



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA AÇÃO DO LASER RANDÔMICO NO
ESMALTE DENTAL BOVINO**

Edilene Boldrini

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre Profissional na área de *Lasers em
Odontologia*.

Orientador:

Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter

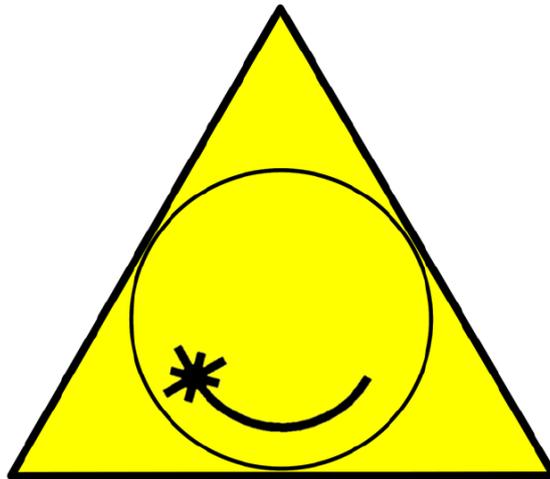
Co-orientadora:

Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo

São Paulo

2012





MESTRADO PROFISSIONAL LASERS
EM ODONTOLOGIA

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas mas ao
tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”.*

Carl Gustav Jung (1875-1961)

“Desejo que você consiga ver o Universo em um grão de areia,

E o Paraíso em uma flor;

Que você consiga segurar o infinito na palma de sua mão,

E notar a eternidade em uma hora”.

William Blake (1757-1827)

Dedicatória,

À “Grande Consciência Cósmica Universal”;

O “Grande Arquiteto do Universo”.

A Maria A. Capra Boldrini e João Gastão Boldrini (in memoriam),

meus pais;

A Rosália M. Beraldo Boldrini (in memoriam) e Ettore Boldrini (in memoriam),

meus avós;

Pelo amor incondicional, por terem sido os exemplos para a formação do meu caráter,

o meu esteio em todas as circunstâncias e principalmente por me ensinarem

a acreditar na realização dos meus sonhos.

A todos àqueles que fazem a diferença em minha vida,

e especialmente àqueles com quem aprendi o amor pela ciência e pelo conhecimento:

Dr. Luiz Soares da Costa, Dr. Marco Antonio Viana,

Prof. Dr. Valdir Issac Maluf (in memoriam), Dr. Marco Prist Filho.

E a todos vocês.

Agradecimentos,

*A Deus pela preciosidade da vida, por todas as oportunidades a mim
concedidas, por todas as dificuldades superadas e por estar
sempre à minha frente, iluminando os meus caminhos.*

Agradeço especialmente,

Ao meu orientador Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter, por sua solicitude em todos os estágios deste estudo, pelas novas diretrizes nos momentos de dificuldades, por seu caráter inovador, pela sua visão de futuro e pela honra de sua orientação neste trabalho.

Ao Mestre em Tecnologia Nuclear, Renato Juliani Ribamar Vieira, pelo profissionalismo, amizade e paciência que, com seu amor pelo conhecimento, me conduziu até aqui.

A Profa. Dra. Ilka Tiemy Kato pela solicitude e carinho, interesse e ajuda no andamento e realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo pela sua co-orientação e pela sua boa vontade e ajuda;

A Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro pelo seu incentivo e por disponibilizar o seu laboratório;

A Profa. Dra. Denise Maria Zezell por disponibilizar o seu laboratório, caso fosse necessário;

A Profa. Dra. Lília C. Courrol por ter disponibilizado seu laboratório e a mestranda Letícia Sicchieri por ter nos ajudado com o espectômetro e o fluorímetro e principalmente por sua amizade;

A Sra. Sueby Tavares Venâncio e ao colega Danilo Mariano Silva que, sempre solícitos, se encarregaram da autorização da minha entrada no IPEN aos domingos e feriados.

Aos colegas Ana Cláudia Ballet de Cara, Jonas Jakutis Neto e Mateus Tunes, pela solidariedade, carinho e incentivo.

A Sra. Lílíane de Souza por seu profissionalismo, solícitude e amizade desde o meu primeiro momento nos workshops do LELLO e pelo seu incentivo para esse mestrado.

Ao Sr. Luiz Daniel Rosa e ao Sr. Rubens Gomes Alves pela presença e cuidados com nossa estadia e segurança aos domingos e feriados em que fizemos os experimentos.

A todos os professores e funcionários do mestrado profissional pela paciência e dedicação

A todos os colegas do mestrado profissional e acadêmico pelos momentos de descontração;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu concluísse esse trabalho;

Os meus sinceros agradecimentos.

**Avaliação “in vitro” da ação do laser randômico no
esmalte dental bovino**

Edilene Boldrini

RESUMO

O laser randômico que difere do laser convencional por não possuir uma cavidade óptica, ocorrendo em meios altamente difusos e cujo mecanismo de emissão laser é o múltiplo espalhamento da luz em microcavidades que se autoformam nestes meios, tem sido observado em vários materiais com pelo menos uma dimensão nanométrica, incluindo alguns tecidos humanos entre eles o tecido ósseo, o tecido intestinal e o renal, sendo emitido quando estes tecidos são infiltrados com um corante laser ativo e submetidos a um laser de bombeio.

Os objetivos deste trabalho foram verificar “in vitro” a viabilidade da emissão de laser randômico no esmalte dental bovino quando infiltrado pelo corante laser ativo rodamina 6G; e se o sinal emitido pelo laser randômico é capaz de diferenciar desorganização tecidual, sendo que os parâmetros verificados foram o limiar de ação laser e o estreitamento espectral das linhas de emissão.

Sendo um estudo inédito, detectou-se pela primeira vez a ocorrência de laser randômico no esmalte dental bovino, sendo que este ocorreu com uma energia de bombeio de 1,3 mJ, tendo sido emitido tanto pelo tecido dental sadio como pelo demineralizado, podendo os estreitamentos dos picos de emissão laser randômico virem a ser, potencialmente, utilizados como sensíveis detectores de mudanças estruturais em dimensões nanométricas entre elas as lesões de cárie incipientes.

Evaluation “in vitro” random laser action in bovine enamel

Edilene Boldrini

ABSTRACT

The random laser differs from conventional laser for not having an optical cavity, occurring in highly diffuse medium and the mechanism of laser emission is the multiple scattering of light forming microcavities in the media, has been observed in various materials with nanometric scale, including some human tissues as bone tissue, kidney and intestinal tissue. By infiltrating these tissues with a dye laser active and exciting them with a pump laser, the random laser emission is observed.

Our objectives were to verify “in vitro” if the bovine enamel is likely to emit random laser when infiltrated by the dye laser active rhodamine 6G; and if the emitted random laser is able to differentiate tissue disorganization. The parameters evaluated were the threshold laser and the narrowing spectra.

