de repetição (10 Hz), porém assim não foi possível para evitar os danos térmicos residuais na amostra.

Na figura 35 apresentamos micro-imagens obtidas por MEV de uma resina restauradora odontológica (experimental) irradiada com laser de femtossegundos, com taxa de repetição de 100 Hz na Figura 35a, em detalhes na Figura 35b e já na Figura 35c com menor fluência que “b”, e na Figura 35d com taxa de repetição de 1 KHz. As amostras foram irradiadas durante 5 s de irradiação.

Nas figuras 35a, e em detalhes em “b”, notamos que as micro-cavidades apresentam os limites das bordas bem definidas (arredondadas), porém encontramos irregularidades no seu interior. Podemos notar que surgem duas diferentes regiões modificadas. Esta evidente que existe um furo mais profundo (R1) no centro da cavidade, de aproximadamente 40 μm de diâmetro, que pode ser assimilado o perfil da cavidade do furo com 1 KHz (figura 35d), para a mesma amostra. E outra região (R2) onde o diâmetro da cavidade modificada é de aproximadamente 300 μm . Entre as regiões R2 e R1 verificamos uma região com um “relevo” (R3) que pode ter surgido devido à energia depositada na superfície do material não ter sido suficiente para ablacionar o material. E também pode estar associada à cinética de re-solidificação dos materiais (106). Essa formação de “anéis”, em outras palavras, se deve presumidamente à transferência de momento do material ablacionado (na região central) para a superfície da camada (106). A região R1 também pode estar associada à distribuição de intensidade do perfil do feixe gaussiano, que apresenta sua máxima fluência no centro da gaussiana. Na Figura 35c), onde trabalhamos com regime de fluência perto do limiar, observamos que a parte orgânica (matriz polimérica) do material foi removido, enquanto a parte inorgânica (zircônio), que apresenta maior resistência a ablação, permaneceram

inalteradas. Assim concluímos que utilizando condições apropriadas de irradiação, pode-se obter uma seletividade em casos de tratamentos de superfície, para aplicações odontológicas.

Na Figura 35d a ablação apresenta uma forma definida na superfície da cavidade. Não fica evidente o aparecimento de material re-depositado na superfície da cavidade e também não há sinas de material re-solidificado nas paredes internas da cavidade. Adicionalmente, a densidade de potência e a fluência utilizada em “d” foram suficientes para ablacionar e remover todo material da cavidade sem causar efeitos mecânicos, como trincas.

Figura 35 - Micro-imagens obtidas por MEV de uma resina restauradora odontológica (experimental) irradiada com laser de femtossegundos, com taxa de repetição de 100 Hz em “a”, em “b” e em “c” (com menor fluência que “b”), e com taxa de repetição de 1 KHz em “d”. As amostras foram irradiadas com alto regime de fluência e tempo de 5 s de exposição.

A seguir explicaremos a diferença nos diâmetros das micro-cavidades, quando comparamos a cavidade ablacionada utilizando 100 Hz e 1 KHz, com a mesma potência média do laser. É esperado que o diâmetro seja menor para 1 KHz

($\sim 0,1$ mJ/pulso) devido a sua energia por pulso ser menor do que para 100 Hz ($\sim 1,0$ mJ/pulso), isso para 100 mW de potência média, por exemplo, como podemos ver pela equação (1) e (2) a relação entre o diâmetro da cavidade em função da energia por pulso ($D^2 \sim \ln E_0$). Ou seja, quando diminuimos a taxa de repetição, para manter a potência média, aumentamos a energia por pulso (intensidade de pico) no mesmo fator. Assim o volume a ser removido é maior, pois o diâmetro aumenta, implicando em uma energia insuficiente para promover uma remoção completa do material. É também interessante lembrar que para maiores taxas de repetição o limiar de ablação é menor.

7 Ablação a laser em tecidos biológicos moles

Uma precisa remoção do tecido com mínimo dano térmico é necessário em várias aplicações de cirurgias a laser, incluindo neurocirurgia, odontologia e cardiologia (46,107). Ablação a laser em tecidos biológicos, com pulsos ultracurtos, é uma técnica que é empregada devido a particulares características de interação tecido/luz, resultando em uma precisa ablação, que evita o dano térmico do tecido (19). Esta técnica vem sendo aplicada em processamento de tecidos biológicos duros e moles, como por exemplo, dentes, tecidos ósseos, pele e fígados. A ablação a laser de tecidos moles (108,109,12) apresenta interessantes mecanismos de interação laser/tecido que serão mostrados no decorrer desse capítulo. Sendo que a principal diferença entre os tecidos duros e moles esta na quantidade de água e moléculas orgânicas que compõem o sistema, influenciando na dinâmica de ablação dos tecidos.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica principalmente aplicada para o tratamento de lesões malignas e pré-malignas, que induz a morte celular pela combinação do efeito de um fotosensibilizador irradiado por um laser com apropriado comprimento de onda e oxigênio molecular. A TFD tópica de superfície de tecidos utilizando o ácido 5-aminolevulínico (ALA), importante precursor da protoporfirina IX (ppIX), tem encontrado resultados clínicos promissores (110,111).

Um fator limitante da técnica ALA-TFD é a profundidade de penetração do medicamento para o tratamento de lesões tumorais mais profundas. Um dos caminhos para transportar a droga para regiões mais profundas do fígado, no caso, pode ser através de mecanismos mecânicos. Esse mecanismo pode ser realizado através de micro-furos feitos na superfície onde será aplicada a droga. Através desse micro-canais a droga alcançará regiões mais profundas do tecido e consequentemente através da TFD podemos potencialmente induzir uma necrose mais extensa nessa direção. Poucos estudos têm discutido novas técnicas para melhorar a penetração da droga ALA e a profundidade de necrose em fígados (110-113). Portanto, o principal objetivo deste capítulo foi encontrar um mecanismo que melhore a penetração do ALA, um precursor de um importante fotossensibilizador

utilizado em tratamento TFD, e consequentemente aumentar a profundidade de necrose no tecido após a TFD. Para isso utilizamos micro-canais feitos em fígados de rato utilizando a técnica ablação a laser com pulsos ultracurtos. Porém para estabelecermos parâmetros confiáveis e eficientes para microperfuração a laser em tecidos moles, foi feito um estudo prévio para o simples entendimento dos mecanismos de ablação em tecidos moles que são responsáveis por esse procedimento.

7.1 Propriedades dos tecidos biológicos moles e implicações no processo de ablação

Várias propriedades dos tecidos biológicos são relevantes para a ablação pulsada. A composição e morfologia do tecido estabelecem as propriedades ópticas do tecido que determinam a distribuição volumétrica de energia interna que direcionam os processos de ablação. Morfologia e estrutura são também afetadas pelo transporte de energia entre tecidos constituintes e, junto com as propriedades mecânicas do tecido, determinam a resposta termodinâmica do tecido com o pulso do laser, com o aquecimento e a transformação de fase (12).

Tecidos biológicos moles podem ser vistos de modo simples como um material constituinte de células entremeadas por uma matriz extracelular (ME). Em termos de massa, a maioria dos tecidos moles é dominada por água (55-99%) e colágeno (0-35%). A ME é um material complexo composto, o componente principal que inclui água, colágeno, elastina, glicol-proteína, e proteínas de adesão celular. Em tecidos com células-contínuas como o fígado e o epitélio, a fração ME é muito pequena e constitui na maioria em proteínas de adesão celular tais como fibrina (12). A função primária da ME é manter a integridade estrutural do tecido. Assim, as ME inibem a vaporização do tecido e remoção do material, que são os objetivos do processo de ablação.