Being an unpublished study, we detected for the first time the occurrence of random laser in bovine enamel, and this occurred with pump energy of 1.3 mJ, having been obtained by both the health and demineralized dental tissue. Therefore, the narrowing of the random laser emission peaks come to be potentially used as sensitive detectors of structural changes in nanometers dimensions including for incipient caries lesions.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	Pag.01
2. Objetivos.....	Pag:03
3. Revisão de literatura.....	Pag.04
3.1. O laser convencional e o laser randômico.....	Pag.04
3.2. O esmalte dental.....	Pag.07
3.3. Etiologia e mecanismo da doença cárie.....	Pag.10
3.4. A lesão de cárie em esmalte.....	Pag.11
4. Material e Métodos.....	Pag.15
4.1. Procedimento experimental.....	Pag.15
4.1.1 Amostras utilizadas.....	Pag.17
4.1.1.1. Amostras dentais com cárie incipiente submetidas à solução desmineralizante.....	Pag.17
4.1.1.2. Amostras dentais submetidas a ataque ácido.....	Pag.18
4.1.1.3. Amostras dentais submetidas a ataque ácido alterando-se a concentração e o tempo de imersão.....	Pag.20
4.1.2 O arranjo experimental.....	Pag.22
5. Resultados.....	Pag.30
5.1. Ocorrência de laser randômico com elementos espalhadores em solução corante laser ativo.....	Pag.30
5.2. Primeiras tentativas de verificação da ação do laser randômico para esmalte dental bovino.....	Pag 32
5.3. Ação do laser randômico no esmalte bovino.....	Pag. 37
6. Discussão.....	Pag.43
6.1. Sugestões para trabalhos futuros.....	Pag. 46
7. Conclusão.....	Pag 47
8. Referências Bibliográficas.....	Pag.48

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1: Esquema de uma cavidade de um laser convencional : O meio ativo laser é posicionado entre dois espelhos, sendo que um deles é parcialmente reflexivo.O meio ativo ao ser submetido a uma fonte de excitação emite radiação laser através do espelho parcialmente transmissor a partir do momento que as perdas se tornarem maiores que os ganhos.</p>	04
<p>Figura 2: Características do laser randômico. (a) Perfil espectral da emissão do laser randômico para micro aglomerados de ZnO; (b) Distribuição da intensidade de emissão para o mesmo composto; (c) Esquema de uma emissão de laser randômico. CAO. H.; Rewew on Latest developments in random lasers with coherent feedback, Journal of physics A: Mathematical and General, v. 38, n. 49, 10497 – 10535, 2005.</p>	05
<p>Figura 3: (a) Espectro de emissão do corante laser ativo rodamina 800 em DMSO; (b) Espectro da emissão de laser randômico para diferentes posiçõamentos da amostra. Q.Song <i>et al</i>, Random Lasing in bone tissue, 2010.</p>	06
<p>Figura 4: Corte transversal de cristais de hidroxiapatita no prisma de esmalte humano. Os cristais estão densamente arranjados e são de forma irregular (aproximadamente x 168.000), (de Frazier, P.D.: J. Ul-trastruct. Res. 22: 1, 1968).</p>	07

- Figura 5:** Prismas de esmalte: **(a)** em lâmina descalcificada; **(b)** (MEV, aproximadamente x 100.000); **(c)** corte descalcificado de esmalte humano de um germe dentário. Os prismas que são cortados transversalmente lembram escamas de peixe. Histologia e Embriologia Oral de Orban, (S.N. BHASKAR, 10^a.Edição,1989). 08
- Figura 6:** Esquema do órgão dental humano (Mariana Araguaia, graduada em Biologia). www.mundoeducacao.com.br 09
- Figura 7:** Formação, mineralização e maturação de alguns tecidos mineralizados. Histologia e Embriologia Oral de Orban, (S.N. BHASKAR, p. 55; 10^a. Edição. 1989) 09
- Figura 8:** Fatores responsáveis pela doença cárie. OLIVEIRA LIMA, J.E.; Cárie dentária um novo conceito. Rev. Dent. Ortodon. Ortoped. Facial. vol. 12 no. 06. Maringá Nov./Dec. 2007. 10
- Figura 9:** Lesão de cárie incipiente em esmalte dental humano (lesão de mancha branca). MATOS, A.B.; TURBINO, M.L.; MATSON, E. Efeitos das técnicas de microabrasão no esmalte. Estudo em microscopia de varredura. Rev Odontol Univ São Paulo, v. 12, n.2, p. 105-111. 11
- Figura 10:** Lesão de cárie incipiente (mancha branca), **(a)** Radiomicrografia; **(b)** Esquema; (Lindi (1966)). 13
- Figura 11:** **(a)** Aspecto da superfície de esmalte dental humano sadio (aumento de 1200 x, MEV); **(b)** Aspecto inicial de lesão de mancha branca (aumento de 1200 x, MEV). MATOS, A. B.; TURBINO, M.L.; MATSON, E. Efeitos das técnicas de microabrasão no

esmalte. Estudo em microscopia de varredura. Rev Odontol Univ São Paulo, v. 12, n. 2, p. 105 - 111.

14

Figura 12: (a) Cortadeira Isomet Low speed saw (BUEHLER), montada com lamina em forma de disco (diamond wafering Blade, series 15 HC diamond, 10.2 cm dia X 0,3mm, n° 4244; (b) Amostra dental bovina, corte de 5,0 mm x 10,0 mm, armazenada em “ependorf”, com algodão umidificado com água deionizada a 5° C.

15

Figura 13: (a) Desmineralização do esmalte dental bovino com ácido fosfórico a 37% (marca Villevie), por 12 hrs. (formação de lesão); (b) corante laser ativo rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol .

16

Figura 14: (a) amostra de esmalte dental hígido de pH. (b) Amostra de esmalte dental descalcificado em solução desmineralizante. Amostras cedidas pela Profa. Dra. Ilka Tiemy Kato.

18

Figura 15: Amostra dental bovina recoberta com verniz resistente a ácido (esmalte de unha Impala Tech, Laboratório Ameviller de Cosméticos Ltda), e com cera Utilidade Wilson (Polidental Ind. & com. Ltda).

19

Figura 16: Preparo da solução do corante laser ativo rodamina 6G em etileno glicol.

(a) Pó de rodamina 6G.

(b) Balança de precisão (Precisa XR 2055M - DR, Swissmade);

(c) Etileno glicol pró análise, Mono;

(d) Solução saturada de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol.

Laboratório da Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro.

Centro de Lasers e aplicações (CLA-IPEN).

20

Figura 17: (a) Amostra dental bovina envolta em cera odontológica n° 7, pela técnica de enceramento progressivo;

(b) Armazenamento das amostras dentais bovinas em “ependorfs” individualizados com solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileneoglicol, em temperatura ambiente e no escuro por 7 dias.

21

Figura 18: À esquerda amostras de esmalte dental bovino com e sem desmineralização e *não lixadas*. A direita amostras com e sem desmineralização e *lixadas*. Todas submetidas ao corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol após 94 hrs de imersão. (Acima estão as descalcificadas).

21

Figura 19: À esquerda amostras de esmalte dental bovino com e sem desmineralização e não lixadas. No meio amostra casada e lixada (com e sem desmineralização). À direita amostras de esmalte dental bovino lixadas com e sem desmineralização. (Acima estão as desmineralizadas). Submetida ao corante laser ativo rodamina 6G por 7 dias

22

Figura 20: Características espectrais da rodamina 6G.

(a) Espectro de absorção da amostra, obtido com fluorímetro

(b) Espectro de emissão da amostra

obtido utilizando-se um espectrômetro modelo Cary 5000, marca *Varian*.

Laboratório da Profa. Dra. Lília C. Courrol.

(Centro de lasers e Aplicações – CLA / IPEN)

23

- Figura 21:** Cristal de Nd:YAG (óxido de ítrio- alumínio dopado com neodímio), 1 mol %, presente na região central do módulo. 23
- Figura 22:** Características do feixe de bombeio.
- (a) perfil temporal do pulso chaveado medido com osciloscópio de 1GHz e 5 GS/s e detector PIN com 160 ps de tempo de subida.
- (b) perfil espectral para o mesmo pulso. 24
- Figura 23:** Arranjo do laser de bombeio 25
- Figura 24:** (a) Separador harmônico;
- (b) Lente convergente com foco de 20 mm
- (c) emissão do do SH de $\lambda = 532$ nm do laser de Nd:YAG. 25
- Figura 25:** (a) Separador de feixes utilizado para a coleta da radiação retroespalhada da amostra;
- (b) Detalhe da montagem do separador de feixes no arranjo do laser de bombeio. 27
- Figura 26:** (a) Espectro do separador de feixes (transmissão do $\lambda = 532$ nm) e reflexão da emissão retroespalhada da amostra;
- (b) Espectro de transmissividade do filtro dicróico (F1). 27
- Figura 27:** (a) Espectrômetro da *Ocean Optics*, modelo HR 4000, resolução espectral de 3,5 nm para fibra óptica com 100 μm de diâmetro de núcleo e 0,3 nm para fibra com 5 μm , para

- detecção de comprimentos de onda de 235 nm a 750 nm;
- (b) Acoplado ao computador (programa Spectra Suite);
- (c) Osciloscópio da *Lecroy*, Modelo *WaveRunner Xi*,
resolução de 1Ghz e 5GS/s. 28
- Figura 28:** Esquema do arranjo utilizado nos experimentos. 29
- Figura 29:** Espectro de emissão de laser randômico pela solução de rodamina 6G a 10^{-4} M, em etileno glicol com rutila (TiO_2), como centros espalhadores. 30
- Figura 30:** Características do pó de esmalte dental bovino:
- (a) Pó fino obtido com broca de tungstênio (Modelo *Maxicut* n° 251, MEISINGER, Germany), montada em peça de mão em micromotor odontológico (INTRAMatic 181 DBN, KAVO DO BRASIL, Ind. & Com. Ltda).
- (b) Emissão de laser randômico pela solução de rodamina 6G em etileno glicol a 10^{-4} M, com pó de esmalte dental bovino. 31
- Figura 31:** (a) Emissão de fluorescência pela rodamina 6G;
- (b) Posicionamento da amostra dental na plataforma do arranjo;
- (c) Bombeio da amostra pelo $\lambda = 532$ nm;
- (d) Emissão de fluorescência pela amostra dental infiltrada com rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol. 32
- Figura 32:** Espectro de fluorescência da amostra de esmalte hígido e lixada, infiltrado com rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol. 33

- Figura 33:** Espectro de fluorescência retroespalhada na amostra de esmalte dental hígido e sem lixar, infiltrada por solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol. 34
- Figura 34:** Espectros de fluorescência comparativo para as diferentes concentrações de rodamina 6G em etileno glicol. Em **preto**: o sinal foi retroespalhado. Em **vermelho**: O sinal foi coletado muito próxima à amostra. 34
- Figura 35:** Espectros dos sinais emitidos pela amostra dental hígida e sem lixar, Infiltrada com rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ em etileno glicol para diferentes posicionamentos da amostra na plataforma do arranjo do laser de bombeio. 35
- Figura 36:** Sinal detectado ao utilizar a amostra demineralizada. 36
- Figura 37:** Espectro de emissão da amostra dental hígida. Destaque para a emissão em 548 nm, presente para determinadas inclinações do filtro dicróico. 36
- Figura 38:** Fibras ópticas utilizadas.
- (a) Monomodo de 5 μm de diâmetro de núcleo, resolução de 0,3 nm;
 - (b) Multimodo de 200 μm , resolução de 3,4 nm;
 - (c) Multimodo de 50 μm , resolução de 1,0 nm. 38
- Figura 39:** Novo posicionamento dos componentes do arranjo do laser de bombeio. Aproximação da fibra óptica, filtro, lente convergente e amostra ao foco. 39

Figura 40: Emissão de laser randômico da amostra dental hígida

e sem lixar para diferentes localizações desta.

(a) FWHM = 19,54 nm; **(b)** FWHM = 8,12 nm;

(c) FWHM = 5,74 nm; **(d)** Perfil especial do laser randômico

Emitido por esta amostra

40

Figura 41: Emissão de laser randômico pela amostra dental

desmineralizada e sem lixar, em diferentes localizações desta.

(a) FWHM = 19,81 nm; **(b)** FWHM = 12,22 nm;

(c) FWHM = 9,49 nm; **(d)** FWHM = 5 nm.

41

Figura 42: Emissão de laser randômico pelas amostras submetidas

a solução desmineralizante (cedidas pela Profa. Dra. Ilka Tiemy Kato).

(a) Amostra com simulação de cárie, FWHM = 25,81 nm;

(b) Amostra hígida, FWHM = 26,27 nm.

42

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	nanometros
ps	picosegundos
Hz	Hertz
DMSO	dimetilsulfóxido
Nd:YAG	óxido de ítrio-alumínio dopado com neodímeo
Ti:Safira	titânio-safira
KHz	kiloHertz
µm	micrometro
MEV	microscópio eletrônico de varredura
mm	milímetros
pH	potencial hidrogeniônico
λ	comprimento de onda
SH	segundo harmônico
W	Watts
ns	nanosegundos
mJ	miliJoules
Cr	chromo
KTP	KTiO(PO ₄) - fosfato de potássio - titânio
e-o-e	extraordinário-ordinário-extraordinário
MW	megaWatts
GHz	GigaHertz
GS	“gigasamples” por segundo
FWHM	“full width at half maximum”, (largura a meia-altura)
g/mol	gramas por mol
psi	libra por polegada quadrada

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a odontologia tem se beneficiado com o desenvolvimento de novos equipamentos e novas técnicas para o diagnóstico precoce de muitas patologias da mucosa oral como tumores malignos e também de outras menos agressivas, porém de grande importância para a saúde bucal como as lesões de cárie incipientes e que não permitem acesso óptico direto¹. Novos equipamentos também têm sido desenvolvidos assim como novas técnicas para operá-los, objetivando o tratamento das várias patologias nas diversas áreas odontológicas onde se destacam as terapias com lasers de alta e baixa intensidade de potência².

No que diz respeito às técnicas de diagnóstico, isso tem sido possível graças ao estudo do espectro de fluorescência de alguns materiais que possuem a propriedade física de re-emitir a luz que lhes foi incidida em forma de luminescência. O uso desta técnica, não se limita somente a área de diagnóstico, mas também tem sido usada em dentística restauradora para o estudo de distribuição e penetração de sistemas adesivos na estrutura dental e de alguns compósitos^{3,4,5}, bem como para análise de micro-infiltração e fendas na interface dente–restauração com o auxílio de algumas substâncias marcadoras ou corantes orgânicos que possuam a propriedade de fluorescência⁶.

Na área da nanotecnologia as pesquisas estão avançando no desenvolvimento de equipamentos diagnósticos que possam ser de auxílio nas ciências da vida. Entre eles estão recentes pesquisas sobre a possibilidade da amplificação do sinal luminoso do feixe emitido por alguns tecidos biológicos, característica de laser randômico^{7,8}.

Possuindo os mesmos princípios de funcionamento do laser convencional, o laser randômico difere deste por não possuir uma cavidade óptica. Ocorrendo em meios altamente difusos, o mecanismo responsável pela emissão laser é o múltiplo espalhamento da luz ao longo de canais por onde esta é amplificada apresentando ainda interferências construtivas. Em analogia ao laser convencional estes canais são denominados “microcavidades”⁹. A ação laser randômica tem sido observada em vários materiais dentre eles: os pós semi-condutores, filmes finos nano-estruturados, certos polímeros, corantes laser e cerâmicas^{10,11,12}. Tem sido também demonstrado que os lasers randômicos possuem características únicas espectrais¹⁰, temporais¹¹ e de ordem prática^{12,13}.