As propriedades mecânicas dos tecidos biológicos também são de grande importância para a ablação a laser, como ambos, a elasticidade e força do tecido modulam a cinética e dinâmica do processo de ablação (12). Embora as características mecânicas variem consideravelmente em termos da rigidez,

extensibilidade em fraturar, e força de tensão, uma generalização pode ser feita. Ambos tecidos tensionados e forçados são relevantes para ablação pulsada, como eles fornecem um guia para o estresse e deformação que devem ser gerados quando a remoção do material é realizada via fratura da matriz do tecido. Existe uma possível correlação entre força do tecido e quantidade de colágeno (114). Tecidos que representam extremos da força mecânica são fígados e tendões. Fígados são tecidos moles e friáveis possuindo uma força de tensão final (FTF) muito baixa e moderada extensibilidade de fratura. Tendão, em contraste, é forte e rígido, com uma FTF alta e extensibilidade de fratura baixa. Fígado é um tecido celular-contínuo com pequena ME e teor de colágeno. Tendão, por exemplo, é um tecido matriz-contínuo que possui alta quantidade de colágeno (12). Portanto, a dinâmica do processo de ablação nestes dois diferentes tecido apresentará características diferenciadas.

A desnaturação térmica das proteínas ME resultante da irradiação a laser pulsado também é de grande importância, pois afeta a dinâmica do processo de ablação e rege o grau de dano térmico nos tecidos adjacentes (12).

7.2 Procedimentos experimentais

O sistema utilizado neste experimento para a microperfuração foi um laser Ti:Safira (Libra-S) emitindo pulsos de aproximadamente 70 fs, centrado em 801 nm, e operando em uma taxa de repetição de 100-1000 Hz.

O trabalho foi desenvolvido em três etapas. Na primeira delas foi feito um estudo do perfil da ablação em peles de rato. Peles de rato foram removidas após o rato ser eutanasiado, *ex vivo*, e irradiadas (por 5 e 10 s) com laser de femtossegundos, em modo focalizado, com energia por pulso de 52 μ J e 110 μ J, e taxa de repetição 1 KHz. Após isso, foi feito um preparo histológico na amostras, e através de um microscópio óptico, obtivemos as imagens do perfil de dano em pele de rato.

Na segunda parte foi um estudo para determinar o limiar de ablação de fígados de ratos. Onde a partir da cintura do feixe Gaussiano e do diâmetro da superfície ablacionada, foi determinado o limiar de ablação em fígado *in vivo* e *ex*

vivo. Com estes dados de limiar, obtivemos um protocolo para última etapa do trabalho.

Na última etapa, as amostras de fígados (ratos Wister) foram posicionadas em um translador x-y-z e os microcanais foram feitos em diferentes áreas dos fígados, de aproximadamente 3,0 mm x 3,0 mm, espaçadas 0,25 mm e as áreas foram irradiadas com diferentes fluências, no modo focalizado na superfície (Figura 36). Nós tivemos o cuidado de construir uma ponte (suporte) para manter o fígado estático.

Figura 36 – Diagrama representando a distribuição dos microfuros sobre o tecido, em a) superfície e em b) perfil.

Um laser de diodo 630 nm (Ceralas®, Ceramoptec, Germany) foi utilizado como uma fonte de luz para TFD. Uma fibra óptica de 300 µm de diâmetro com microlentes acopladas foi utilizada para obter um uniforme perfil de irradiação.

Nove ratos Wister de aproximadamente 350 g foram usados neste estudo. Os animais foram divididos em três grupos (G1, G2, G3) contendo três animais cada um deles, e separados em sete subgrupos (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7) (Tabela 1). O primeiro grupo contém as regiões (S1 e S2), sendo S1 a região controle (sem micro-canais) e em S2 os furos foram feitos micro-canais utilizando uma potência média de 25 mW, taxa de repetição de 500 Hz e um tempo de irradiação de 8 s. Para o segundo grupo (S3 e S4); S3 a região controle e S4 foram feitos micro-canais utilizando uma potência média de 40 mW, taxa de repetição de 100 Hz e um tempo de irradiação de 15 s. Já o grupo G3 contém três regiões de irradiação (S5, S6 e S7), onde S5 foi a região controle, e as amostras S6 e S7, foram feitos micro-canais utilizando, respectivamente, uma taxa de repetição de 500 Hz e 100 Hz, uma potência média de 25 mW e um tempo de irradiação de 15 s para ambos. No grupo G1 o medicamento ALA foi diluído com o objetivo de aumentar a profundidade de penetração do tecido, por meio dos micro-canais.

Tabela 1 – Parâmetros de irradiação de cada grupo investigado.

Parâmetros do Laser de Femtossegundo				
Grupo	Subgrupo	Potência média (mW)	Taxa de repetição (Hz)	Tempo de irradiação (s)
G1	S1	-	-	-
	S2	25	500	8
G2	S3	-	-	-
	S4	40	100	15
G3	S5	-	-	-
	S6	25	500	15
	S7	25	100	15

Os fígados foram utilizados para quantificar a variação da profundidade da necrose na TFD como uma função dos microcanais obtidos por ablação a laser. Uma região controle do fígado foi mantida sem ter sido ablacionada com o laser de femtossegundos. Os animais foram anestesiados com um anestésico a base de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica S/A) na dose de 100 mg/kg, associado a um analgésico, sedativo e relaxante muscular xilasina base 2g (Coopazine – Coopers ® Brasil) administrado via intra-muscular na dose de 6 mg/kg. Em seguida o fotossensibilizador (ALA) foi aplicado sobre a superfície do fígado. Após 2 h45 min o fígado foi irradiado (laser diodo). Fluência de 150 J/cm² foi utilizada para uma intensidade de 150 mW/cm². Animais foram mantidos vivos por 27 h para permitir que a necrose fosse estabelecida, após isso eles foram mortos e foi removido o tecido necrosado para investigação histológica.

O tecido necrosado foi macroscopicamente analisado e as amostras foram preparadas para análise histológica. Para essa análise foram utilizadas 3 lâminas histológicas para cada amostra de fígado. O aspecto do tecido e a profundidade da necrose foram às principais características analisadas. As medidas foram feitas utilizando um microscópio óptico acoplado a um micrômetro (com eixos x e y).

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Geometria da ablação em pele

Na figura 37 apresentamos imagens do perfil de dano causado em pele de rato depois de irradiada com laser de femtossegundos, em modo focalizado.

Na Figura 37a e 37b as amostras foram irradiadas com laser de femtossegundos, em modo focalizado, com energia por pulso de 52 μJ , taxa de repetição 1 KHz, e tempo de irradiação de 5 s e 10 s, respectivamente. Após isso, foi feito um estudo histológico das lâminas do tecido, e verificamos que em “a” e “b” a densidade de energia aplicada sobre o tecido não foi suficiente para ablacioná-lo, pois fica bem evidente que ocorreu uma alteração do tecido. Essa alteração do tecido está associada ao dano térmico causado pela interação laser-tecido, que resultou na destruição celular do tecido, e está bem evidente em “b”, pela sua coloração roxa. Na figura 37c dobramos a densidade de energia aplicada sobre o tecido, assim conseguimos romper o seu “optical breakdown”, levando a uma ablação do tecido. Além disso, verificamos uma alteração do tecido nas regiões periféricas a cavidade ablacionada, como por exemplo, na sua parede interna a sinais de carbonização do tecido. Já ao redor da cavidade, verificamos regiões com coloração com tom forte de roxa e rosa, nessas regiões, em uma análise mais minuciosa (figura 37d), verificamos que está associada à alteração térmica do tecido, que levou a destruição celular, de núcleos e citoplasma, no tecido. A alta densidade de energia necessária para ablacionar a pele está ligado ao fato que a pele, por ser um tecido biológico mole, é composta por ME, essas matrizes inibem a vaporização do tecido e remoção do material, que são os objetivos do processo de ablação.