Por se tratarem de microcavidades formadas aleatoriamente a direcionalidade da luz não é mantida¹⁴. Uma vez que o caminho percorrido pela luz através dos elementos espalhadores está fortemente relacionado às propriedades estruturais do meio de ganho randômico, o seu espectro de emissão quando coletado através de um espectrômetro, pode ser utilizado para se extrair informações estruturais de amostras de certos materiais biológicos^{7,8}.

Alguns tecidos malignos, por exemplo, apresentaram outras linhas de emissão laser randômico quando comparadas às linhas emitidas pelos tecidos indenes de um mesmo órgão⁸. Uma excelente aplicação do laser randômico na área biomédica seria a sondagem das características e propriedades estruturais de tecidos biológicos singulares tais como o tecido ósseo que é um nanocompósito constituído por uma fase mineral (cristais de hidróxiapatita), e uma matriz orgânica (proteínas do colágeno)¹⁵, cujos espectros de emissão também apresentam linhas de emissão laser randômico diferentes para o bombeio incidente em diferentes regiões da amostra, o que sugere um possível método diagnóstico capaz de sondar os mecanismos de pré-fratura óssea ainda em escala nanométrica⁷.

Por ser o tecido dental composto por uma fase mineral de dimensões nanoescalares constituída pelos cristais de hidróxiapatita e por uma matriz orgânica¹⁵, pode-se esperar que o laser randômico, seja passível de ser emitido por ele e eventualmente possa apresentar outras linhas de emissão quando da ocorrência de sutis desorganizações teciduais, como a cárie dental, quando esta se encontrar ainda em nível nanoescalar, diferenciando-a do tecido sadio.

Essas novas investigações podem nos levar, eventualmente, a uma técnica de diagnóstico por imagem em tecidos dentais, bem como em outros tecidos bucais que apresentem pelo menos uma dimensão nanométrica, podendo identificar várias patologias de forma extremamente precoce, prevenindo um dano possivelmente irreparável no futuro.

Por constituir-se de uma investigação científica, cujo objetivo é a verificação de comportamentos nunca antes investigados em relação à interação da luz com o esmalte dental, no presente trabalho foi utilizado um corante laser ativo, a rodamina 6G, não compatível com estudos “in vivo”, porém os resultados aqui obtidos podem nos levar à utilização futura de meios lasers líquidos os quais sejam compatíveis com estudos no esmalte dental humano.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo verificar, “in vitro”, se o esmalte dental bovino é passível de emitir laser randômico e se a ação do laser randômico emitido é capaz de diferenciar desorganização tecidual, sendo que os parâmetros verificados foram:

- 1- A capacidade de difusão do corante laser ativo rodamina 6G no esmalte dental.
- 2- O limiar de ação laser.
- 3- O estreitamento espectral da linha de emissão
- 4- Os detalhes do espectro

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Laser convencional e laser randômico

Os lasers convencionais são dispositivos que utilizam processos que amplificam o sinal luminoso e consistem de um meio ativo que é local onde ocorre a emissão, e um conjunto de espelhos que possibilitam a retroalimentação da luz para que o feixe luminoso possa ser continuamente amplificado (**Figura 1**). O feixe laser emitido nestas condições possui propriedades únicas como frequências de emissão mais estreitas quando comparado com outras fontes como lâmpadas ou velas, sendo que sua intensidade também é muito maior. Possuem alto grau de colimação, sendo que podem ser obtidos pulsos de curta duração^{16,17}.

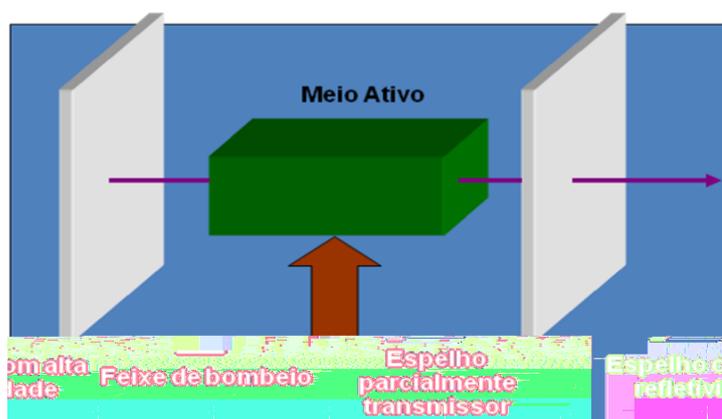


Figura 1: Laser convencional. O meio ativo laser é posicionado entre dois espelhos sendo que um deles é parcialmente reflexivo. O meio ativo quando submetido ao feixe de bombeio ou qualquer outra fonte de excitação, emite radiação laser pelo espelho parcialmente transmissor a partir do momento que as perdas do sistema se tornarem maiores que os ganhos.

No laser randômico a cavidade convencional é substituída por elementos espalhadores que juntamente com o meio de ganho levam a uma emissão estimulada de radiação. Assim, não existem espelhos, há somente a fonte de excitação e o meio ativo para a obtenção da emissão laser. Apesar do efeito do laser randômico ter sido descrito teoricamente por Letokhov¹⁸ em 1967, sua emissão só foi observada experimentalmente por Gouedard *et al*¹⁹ em 1993, utilizando um pó de cloreto de neodímio hidratado ($\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), através da observação do estreitamento espectral (**figura 2(a) e (b)**) e emissão de pulsos com curta duração. Foi observado nos experimentos com o laser randômico que o múltiplo espalhamento da luz não funciona como um mecanismo de

retroalimentação, na verdade, o que ocorre nesses meios é a permanência da luz no material por tempo suficiente para que a amplificação seja eficiente. Assim, o sinal não é refletido como seria entre dois espelhos e sim espalhado centenas de vezes antes de sair do meio¹² de forma que os ganhos se tornem maiores que as perdas no sistema o que vem a ser o princípio de uma emissão laser (**Figura 2(c)**). Sendo o espalhamento da luz um efeito totalmente aleatório, utiliza-se o termo randômico para descrição desse tipo de emissão laser^{13,20}.