Figura 37 – Imagens do perfil de dano causado em pele de rato, após irradiado com laser de femtossegundos, com os seguintes parâmetros : a) 52 μJ e 5s; b) 52 μJ e 10s; c) 110 μJ e 10s ; d) 110 μJ e 10s com maior aumento.

Na Figura 38 apresentamos o gráfico do perfil da zona termicamente modificada em termos do diâmetro e profundidade.

No gráfico da Figura 38 quantificamos o dano celular no tecido. Considerando uma área circular na superfície, o diâmetro medido foi de 560 μm diminuindo no interior do tecido de forma aproximadamente parabólica até zero em função da profundidade da necrose. Esse dano térmico do tecido alcançou uma profundidade máxima de 1 mm, para esse regime de operação do laser. A profundidade do dano e/ou do furo está associada ao acumulo de pulsos do laser em uma determinada região e esse valor encontrado está dentro da região focal do sistema ($z < z_R$).

Figura 38 – Gráfico do perfil da zona termicamente modificada em termos do diâmetro e profundidade, para uma amostra de pele irradiada com laser de femtossegundos, em modo focalizado, com 110 μJ , 1 KHz, durante 10 s.

7.3.2 Limiar de ablação em tecidos moles

Como vimos no capítulo anterior, as vantagens da micro-cirurgia com laser de femtossegundos, incluindo alta precisão e uma pequena zona termicamente afetada, podem ser mais efetivamente obtidas perto das condições do limiar de ablação, ou seja, utilizando uma fluência mínima necessária para que ocorra o processo de ablação do tecido. Para determinar as condições limiares de ablação do fígado, tanto ablações com simples quanto por múltiplos pulsos, foram conduzidas em vários regimes de fluência do laser, seguindo o mesmo método do capítulo 6.

Utilizando este método determinamos o limiar de ablação para fígados de rato *ex vivo*, para 10 Hz e 100 Hz, como podemos ver na figura 39. A figura 39 mostra a medida do diâmetro da cavidade elevado ao quadrado, como função da fluência de pico do laser, em escala semi-logarítmica. Este gráfico permite estimar a cintura do feixe do laser a partir da inclinação das retas obtidas pelo ajuste dos dados. A cintura do feixe do laser foi estimada como sendo 125 e 69 μm para 10 Hz e 100 Hz, respectivamente. A grande diferença na cintura do feixe do laser entre os experimentos ocorreu similarmente ao caso de tecidos duros, e é entendida como sendo devida ao posicionamento impreciso que ocorreu durante a instalação e a

remoção do alvo (fígado) e esta relacionada a efeitos de incubação. A mudança de regime de taxa de repetição também pode ter influenciado a cintura do feixe no foco.

Figura 39 - Gráficos do diâmetro quadrado das cavidades versus fluência, quando irradiamos fígados com em laser de femtossegundos para, a) 10 Hz e b) 100 Hz.

A partir do gráfico da Figura 39, o limiar da fluência de ablação F_{th} foi determinado localizando o valor da fluência onde a linha de ajuste intercepta o eixo x e o valor de ablação (F_{th}). Para 10 Hz e 100 Hz os valores obtidos do limiar de fluência foram 0,52 e 0,36 J/cm^2 , respectivamente.

Efeitos de incubação, como a diminuição do limiar de fluência de ablação com o aumento do número de pulsos do laser, foram observados na ablação desses tecidos moles, assim como ocorreu em tecidos duros.

Através das imagens obtidas por microscopia óptica, verificamos que as energias utilizadas neste estudo *in vivo*, para “pulso único”, 10, 100 e 1000 pulsos, não foram suficientes para ablacionar o tecido, ocorrendo apenas um dano superficial no tecido, como pode ser visto na Figura 40.

Figura 40 – Imagem obtida por microscopia óptica da superfície de um fígado irradiado com laser de femtossegundos operando em modo focalizado, 1 KHz, 1s e 370 mW.

Com base nas informações anteriores e nas medidas do diâmetro de dano em fígados e energia do laser, a partir da figura 41 determinamos o limiar de dano (modificação superficial) do tecido para fígado de ratos *in vivo* para o laser operando em modo “pulso único”. A cintura do “spot” do laser foi estimada como sendo aproximadamente 690 μm , com laser operando em pulso único.

Figura 41 - Gráficos do diâmetro quadrado das cavidades versus fluência, quando irradiamos fígados com em laser de femtossegundos operando em modo de “pulso único”.

Para fígado *in vivo*, com laser operando em modo de 1 pulso, o valor obtido do limiar de dano foi 0,048 J/cm^2 . Encontramos um valor relativamente baixo no limiar de fluência, isto é esperado, pois esse valor não se refere ao limiar de ablação, e sim a um limiar de dano superficial no tecido. Para a remoção do tecido precisaríamos fornecer mais energia ao sistema.

Para finalizar nosso estudo de caracterização da micro-perfuração em fígados de rato, fizemos um estudo do limiar de dano térmico, a partir de micro-imagens obtidas em um microscópio óptico das superfícies ablacionadas (Figuras 42 e 43).

Figura 42 – Imagens obtidas por microscopia óptica da superfície de um fígado irradiado com laser de femtossegundos operando em modo focalizado, com energia por pulso de 0,38 mJ, taxa de repetição de 100 Hz, tempo de irradiação em a) 10 s e em b) 30 s.

Na Figura 42 irradiamos a superfície do fígado com uma energia de 0,38 mJ, com o laser operando em 100 Hz, e variamos o tempo de irradiação de 10 s para 40 s. Para 10 s (em “a”) não ficaram evidentes danos térmicos no tecido, porém quando aumentamos o tempo de irradiação para 20 (imagem não apresentada aqui) ou para 30 s, devido ao acúmulo de pulsos, surgem zonas termicamente afetadas, como pode ser visto na figura 42b.

Na Figura 43 irradiamos a superfície do fígado com um tempo de irradiação fixo de 15 s, operando com taxa de repetição de 100 Hz e com diferentes energias por pulso na faixa de 0,10 – 0,33 mJ. Verificou-se que até 0,19 mJ obtivemos uma cavidade sem evidência de danos térmicos (Figura 43a), porém com o aumento da energia surgem efeitos secundários nos limites da bordas da cavidade, como mostrado na Figura 43b.

Figura 43 – Imagens obtidas por microscopia óptica da superfície de um fígado irradiado com laser de femtossegundos operando em modo focalizado, com tempo de irradiação de 15 s, taxa de repetição de 100 Hz e com energia por pulso de 0,19 mJ em a) e 0,30 mJ em b).