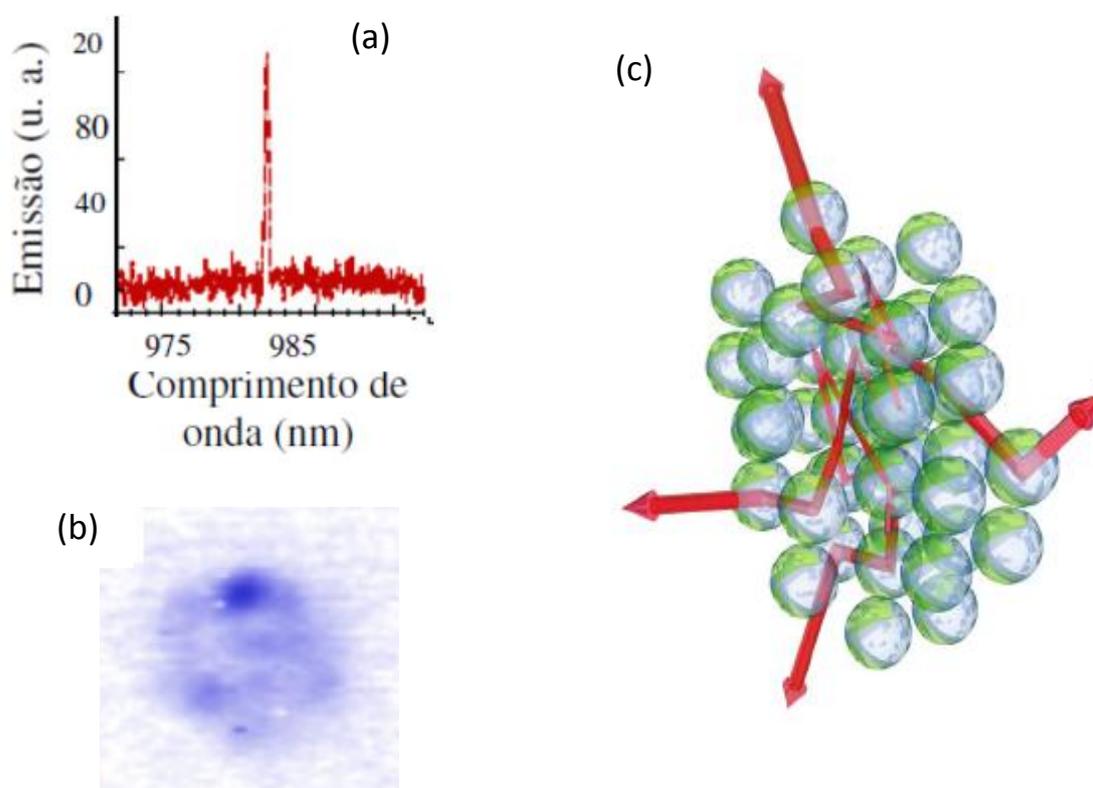


Figura 2: Características do laser randômico. (a) Perfil espectral da emissão do laser randômico para microaglomerados de ZnO; (b) Distribuição da intensidade de emissão para o mesmo composto; (c) Esquema de uma emissão de laser randômico. H. CAO, (2005).

Na área biomédica, Polson e Vardeny⁸ (2004), submeteram amostras de tecido intestinal e renal humanos, infiltrados com o corante laser ativo rodamina 6G ao bombeio com um laser de Nd:YAG, operando no comprimento de onda de 532 nm, cuja largura do pulso foi de 100 ps e a taxa de repetição de 100 Hz e descobriram que os tecidos malignos apresentavam muito mais

linhas de emissão de laser randômico quando comparados aos tecidos indenes de um mesmo órgão.

Já na área de diagnóstico em ortopedia as propriedades ósseas microescalares vêm sendo intensamente estudadas visando uma melhor compreensão dos mecanismos que levam as deformações e fraturas em termos de plasticidade. No entanto os mecanismos de danos que precedem as fraturas e as deformações são ainda relativamente inexplorados, em parte devido às atuais limitações técnicas que visam estudar as propriedades estruturais ósseas a nível nanoescalar de uma forma não destrutiva⁷. A propagação da luz no tecido ósseo pode ser fortemente influenciada pelo espalhamento múltiplo, podendo potencialmente resultar em algum grau de confinamento da luz. Assim, os espectros de emissão de um laser randômico podem ser extremamente sensíveis às sutis mudanças ou flutuações do índice de refração da nanoestrutura das microcavidades ósseas autoformadas⁷. Como primeiro passo para testar essa viabilidade para as características do tecido ósseo, Q. Song *et al.*⁷ (2010), demonstraram a ação laser randômica para esse tecido infiltrado com o corante laser ativo rodamina 800 em DMSO ou etanol, bombeado por um laser de Ti:Safira no comprimento de onda de 690 nm, largura do pulso de 100 ps e taxa de repetição de 1 KHz e demonstraram também a viabilidade de que o estreitamento dos picos de emissão laser possam, potencialmente, serem utilizados como sensíveis detectores de mudanças estruturais em dimensões nanométricas (**Figura 3**).

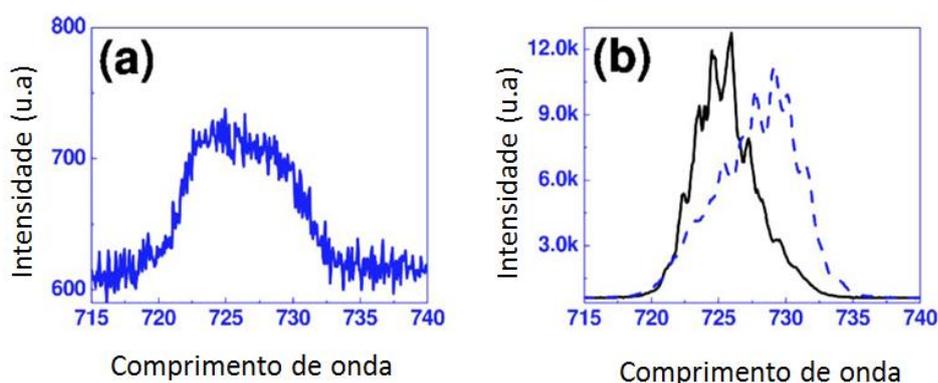


Figura 3 (a) Espectro de emissão do corante laser ativo (rodamina 800); (b) Espectros de emissão de laser randômico para diferentes posicionamentos da de uma amostra de tecido ósseo. Q. Song *et al*, Randon lasing in bone tissue, 2010.

Extrapolando os resultados obtidos para o laser randômico em tecido ósseo podemos esperar grande probabilidade dos tecidos dentais humanos (esmalte e dentina), também emitirem laser randômico quando submetidos a um meio de ganho altamente desordenado como o corante laser ativo rodamina 6G, uma vez que as características do esmalte dental e dentina humana assemelham-se muito as do tecido ósseo¹⁵.

3.2 O esmalte dental

O esmalte dental é uma estrutura acelular sendo a camada mais superficial e visível do órgão dental bem como a mais mineralizada e a mais dura do corpo humano. Quando clinicamente sadio, apresenta-se translúcido, refletindo a cor branca amarelada da dentina subjacente¹⁵.

Compondo-se aproximadamente por 95% de material mineral, 2% de material orgânico e 3% de água em peso^{21,22}, o seu conteúdo mineral é constituído principalmente por cristais de apatita firmemente unidos cujo distanciamento um dos outros é dado através de finos espaços intercrystalinos os quais são preenchidos por água e material orgânico constituído em sua maioria por proteínas e lipídeos²³ (**Figura 4**). A matriz orgânica do esmalte é reduzida em relação à matriz orgânica da dentina, sendo predominantemente formado pela matriz inorgânica²⁴.

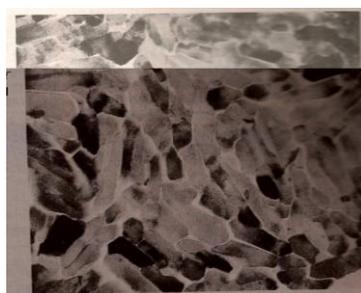


Figura 4: Corte transversal de cristais de hidróxiapatita no prisma de esmalte humano. Os cristais estão densamente arranjados e são de forma irregular (aproximadamente x 168.000, MEV), De Frazier, P.D.: J. UI-trastruct. Res. **22:** 1, 1968).

Os finos espaços intercrystalinos formam poros que permitem a passagem de pequenas moléculas como ácido láctico e também íons como hidrogênio e cálcio²⁵, assim esses microporos preenchidos por água e material orgânico conferem a esse tecido vias de difusão^{26,27,28}.