7.3.3 Micro-canais utilizados no auxílio da penetração do medicamento ALA

Uma imagem típica de um micro-canal em tecidos biológicos utilizando ablação a laser é mostrada na Figura 44. Esta geometria cônica é tipicamente esperada para um feixe Gaussiano. Neste caso, o micro-canal foi feito em fígado de ratos vivos e poucos minutos após essa micro-perfuração o rato foi morto e o fígado foi removido para a análise histológica do tecido. É interessante identificar que neste caso não foi aplicada o tratamento TFD. A profundidade do furo tem aproximadamente 0,65 mm. Nenhuma evidência de dano térmico foi encontrada nas paredes internas do furo (Figura 44a), em detalhes em “d”, na superfície da cavidade (micro-canal), e nas regiões ao redor da cavidade, indicando uma preservação celular do tecido. Este resultado foi devido a um estudo prévio, apresentado no item anterior, sobre o limiar de ablação e dano térmico em fígado de ratos. É interessante relembrar que a fração ME, que é responsável por manter a integridade estrutural do tecido, é muito pequena em fígado e constitui na maioria em proteínas de adesão celular tais como a fibrina. Assim, a desnaturação térmica dessas proteínas ME resultante da irradiação a laser pulsado é de grande importância, pois rege a dinâmica do processo de ablação e o grau de dano térmico nos tecidos adjacentes, diferindo de outros sistemas biológicos como a pele e os tecidos duros.

Figura 44 - Uma imagem de um micro-furo em fígado utilizando laser de femtossegundos, a) aumento de 10 X e b) 40X.

Na Figura 45 nós temos a imagem da necrose em amostras de fígados após a micro-perfuração com o laser de femtossegundos e o tratamento TFD a) e quando apenas foi tratado com a TFD b). O perfil da necrose em ambos os casos é similar. Porém, não podemos ver o perfil dos micro-canais como esperado na figura 44. Isto acontece devido à regeneração natural do tecido, sendo que os ratos permaneceram vivos aproximadamente 30 horas vivos após a ablação a laser. Apesar de não podemos ver os micro-furos nas imagens de necroses (Figura 45b) e o perfil destas serem similares em ambos os casos, obtivemos um aumento na profundidade de necrose, quando comparamos os tecidos necrosados que foram micro-perfurados, com os tecidos que apenas foram tratados com a TFD. Esta quantificação é mostrada no gráfico da figura 46.

Figura 45 - Imagem da necrose em amostras de fígados: a) após a micro-perfuração e o tratamento TFD e b) quando apenas foi tratado com a TFD (sem micro-canais).

A Figura 46 apresenta o gráfico da profundidade de necrose normalizada versus diferentes parâmetros de irradiação. A figura 46 mostra um aumento da profundidade de necrose para os três diferentes casos (grupos). Em todos os casos foi evidente o aumento da profundidade da necrose quando aplicamos a metodologia de micro-perfuração a laser em fígados, antes do tratamento com a TFD (S2, S4, S6, S7). No gráfico da figura 46 está clara a influencia dos parâmetros

da ablação a laser, como as diferentes fluências utilizadas, na profundidade da necrose. Apesar da tentativa de aperfeiçoar os parâmetros de irradiação da superfície do tecido, sabemos que a fluência do laser causou variações no diâmetro e profundidade dos furos, assim como nos danos da superfície dos tecidos. Por exemplo, no segundo grupo (S4) nós obtivemos uma profundidade de necrose relativamente maior, quando levamos em conta a amostra controle, e comparamos com os outros casos. Para o grupo G1 o medicamento ALA foi diluído com o objetivo de aumentar a profundidade de penetração do tecido, por meio dos micro-canais, mas isto não aumentou a profundidade de necrose. Resultados similares foram encontrados por Regan *et al* (109) em seu estudo com laser fracionado em pele de porco.

Figura 46 – Profundidade de necrose normalizada para diferentes parâmetros de irradiação (Tabela 1).

Análise histopatológica mostrou diferença mínima entre os grupos. Geralmente, em todos os grupos notamos necrose no parênquima com extensivo edema inflamatório infiltrado e difuso, alguns focos hemorrágicos, tecidos epiteliais em torno dos vasos foram quase iguais. As regiões que não foram micro-perfuradas (S1, S3 e S5) (Figura 47a) apresentaram menor necrose e homogênea, com menos edema na região da necrose, e maior integridade da cápsula de Glisson, do que os outros Grupos (figura 47b). Além disso, é possível observar poucas áreas com

vacúolos pequenos perto da superfície do tecido “branco” perfurado com laser de femtossegundos de alta energia, seguido de TFD (S4 e S6), indicando um possível efeito térmico. Este resultado sugere que a micro-perfuração a laser em regime de femtossegundos não produz um significativo efeito térmico em fígado de ratos, utilizando condições adequadas, como as desse trabalho.

Este estudo demonstrou que os furos feitos a partir da ablação a laser no regime de femtossegundos podem melhorar a penetração do tóxico ALA em fígado, corroborando com outros estudos relatados na literatura que usaram lasers como, CO₂ e Er:YAG para fazer micro-canais em pele (109,112,113). Porém, ablação a laser no regime de pulsos ultracurtos oferece vantagens sobre os lasers fracionados, devido à separação da escala de tempo de deposição da energia em escalas de tempo de condução térmica e hidrodinâmica, minimizando o dano colateral (46).

Provavelmente, em pele, no qual os fotosensibilizadores tópicos apresentam maior dificuldade para penetrar, a influência da micro-perfuração no regime de femtossegundos seria uma boa alternativa. Essa técnica permitiria que o ALA cruzasse o *stratum corneum* e penetrasse em tecidos sub-córneos, como observado por Haendersal *et al*, 2010 (112) que quantificaram a profundidade de fluorescência após a criação dos canais com laser de CO₂ e o fotossensibilizador ácido metil 5-aminolevulico (MAL).

Figura 47 – Micrografias de laminas de fígado. No grupo controle, tais como S1, S3 e S5 (“a”) foi observado integridade da cápsula de Glyson (↙). Outros grupos representados pela imagem “b”, mostraram uma extensiva área de necrose com algumas mudanças na capsula de Glyson (↙) e com vacúolos (★) próximos a superfície.

Finalmente, este estudo mostrou que a micro-perfuração a laser no regime de femtossegundos pode atuar em somatória com a TFD, promovendo uma maior penetração do medicamento no tecido e pode representar um potencial para o tratamento de tumores profundos ou locais mais profundos.

8 Conclusões

Neste trabalho fizemos um estudo tanto em nível microscópico, quanto macroscópico, dos processos envolvendo ablação a laser no regime de femtossegundos, em situações onde o material é homogêneo e quando é estruturado, apresentando regiões com diferentes propriedades. Com este estudo geramos subsídios científicos para que possamos entender os aplicativos da ablação no regime de pulsos ultracurtos em diferentes materiais e tecidos, como é o caso de PMMA (70), resinas restauradoras odontológicas (11), fígados de ratos (115), dentes e ossos (116).

Vários resultados foram obtidos e destacamos as contribuições:

Para o estudo da dinâmica de progressão da ablação a laser com pulsos ultracurtos em materiais dielétricos transparentes, determinamos a velocidade de ablação, a partir do monitoramento da progressão da ablação. Devido à importância das aplicações da microfabricação em regime de femtossegundos, é importante o desenvolvimento de técnicas que permitam visualizar em tempo real esse processo. A dependência do tempo com a velocidade durante a progressão da ablação permite inferir sobre os efeitos que podem causar limitações na taxa de ablação. Instabilidades durante o processo ablativo causam várias geometrias diferentes na cavidade ablacionada.

Para o estudo do perfil da ablação a laser no regime de femtossegundos através de uma interface, fizemos uma análise baseada na correlação das propriedades de ablação na superfície de individuais materiais. Este estudo demonstrou a validade da intensidade local efetiva e permitiu uma quantificação da variação que ocorre na geometria de ablação na interface entre dois diferentes materiais. Além disso, nossos dados são suficientes para prever a descontinuidade no perfil de ablação que ocorrerá na interface entre dois materiais: material A/ material B, mostrando um aumento do diâmetro da cavidade ablacionada. Isto pode ser aplicado para o entendimento ablação a laser em ultra-rápidos regimes em sistemas estruturados, ou seja, em tecidos dentais (esmalte/dentina) e outros.

Outro assunto discutido na tese foi sobre os aspectos da ablação a laser de tecidos biológicos duros e resinas restauradoras odontológicas: morfologia, ablação

seletiva e controlada. Determinamos as condições do limiar de ablação de tecidos ósseos para diferentes regimes de operação do laser, ou seja, a fluência mínima necessária para que ocorra o processo de ablação do tecido. Mesmo para maiores taxas de repetição do laser e altas fluências, não verificamos o efeito de carbonização e mecânicos nas cavidades dos tecidos duros. Adicionalmente, verificamos que ocorre a preservação das trabéculas ósseas bovinas. Isto é importante porque quando obtemos uma ablação apenas superficial nós podemos aumentar as células ligantes para facilitar a integração óssea, no caso de implantes ósseos, por exemplo. Este sistema de ablação a laser em regime de pulsos ultracurtos mostrou-se eficiente e promissor em processos cirúrgicos para remoção e corte de tecidos duros.

Por fim, fizemos uma investigação da penetração da droga ALA em fígados de rato utilizando microperfuração no regime de femtossegundos. Esta técnica de microperfuração a laser, quando aplicada antes do tratamento com TFD, resultou em um aumento da profundidade da necrose. Além disso, o laser pulsado operando em regime de femtossegundos apresentou vantagens sobre outros tipos de laser, pois não produziu indesejáveis danos térmicos no tecido remanescente. Esta nova técnica pode constituir um potencial protocolo que permita tratamento de tumores.

Referências

1. GAMALY, E. G.; TIKHONCHUK, V. T.; RODE, A. V.; LUTHER-DAVIES, B. Ablation of solids by femtosecond lasers: ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics. *Physics of plasmas*, v. 9, n.3, p. 949-957, 2002.

2. GIRARD, B.; TU, D.; ARMSTRONG, M. R.; WILSON, B. C.; CLOKIE, C. M. L.; DWAYNE MILLER, R. J. Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues. *Lasers Surgery and Medicine*, v. 39, n.3, p. 273-285, 2007.

3. ABU-SERRIAH, M.; CRITCHLOW, H.; WHITTERS, C.J.; AYOUB, A. Removal of partially erupted third molars using an erbium (Er): YAG laser: a randomized controlled clinical trial. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.42, n.3, p. 203–208, 2004.

4. MURRAY, A. K.; DICKINSON, M. R. Tissue ablation-rate measurements with a long-pulsed, fiber-deliverable 308 nm excimer laser. *Lasers in Medicine Science*, v. 19, n.3, p. 127–138, 2004.

5. LIU, Y.; NIEMZ, M. Ablation of femoral bone with femtosecond laser pulses - a feasibility study. *Lasers in Medicine Science*, v. 22, n.3, p. 171-174, 2007.

6. NOLTE, S.; MOMMA, C.; JACOBS, H.; TUNNERMANN, A.; CHICHKOV, B.N.; WELLEGEHAUSEN, B.; WELLING, H. Ablation of metals by ultrashort laser pulses. *Journal of the Optical Society of America B*, v. 14, n.10, p. 2716–2722, 1997.

7. PERRY, M. D.; STUART, B. C.; BANKS, P. S.; FEIT, M. D.; YANOVSKY, V.; RUBENCHIK, A. M. Ultrashort-pulse laser machining of dielectric materials. *Journal of Applied Physics*, v. 85, n.9, p. 6803–6810, 1999.

8. TOW, C. C.; MINGHUI, H. H.; LUPING, P. S. Laser precision engineering: from microfabrication to nanoprocessing. *Laser & Photonic Review*, v. 4, n.1, p. 123–143, 2010.

9. VOGEL, A.; NOACK, J.; HUTTMAN, G.; PALTAUF, G. Femtosecond-laser produced low-density plasma in transparent biological media: A tool for the creation of chemical, thermal and thermomechanical effects below the optical breakdown threshold. *Proceeding SPIE*, n.4633, p. 23–37, 2000.

10. SHIRK, M. D.; MOLIAN, P. A. A review of ultrashort pulsed laser ablation of materials. *Journal of Laser Applications*, v. 10, n.1, p. 18–28, 1998.
11. NICOLODELLI, G.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Femtosecond laser ablation profile near an interface: analysis based on the correlation with superficial properties of individual materials. *Applied Surface Science*, v. 257, n.7, p. 2419–2422, 2011.
12. VOGEL, A.; VENUGOPALAN, V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemistry Review*, v. 103, n.2, p. 577-644, 2003.
13. SOLON, L. R.; ARONSON, R.; GOULD, G. Physiological implications of laser beams. *Science*, v.134, n.3489, p.1506, 1961.
14. ZARET, M.; BREININ, G. M.; SCHMIDT, H.; RIPPS, H.; SIEGEL, I. M.; SOLON, L. R. Ocular lesions produced by an optical maser (laser). *Science*, v. 134, n.3489, p. 1525-1526, 1961.
15. CAMPBELL, C. J.; KIMIHARU, M. D.; NOYORI, K. S.; KOESTER, C. J.; RITTNER, M. C. Intraocular temperature changes produced by laser coagulation. *Acta Ophthalmologica*, v. 41, S76, p. 22-31, 1962.
16. GOLDMAN, L.; BLANEY, D. J.; KINDEL, D. J.; FRANKE, E. A. Effect of the laser beam on the skin: preliminary report. *Journal of Investigation Dermatology*, v. 40, n.3, p. 121-122, 1963.
17. MAXWELL, I. *Application of femtosecond laser for subcellular nanosurgery*. 2006. 156 f. Thesis (Doctor in Philosophy), Harvard University, Cambridge Massachusetts, 2006.
18. WELCH, A. J.; VAN GEMERT, M. J. C, (Ed). *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. New York: Plenum Press, 1995.
19. NIEMZ, M. H. *Laser-tissue interactions. fundamentals and applications*. 2nd ed. Berlin: Springer, 2002.
20. WAYNANT, R. W. (Ed). *Lasers in medicine*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
21. GITOMER, S. J.; JONES, R. D. Laser-produced plasmas in medicine. *IEEE Transactions on Plasma Science*, v. 19, n.6, p. 1209-1219, 1991.

22. CHEONG, W. F. Summary of optical properties. In: WELCH, A. J.; GEMERT, M. J. C. van, (Ed). *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. New York: Plenum Press, 1995. p. 275.

23. ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, v. 220, n.4596, p. 524-527, 1983.

24. JACQUES, S. The role of tissue optics and pulse duration during high-power laser irradiation. *Applied Optics*, v. 32, n.13, p. 2447-2454, 1993.

25. FRIED, D. IR laser ablation of dental enamel. *Proceedings of SPIE*, v. 3910, p. 136-148, 2000.

26. BAGNATO, V. S. *Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde*. São Carlos: Editora Livraria da Física, 2008.

27. HIBST, R.; KELLER, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. measurement of the ablation rate. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 9, n. 4, p. 339-344, 1989.

28. MARION, J. E.; KIM, B. M. Medical applications of ultra-short pulse lasers. *Commercial and Biomedical Applications of Ultrafast Lasers, Proceedings of SPIE*, v. 3910, p. 42-50, 1999.