O índice de refração do esmalte dental é de 1,64 para o comprimento de onda de 532 nm quando envolto por água, conferindo-lhe sua translucidez característica²⁹. Os cristais de apatita encontrados no esmalte são semelhantes à hidróxiapatita mineral, porém apresentam inclusões de carbonato, sódio, flúor, magnésio, potássio, cobre, cloro, ferro, manganês, enxofre, chumbo, e outros íons que fazem da apatita biológica uma forma impura da hidróxiapatita mineral^{15,22}.

Os cristais de hidróxiapatita que tem como fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, possuem em média 50 nm de largura em corte transversal e mais de 100 nm de comprimento, sendo reunidos repetitivamente numa organização de aproximadamente 1000 cristais que originam os prismas de esmalte²² (**Figura 5**). Cada cristal é circundado por uma camada de água firmemente ligada a qual pode ser removida apenas quando o esmalte é aquecido a 600 °C, isso porque a assimetria e a grande área superficial dos cristais de hidróxiapatita conferem um forte campo elétrico que atrai íons e moléculas eletricamente carregados, entre eles a água³⁰. As proteínas que integram a estrutura do tecido são a enamelinina e amelogenina^{31,32}.

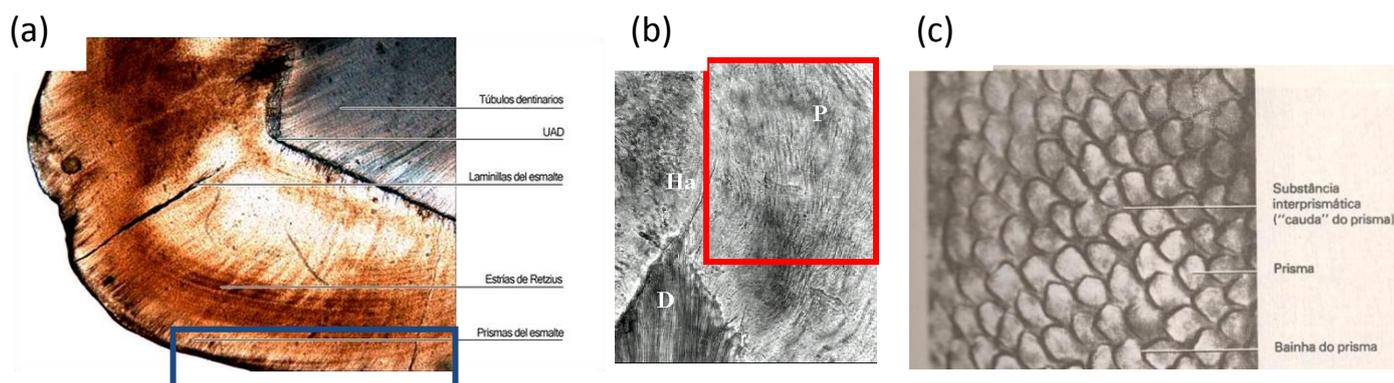


Figura 5: Prismas de esmalte: **(a)** Em lâmina descalcificada (microscopia óptica de luz polarizada). **(b)** Microscopia eletrônica de varredura – MEV, aproximadamente x 100.000. **(c)** Corte descalcificado de esmalte humano de um germe dentário. Os prismas que são cortados transversalmente lembram escamas de peixe (S.N. BHASKAR; 10ª, Edição, 1989).

Subjacente ao esmalte dental encontra-se a dentina, tecido conjuntivo avascular, mineralizado, especializado, que forma o corpo do órgão dental, suportando e compensando a fragilidade do esmalte^{33,34}, sendo recoberta pelo esmalte em sua porção coronária e pelo cimento em sua porção radicular. Na superfície interna delimita a cavidade pulpar, onde se aloja a polpa dentária^{15,22} (**Figura 6**).



Figura 6: Esquema do órgão dental humano. O esmalte dental é suportado e sua fragilidade compensada pela dentina subjacente. (Mariana Araguaia, graduada em biologia- Mundo Educação).

Constituindo a maior massa do dente e lhe dando forma, a dentina é caracterizada como sendo um tecido duro com túbulos em toda sua espessura^{15,22,34}. Parecendo-se muito com o osso³⁵, conforme pode ser observado na **Figura 7**.

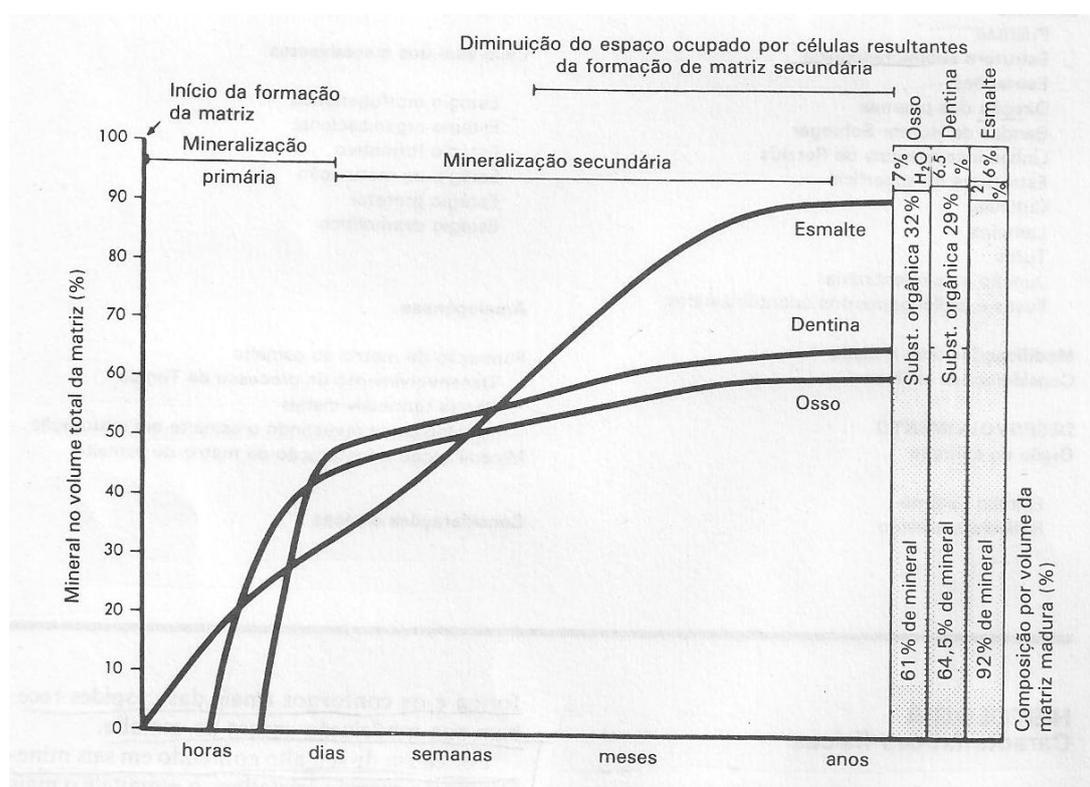


Figura 7: Formação, mineralização e maturação de alguns tecidos mineralizados. (S. N. BHASKAR, p. 55, 10ª. Edição, 1989).

3.3 Etiologia e mecanismo da doença cárie

Há milênios, o homem deixou de viver exclusivamente da natureza, quando modificou, de alguma maneira, a forma natural dos alimentos. Neste momento gerou-se um desequilíbrio da biodiversidade bucal e o processo de desmineralização e remineralização, em condições não naturais, favoreceu o desenvolvimento de lesões na estrutura dentária chamadas de cárie dental. É importante considerar que na situação de equilíbrio produzida por essa biodiversidade, a cárie dental é inexistente, devendo, por isso, ser considerada anormal³⁶.