29. RUBENCHIK, A. M.; FEIT, M. D.; SHORE, B. W. Unique aspects of laser energy deposition in the fs pulse regime. *Proceedings of SPIE*, v.2672, p. 243-249, 1996.

30. JIANG, L.; TSAI, H. L. Femtosecond laser ablation: Challenges and Opportunities. Disponível em: <
http://galilei.chem.psu.edu/~tatiana/PUBLIS/My_papers/prlpaper/femtosecond_rev_NSFWorkshop.pdf>. Acesso em: 10/01/2011.

31. LOESEL, F. H.; NIEMZ, M. H.; BILLE, J. B.; JUHASZ, T. Laser induced optical breakdown on hard and soft tissues and its dependence on pulse duration: experiment and model. *IEEE Journal Quantum Electronic*, v. 32, n.10, p. 1717-1722, 1996.

32. RODE, A.V.; GAMALY, E. G.; LUTHER-DAVIES, B.; TAYLOR, B. T.; DAWES, J.; CHAN, A.; LOWE, R. M.; HANNAFORD, P. Subpicosecond laser ablation on dental enamel. *Journal of Applied Physics*, v. 92, n.4, p. 2153-2158, 2002.
33. NEEV, J.; SILVA, L. B.; FEIT, M. D.; PERRY, M. D.; RUBENCHIK, A. M.; STUART, B. C. Ultrashort pulse lasers for hard tissue. *IEEE Journal Quantum Electronic*, v. 2, n.4, p. 790-799, 1996.
34. NIEMZ, M. H. Investigation and spectral-analysis of the plasma-induced ablation mechanism of dental hydroxyapatite. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, v. 58, n.4, p. 273-281, 1994.
35. ORAEVSKY, A. A.; DA SILVA, L. B.; RUBENCHIK, A. M.; FEIT, M. D.; GLINSKY, M. E.; PERRY, M. D.; MAMMINI, B. M.; SMALL, W., IV; STUART, B. C. Plasma mediated ablation of biological tissues with nanosecond-to-femtosecond laser pulses: Relative role of linear and nonlinear absorption. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electron*, v. 2, n.4, p. 801-809, 1996.
36. DU, D.; LIU, X.; KORN, G.; SQUIER, J.; MOOROU, G. Laser-induced breakdown by impact ionization in SiO₂ with pulse widths from 7 ns to 150 fs. *Applied Physics Letter*, v. 64, n.23, p. 3071-3073, 1994.
37. DEDERICH, D.N. Laser tissue interaction – what happens to laser-light when it strikes tissue. *Journal of the American dental Association*, v. 124, n.2, p. 57-61, 1993.
38. NIEMZ, M.H. Cavity preparation with the Nd-Ylf picosecond laser. *Journal of Dental Research*, v. 74, n.5, p. 1194-1199, 1995.
39. LONDON, R. A.; BAILEY, D. S.; YOUNG, D. A.; ALLEY, W. E.; FEIT, M. D.; RUBENCHIK, A. M.; NEEV, J. Hydrodynamic model for ultra-short pulse ablation of hard dental tissue. *Proceeding of SPIE*, v. 2676, p. 231-242, 1996.
40. VOGEL, A.; NAHEN, K.; THEISEN, D.; NOACK, J. Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd:YAG laser pulses. I. optical breakdown at threshold and super threshold irradiance. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electron*, v. 2, n.4, p. 847–859, 1996.
41. RAIZER, Y. P. Heating of a gas by a powerful light pulse. *Soviet Physics - Journal of Experimental and Theoretical Physics*, v. 21, n.48, p. 1508-1519, 1965.

42. DOCCHIO, F.; REGONDI, P.; CAPON, M. R. C.; MELLERIO, J. Study of the temporal and spatial dynamics of plasmas induced in liquids by nanosecond Nd:YAG laser pulses. 1: analysis of the plasma starting times. *Applied Optics*, v. 27, n.17 p. 3661-3668, 1988.
43. DOCCHIO, F.; REGONDI, P.; CAPON, M. R. C.; MELLERIO, J. Study of the temporal and spatial dynamics of plasmas induced in liquids by nanosecond Nd:YAG laser pulses. 2: plasma luminescence and shielding. *Applied Optics*, v. 27, n.17 p. 3669-3674, 1988.
44. KENNEDY, P. K.; HAMMER, D. X.; ROCKWELL, B. A. Laser-induced breakdown in aqueous media. *Progress in Quantum Electronic*, v. 21, n.3, p. 155-248, 1997.
45. FEIT, M. D.; RUBENCHIK, A. M.; KIM, B. M.; DA SILVA, L. B.; PERRY, M. D. Physical characterization of ultrashort laser pulse drilling of biological tissue. *Applied Surface Science*, v. 127, n.129, p. 869-874, 1998.
46. MAO, S. S. Laser ablation – fundamentals & applications. University of California at Berkeley. 2005. Disponível em: < <http://www.jlab.org/FEL/LPC/05lpc-mao.pdf>. > Acesso em: 10/08/2009.
47. TENG, P.; NISHIOKA, N. S.; ANDERSON, R. R.; DEUTSCH, T. F. Acoustic studies of the role of immersion in plasma-mediated laser ablation. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. QE-23, n.10, p. 1845-1952, 1987.
48. STERN, D.; SCHOENLEIN, R. W.; PULIAFITO, C. A.; DOBI, E. T.; BIRNGRUBER, R.; FUJIMOTO, J. G. Corneal ablation by nanosecond, picosecond, and femtosecond lasers at 532 and 625 nm. *Archives of Ophthalmology*, v. 107, n.4, p. 587-592, 1989.
49. JUNGNICHEL, K.; VOGEL, A. Efficiency of bursts in intraocular Nd:YAG laser surgery. *Lasers Light in Ophthalmology*, v. 5, p. 95-99, 1992.
50. KURTZ, R. M.; ELNER, V. M.; LIU, X.; SQUIER, J. A.; DU, D. T.; MOUROU, G. A. Photodisruption in the human cornea as a function of laser pulse width. *Journal of Refractive Surgery*, v. 13, n. 7, p. 653-658, 1997.
51. LOESEL, F. H.; FISCHER, J. P.; GO"TZ, M. H.; HORVATH, C.; JUHASZ, T.; NOACK, F.; SUHM, N.; BILLE, J. F. Nonthermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses. *Applied Physics B*, v. 66, n.1, p. 121-128, 1988.

52. VOGEL, A.; SCHMIDT, P.; FLUCKE, B. Minimization of thermomechanical side effects and increase of ablation efficiency in IR ablation by use of multiply Q-switched laser pulses. *Proceeding of SPIE*, 4617, p. 105-111, 2002.
53. MAJARON, B.; SRINIVAS, S. M.; HUANG, H. L.; NELSON, J. S. Deep coagulation of dermal collagen with repetitive Er:YAG laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 26, n.2, p. 215-222, 2000.
54. FOSSA, J. S. *Desenvolvimento de um sistema óptico para microperfuração de materiais cerâmicos, metálicos e poliméricos utilizando laser nanopulsado de Nd:YAG*. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
55. GORJAN, M. *Femtoscience*. 2006. Disponível em: < http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2005_2006/femtoscience.pdf >. Acesso em: 15/10/2009.
56. LINDE, D. von der.; SOKOLOWSKI-TINTEN, K.; BIALKOWSKI, J.; Laser-solid interaction in the femtosecond time regime. *Applied Surface Science*, v. 109, n.110, p.1-10, 1997.
57. BECKER, P. C.; FRAGNITO, H. L.; BRITO CRUZ, C. H.; FORK, R. L.; CUNNINGHAM, J. E.; HENRY, J. E.; SHANK, C. V. Femtosecond photon echoes from band-to-band transitions in GaAs. *Physical Review Letters*, v. 61, n.14, p.1647-1649, 1988.
58. SPENCE, D. E.; KEAN, P. N.; SIBBETT, E. W. 60--Fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser. *Optics Letters*, v. 16, n.1, p. 42-44, 1991.
59. SARUKURA, N.; ISHIDA, Y.; NAKANO, E. H. Generation of 50-fsec pulses from a pulse compressed CW, passively mode-locked Ti:sapphire laser. *Optics Letters*, v. 16, n.3, p. 153-155, 1991.
60. BRITO-CRUZ, C. H.; FRAGNITO, H. L. *Fenômenos ultra-rápidos: geração de pulsos lasers ultracurtos e suas aplicações*. Campinas: Núcleo de Excelência Fotônica em Telecomunicações (NEXFot), 2000.
61. XU, L.; TEMPEA, G.; POPPE, A.; LENZNER, M.; SPIELMANN, C. H.; KRAUSZ, F.; STINGL, A.; FERENCZ, K. High-power sub-10-fs Ti:sapphire oscillators. *Applied Physics B*, v. 65, n.2, p. 151-159, 1997.

62. STINGL, A.; SPIELMANN, C. H.; BRABEC, T.; LENZNER, M.; KRAUSZ, F. Advances in ultrafast solid state lasers. *Brazilian Journal of Physics*, v. 26, n. 2, p. 510-515, 1996.

63. DA SILVA, D. L. *Otimização de pulsos ultracurtos via absorção de dois fótons*. 2005. Dissertação (Mestrado em Física), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

64. SALCEDO, J. R. Os *lasers*. Disponível em: < <http://zircon.dcsa.fct.unl.pt/dspace/bitstream/123456789/108/1/1-2.PDF> >. Acesso em: 14 jul. 2009.

65. Wikipedia. *Gaussian beam*. Disponível em: < http://en.wikipedia.org/wiki/Gaussian_beam >. Acesso em: 08 mar. 2010.

66. SUZAKI, Y.; TACHIBANA, A. Measurement of the Am sized radius of Gaussian laser beam using the scanning knife-edge. *Applied Optics*, v. 14, n.12, p. 2809-2810, 1975.

67. VITEK, D. N.; ADAMS, D. E.; JOHNSON, A.; TSAI, P. S.; BACKUS, S.; DURFEE, C. G.; KLEINFELD, D.; SQUIER, J. A. Temporally focused femtosecond laser pulses for low numerical aperture micromachining through optically transparent materials. *Optics Express*, v. 18, n.17, p. 18086, 2010.

68. GATTASS, R. R.; CERAMI, L. R.; MAZUR, E. Micromachining of bulk glass with bursts of femtosecond laser pulses at variable repetition rates. *Optics Express*, v. 14, n.12, p.5279, 2006.

69. DESAUTELS, G. L.; BREWER, C. D.; WALKER, M. A.; JUHL, S. B.; FINET, M. A.; POWERS, P. E. Femtosecond micromachining in transparent bulk materials using an anamorphic lens. *Optics Express*, v. 15, n.10, p. 13139-13148, 2007.

70. WATANABE, W.; SOWA, S.; TAMAKI, T.; ITOH, K.; NISHII, J. Three-dimensional waveguides fabricated in poly(methyl methacrylate) by a femtosecond laser. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 45, n. 29, p. L765–L767, 2006.

71. BAUDACH, S.; BONSE, J.; KRUGER, J.; KAUTEK, W. Ultrashort pulse laser ablation of polycarbonate and polymethylmethacrylate. *Applied Surface Science*, v. 154/155, p.555–560, 2000.
72. ZOUBIR, A.; LOPEZ, C.; RICHARDSON, M.; RICHARDSON, K. Femtosecond laser fabrication of tubular waveguides in poly(methacrylate). *Optics Letters*, v. 29, n.16, p. 1840-1842, 2004.
73. SERAFETINIDES, A. A.; MAKROPOULOU, M.; FABRIKES, E.; SPYRATOU, E.; BACHARIS, C.; THOMSON, R. R.; KAR, A. K.. Ultrashort laser ablation of pmma and intraocular lenses. *Applied Physics A*, v. 93, n.1, p. 111-116, 2008.
74. DAY, D.; GU, M. Microchannel fabrication in pmma based on localized heating by nanojoule high repetition rate femtosecond pulses. *Optics Express*, v. 13, n.16, p. 5939-5946, 2005.
75. NICOLODELLI, G.; LIZARELLI, R. F. Z.; COSTA, M. M.; BAGNATO, V. S. Time progression of ultrashort laser ablation in a transparent material. *Laser Physics*, 2011, v. 21, n. 8, p. 1–8.
76. CANESTRI, F. Sudden and unpredictable below-surface ablation pattern changes by CO₂ laser beams: a qualitative description of five macroscopic cases observed in PMMA with high probability to occur during surgery in low-water-content tissues. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v. 20, n.6, p. 335-339, 2002.
77. LIZARELLI, R. F. Z.; COSTA, M. M.; CARVALHO-FILHO, E.; NUNES, F. D.; BAGNATO, V. S. Selective ablation of dental enamel and dentin using femtosecond laser pulses. *Laser Physics Letters*, v. 5, n.1, p. 63-69, 2008.
78. FREITAS, A. Z.; FRESCHI, L. R.; SAMAD, R. E.; ZECELL, D. M.; GOUW-SOARES, S. C.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Determination of ablation threshold for composite resins and amalgam irradiated with femtosecond laser pulses. *Laser Physics Letters*, v. 7, n. 3, p. 236–241, 2010.
79. ALDA, J. Laser and Gaussian beam propagation and transformation. In: *Encyclopedia of Optical Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. p.999-1013. DOI:10-1081/E-EOE 120009751.
80. ESENALIEV, R.; ORAEVSKY, A.; RASTEGAR, S.; FREDERICKSON, C.; MOTAMEDI, M. Mechanism of dye-enhanced pulsed laser ablation of hard tissues: implications for dentistry. *IEEE Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 2, n.4, p. 836-846, 1996.

81. GOLDMAN, L.; HORNBY, P.; MEYER, R.; GOLDMAN, B. Impact of the laser on dental caries. *Nature*, v. 203, n.4943, p. 417, 1964.

82. WHITE, I. M.; NEEV, I.; GOODIS, H. E.; BERNIS, M. W. Surface temperature and thermal penetration depth of Nd:YAG laser applied to enamel and dentin. *Proceedings of SPIE*, v. 1643, p. 423-436, 1992.

83. LIZARELLI, R. F. Z.; KURACHI, C.; MISOGUTI, L.; BAGNATO, V. S. Characterization of enamel and dentin response to Nd: Y AG picosecond laser ablation. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery Volume*, v. 17, n.3, p. 127-131, 1999.

84. KRAUSE, L. S.; COBB, C. M.; RAPLEY, J. W.; KILLOY, W. J.; SPENCER, P.; Laser irradiation of bone. an in vitro study concerning the effects of the CO2 laser on oral mucosa and subjacent bone. *Journal of Periodontal*, v. 68, n.9, p. 872–880, 1997.

85. *Esmalte dentário*. Disponível em: < http://pt.wikipedia.org/wiki/Esmalte_dent%C3%A1rio >. Acesso em: 23 out. 2010.