A cárie dental é uma doença multifatorial que ocasiona a perda de minerais dos tecidos duros dentais (esmalte, dentina e cimento), e é dependente do biofilme bacteriano e de carboidratos fermentáveis^{36,37}. A produção de ácido pela microbiota cariogênica ocasiona a perda de cálcio e fosfato dos tecidos mineralizados levando à sua destruição³⁸.

Resumidamente os principais fatores responsáveis pela doença cárie são quatro e ocorrem concomitantemente, sendo eles: a placa bacteriana ou biofilme dental; um substrato que ofereça nutrientes para essas bactérias; um hospedeiro suscetível (esmalte, dentina) e o tempo de interação entre esses três fatores³⁹ (**Figura 8**).

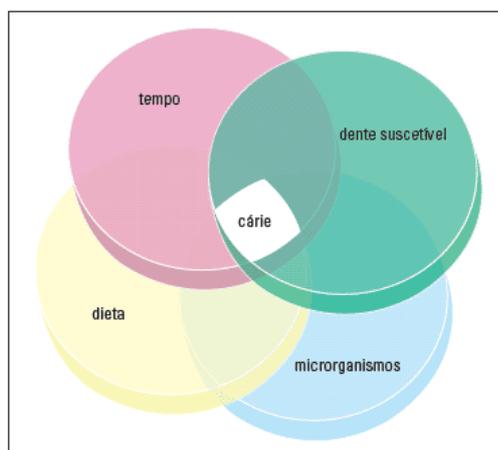


Figura 8: Fatores responsáveis pela doença cárie: o tempo, dente suscetível, a dieta e microorganismos. OLIVEIRA LIMA, J. E.; 2007.

A cárie dental é um processo dinâmico no qual há a alternância de perda e ganho de minerais, sendo uma doença que não se limita a uma região e que tem como sinal clínico a destruição localizada dos tecidos duros, ou seja, a lesão de cárie²⁹.

3.4. A lesão de cárie em esmalte

O estágio inicial de uma lesão de cárie é chamado de “mancha branca” sendo caracterizado por uma dissolução parcial do esmalte promovida pelos ácidos presentes no meio oral. A lesão branca aparece clinicamente devido à mudança do índice de refração pela perda mineral^{28,40}.

Alterações na porosidade do esmalte conduzem a mudanças nas propriedades ópticas do tecido de forma que gradualmente o tecido torna-se menos translúcido, o que clinicamente pode ser observado como alterações esbranquiçadas (opacas), características notáveis nas lesões de cárie incipiente^{28,40}, com mostrado na **Figura 9**.



Figura 9: Lesão de cárie incipiente em esmalte dental humano (lesão de mancha branca). MATOS, A. B.; TURBINO, M. L.; MATSON, E. Efeitos das técnicas de microabrasão no esmalte. Estudo em microscopia de varredura.

A translucidez do esmalte relaciona-se ao fenômeno óptico que depende do tamanho dos espaços intercrystalinos. O conteúdo de preenchimento desses microporos desempenha fundamental participação no grau de translucidez observado. A discreta diferença entre o índice de refração da hidroxiapatita (1,64) e da água (1,33), para a luz no comprimento de onda do visível, não afeta esta propriedade do tecido. Contudo a dissolução dos cristais resulta no aumento dos espaços intercrystalinos, que ao serem preenchidos pelo ar, por ocasião da secagem da superfície, confere menor translucidez ao esmalte devido a maior diferença entre o índice de refração da hidroxiapatita e o do ar que é aproximadamente 1,0^{28,40}.

Na lesão de mancha branca o conteúdo mineral do esmalte está diminuído e sua organização estrutural modificada com o aumento do conteúdo orgânico e resistência física reduzida. A superfície do esmalte não é absolutamente lisa apresentando minúsculas ondulações devido às estrias incrementais de Retzus^{15,40}. Sua superfície ondulada apresenta inúmeros microporos que se comunicam com os espaços existentes entre os cristais que compõem os prismas de esmalte^{15, 40}. Nos espaços intercrystalinos circula o líquido adamantino que hidrata os cristais e leva os íons da superfície do esmalte para o seu interior promovendo alterações bioquímicas e estruturais o que justifica a sua remineralização através de substâncias químicas apositonadas em sua superfície. Por outro lado, com a permanência dos fatores agressivos, os microporos aumentam muito de tamanho e os cristais ficam tão delicados e desorganizados que a superfície do esmalte cede e as cavidades surgem naturalmente⁴⁰.

Todas essas modificações de redução do volume dos cristais e aumento dos microporos do esmalte *estão ocorrendo abaixo da camada superficial do esmalte*. Assim a lesão de mancha branca é composta por uma camada *superficial* altamente mineralizada, com espessura aproximada de 20 µm a 50 µm e por uma camada *subsuperficial*, com perda mineral de aproximadamente 20% a 50% em profundidade chamado “*corpo da lesão*”²⁹. As lesões de mancha branca são divididas em quatro zonas bem distintas como mostrado na **Figura 10**.

1- A zona translúcida que é a mais interior a lesão tendo aproximadamente 40 µm de espessura²³, possui índice de refração similar ao do esmalte podendo ser examinada somente

através de cortes longitudinais ao corpo da lesão. É caracterizada por uma perda mineral de 1,25% e um pequeno número de grandes porosidades³⁹.

2- A zona escura, que varia muito em tamanho e apresenta perda mineral em torno de 6%³⁹. Seus poros apresentam menor tamanho, porém estão presentes em maior porcentagem (5% a 10%).

3- O corpo da lesão, que representa uma perda mineral ao redor de 24% sendo a maior zona da lesão de mancha branca²³. É caracterizada por 25% a 50% de porosidades, com grande destruição de tecido e, eventualmente, cavitações.

4- A zona superficial, é a camada mais externa da lesão de mancha branca, apresentando espessura média de 20 μm a 100 μm , sendo mais espessa nas lesões inativas e mais fina nas lesões ativas. A porosidade nesta zona é de aproximadamente 1% a 2%, muito semelhante ao tecido hígido, sendo que esta camada persiste até o momento da cavitação³⁹.

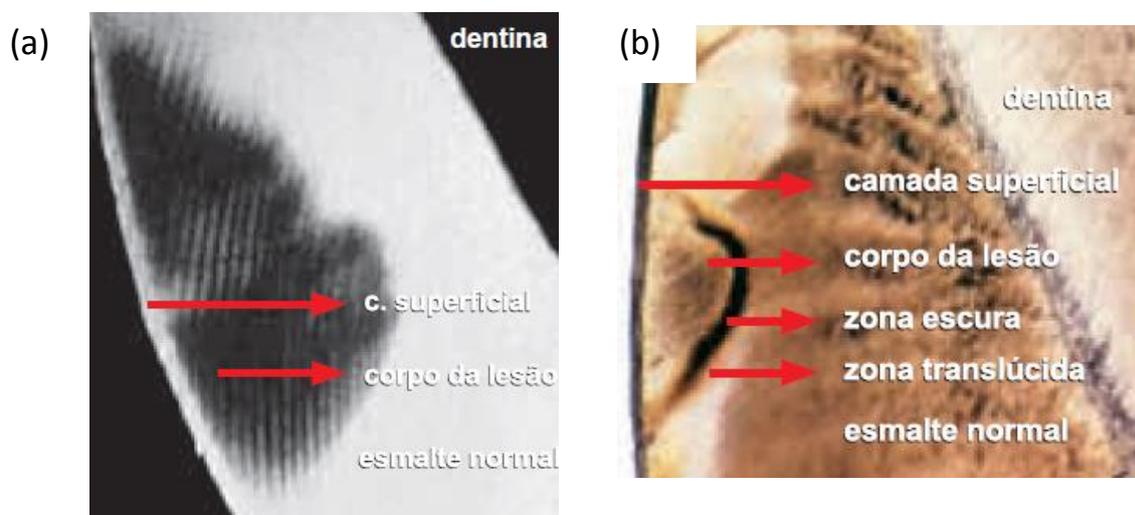


Figura 10: Lesão de cárie incipiente (mancha branca). **(a)** Radiomicrografia: camada superficial da mancha branca e o corpo da lesão mais interiormente na subsuperfície **(b)** Esquema. (Lindi, 1966).