86. *Dentina*. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Dentina> >. Acesso em: 23 out. 2010.

87. PILIGIAN, G.; HERBERT, R.; HEARNS, M.; DROPKIN, J.; LANDSBERGIS, P.; CHERNIACK, M. Evaluation and management of chronic work related musculoskeletal disorders of the distal upper extremity. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 37, n.1, p. 75–93, 2000.

88. KORTE, F.; SERBIN, J.; KOCH, J.; EGBERT, A.; FALLNICH, C.; OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. N. Formation of microbumps and nanojets on gold targets by femtosecond laser pulses. *Applied Physics A*, v. 77, n.235, p. 229-335, 2003.

89. BONSE, J.; WROBEL, J. M.; KRUGER, J.; KAUTEK, W. Ultrashort-pulse laser ablation of indium phosphide in air. *Applied Physics A*, v.72, n.1, p. 89-94, 2001.

90. KIM, H.; SOHN, IK-BU; JEONG, S. Ablation characteristics of aluminum oxide and nitride ceramics during femtosecond laser micromachining. *Applied Surface Science*, v. 255, n.24, p. 9717-9720, 2009.

91. MARTIN, S.; HERTWIG, A.; LENZNER, M.; KRUGER, J.; KAUTEK, W. Spot-size dependence of the ablation threshold in dielectrics for femtosecond laser pulses. *Applied Physics A*, v. 77, n.7, p. 883–884, 2003.
92. KRUGER, J.; KAUTEK, W.; NEWSELY, H. Femtosecond-pulse laser ablation of dental hydroxyapatite and single-crystalline fluoroapatite. *Applied Physics A*, v.69, n.1, S403-S407, 1999.
93. SAMAD, R. E.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Geometrical method for determining the surface damage threshold for femtosecond laser pulses. *Laser Physics*, v. 16, n.2, p. 336–339, 2006.
94. VOGEL, A.; SCHWEIGER, P.; FRIESER, A.; ASIYO, M. N.; BIRNGRUBER, R. Intraocular Nd:YAG laser surgery: light–tissue interaction, damage range, and the reduction of collateral effects. *IEEE Journal of Quantum Electron*, v. 26, n.12, p. 2240–2260, 1990.
95. NAKAMURA, Y.; HOSSAIN, M.; WATANABE, H.; TOKONABE, H.; MATSUMOTO, N.; MATSUMOTO, K. Morphological changes of rat mandibular bone with ArF excimer laser in vivo. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v.17, n.4, p. 145-149, 1999.
96. WALTER, M. L.; DOMES, M. E.; DILLER, R. A.; SPROEDT, J.; JOOSTEN, U. H. Photoablation of bone by excimer laser radiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 25, n.2, p. 153-158, 1999.
97. FRIED, N. M.; FRIED, D. Comparison of Er: YAG and 9.6- μ m TE CO₂ lasers for ablation of skull tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 28, n.4, p. 335–343, 2001.
98. FRENTZEN, M.; GOTZ, W.; IVANENKO, M.; AFILAL, S.; WERNER, M.; HERING, P. Osteotomy with 80- μ s CO₂ laser pulses - histological results. *Lasers in Medicine Science*, v. 18, n.2, p. 119–124, 2003.
99. ABU-SERRIAH, M.; CRITCHLOW, H.; WHITTERS, C. J.; AYOUB, A. Removal of partially erupted third molars using an erbium (Er): YAG laser: a randomised controlled clinical trial. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 42, n.3, p. 203–208, 2004.

100. LEWANDROWSKI, K. U.; LORENTE, C.; SCHOMACKER, K. T.; FLOTTE, T. J.; WILKES, J. W.; DEUTSCH, T. F. Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 19, n.1, p. 40–45, 1996.

101. WATANABE, H.; ISHIKAWA, I.; SUZUKI, M.; HASEGAWA, K. Clinical assessments of the erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v.14, n.2, p.67–75, 1996.

102. GERALDO-MARTINS, V. R.; TANJI, E. Y.; WETTER, N. U.; NOGUEIRA, R. D.; EDUARDO, C. P. Intrapulpal temperature during preparation with the Er: YAG laser: an in vitro study. *Photomedicine in Laser Surgery*, v. 23, n.2, p.182–186, 2005.

103. BÄUERLE, D. *Laser processing and chemistry*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer - Verlag, 1996.

104. LIZARELLI, R. F. Z.; KURACHI, C.; MISOGUTI, L.; BAGNATO, V. S. A Comparative study of nanosecond and picosecond laser ablation in enamel: morphological aspects. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v.18, n.3, p. 151–157, 2000.

105. LIZARELLI, R. F. Z.; KURACHI, C.; MISOGUTI, L.; BAGNATO, V. S. Morphological comparison between nano and picosecond laser ablation in enamel. *Proceedings of SPIE*, v. 3910, 2000.

106. TRAN, D. V.; LAM, YEE CHEONG; ZHENG, H. Y.; MURUKESHAN, V. M.; CHAI, J.C.; HARDT, DAVID E.. Femtosecond laser processing of crystalline silicon. 2005. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1721.1/7449> >. Acesso em: 15 dez. 2010.

107. TSAI, P. S.; BLINDER, P.; MIGLIORI, B.; NEEV, J.; JIN, J. Y.; SQUIER, J. A.; KLEINFELD, D. Plasma-mediated ablation: an optical tool for submicrometer surgery on neuronal and vascular systems. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 90–99, 2009. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.02.003.

108. SUN, H.; HAN, M.; NIEMZ, M. H.; BILLE, J. F. Femtosecond laser corneal ablation threshold: dependence on tissue depth and laser pulse width. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 39, n.8, p. 654–658, 2007.

109. REGAN, T. D.; UEBELHOER, N. S.; SATTER, E.; ROSS, E. V. Depth of tissue ablation and residual thermal damage caused by a pixilated 2,940nm laser in a swine skin model. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 42, n.5, p. 408–411, 2010.
110. PENG, Q.; SOLERB, A. M.; WARLOEB, T.; NESLANDA, J. M.; GIERCKSKYB, K. E. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 62, n. 3, p. 140–145, 2001.
111. FERRAZ, R. C. M. C.; FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; SIBATA, C. H.; CASTRO e SILVA, O.; BAGNATO, V. S. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 27, n. 1, p. 93-99, 2009.
112. HÆEDERSDAL, M.; SAKAMOTO, F. H.; FARINELLI, W. A.; DOUKAS, A. G.; TAM, J.; ANDERSON, R. R. Fractional CO2 laser-assisted drug delivery. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 42, n.2, p. 113–122, 2010.
113. LETADA, P. R.; SHUMAKER, P. R.; UEBELHOER, N. S. Demonstration of protoporphyrin IX (PpIX) localized to areas of palmar skin injected with 5aminolevulinic acid (ALA) and pretreated with a fractionated CO2 laser prior to topically applied ALA. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n.2, p. 120-122, 2010.
114. WALSH, J. T.; DEUTSCH, T. F. Pulsed CO2 laser ablation of tissue: effect of mechanical properties. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 36, p. 1195-1201, 1989.
115. NICOLODELLI, G.; REGO, R. F.; KURACHI, C.; OMAIRI, T.; BAGNATO, V. S. Evidence of increase 5-aminolevulinic acid (ALA) penetration due to microdrilling in the soft tissue using femtosecond laser ablation. Submetido para: *Laser in Surgery and Medicine*, 2011.
116. NICOLODELLI, G. et al. Ablation study of femtosecond laser at dentin and bone tissues. (Em preparo para *Laser in Surgery and Medicine*)