As **Figuras 11(a) e 11(b)** mostram respectivamente o aspecto do esmalte dental sadio e com lesão de mancha branca respectivamente através da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

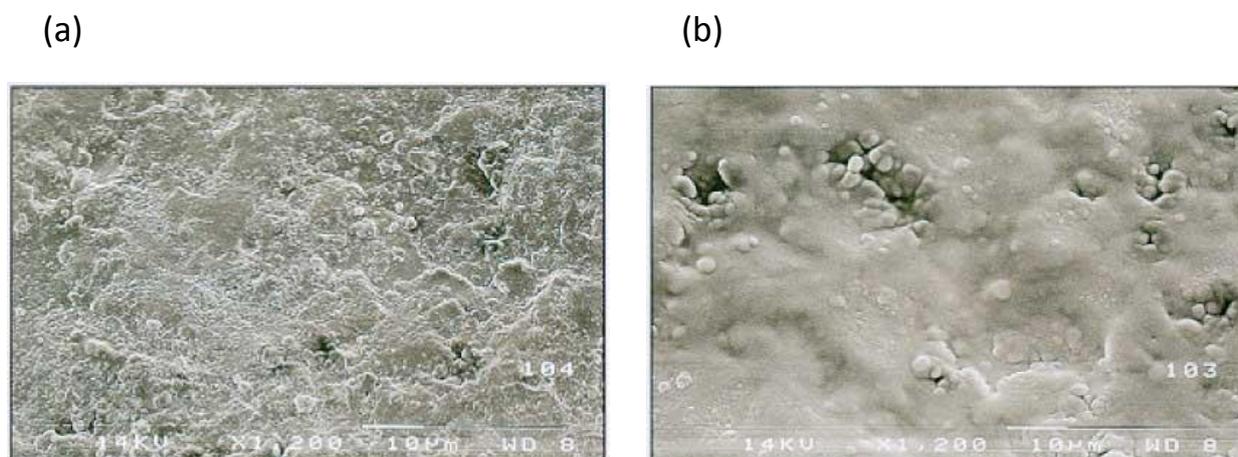


Figura 11: (a) Aspecto da superfície de esmalte dental humano sadio (aumento de 1200 x, MEV); (b) Aspecto inicial de lesão de mancha branca (aumento de 1200 x MEV). MATOS, A. B.; TURBINO, M. L.; MATSON, E. Efeitos das técnicas de microabrasão no esmalte. Estudo em microscopia de varredura.

Diante do exposto a respeito do laser randômico bem como das características do esmalte e da cárie dental, pode-se esperar que os tecidos dentais, sejam passíveis de investigações sobre a possibilidade da formação de microcavidades, com emissão e detecção de laser randômico, podendo este, potencialmente, vir a ser uma forma de diagnóstico para sutis mudanças nas nanoestruturas do esmalte dental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimento experimental

Neste estudo foram utilizadas 20 amostras de incisivos bovinos, hígidos, lavados e higienizados, sem aquecimento e sem uso de reagentes químicos para evitar alterações nos componentes orgânicos do esmalte tendo sido excluídos os elementos dentais que apresentavam trincas, manchas ou qualquer outro tipo de defeitos.

Estudos “in vitro”, têm demonstrado que o esmalte humano e bovino apresenta comportamento similar em condições de desmineralização e remineralização⁴¹, e mais recentemente foi mostrado que a dentina bovina pode substituir a humana em modelos “in situ”, que avaliam desafios cariogênicos⁴². A vantagem de se usar dentes bovinos e não humanos é que eles são mais fáceis de serem obtidos e manipulados³⁷.

As amostras constituíram-se de cortes transversais feitos em cortadeira Isomet Low Speed Saw (BUEHLER), com lâmina em forma de disco (Diamond Wafering Blade, Séries 15 HC diamond, 10,2 cm dia x 0,3 mm, n°. 4244), constantemente irrigados por água (**Figura 12 (a)**). Os cortes foram feitos na coroa dental utilizando-se o seu terço médio, nas dimensões de 5,0 mm por 10,0 mm. Desta forma as amostras apresentavam o esmalte e a sua dentina subjacente. Foram mantidas em “eppendorfs”, individualizadas e umidificadas com algodão e água deionizada à 5 °C, conforme mostrado na (**Figura 12 (b)**),

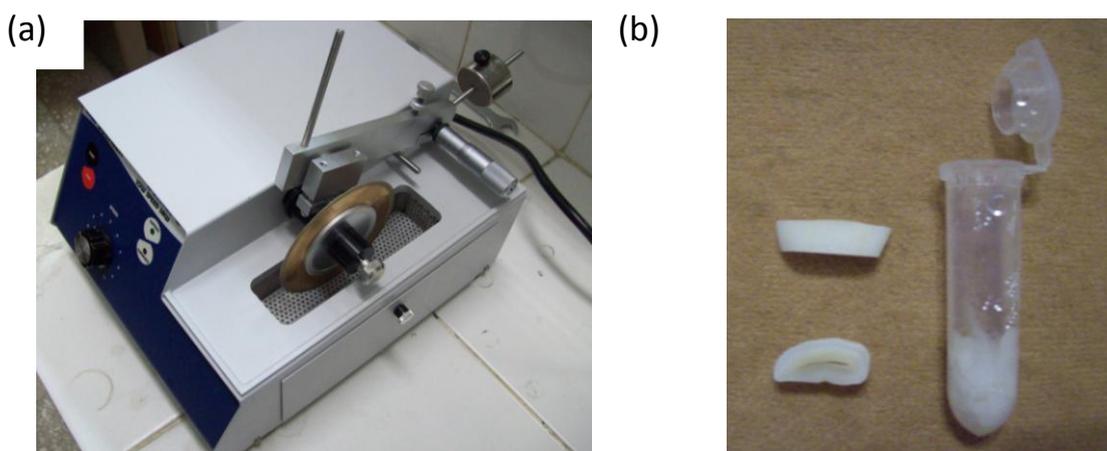


Figura 12 (a) Cortadeira Isomet Low Speed Saw (BUEHLER), montada com lâmina em forma de disco (Diamond Wafering Blade, series 15 HC diamond, 10.2 cm Dia x 0,3 mm, n°. 4244; **(b)** Amostras dentais bovinas em “eppendorf”, para armazenamento da amostra a 5°C.

Num primeiro momento as amostras foram submetidas ao processo de desmineralização através da aplicação de ácido fosfórico a 37% (marca Villevie), por 12 horas na superfície do esmalte dental bovino, para a formação de desorganização tecidual como mostrado na **Figura.13 (a)**, e foram utilizadas para o estabelecimento dos parâmetros referentes ao corante laser ativo rodamina 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$), que é o corante orgânico que foi usado neste experimento, (**Figura13 (b)**).

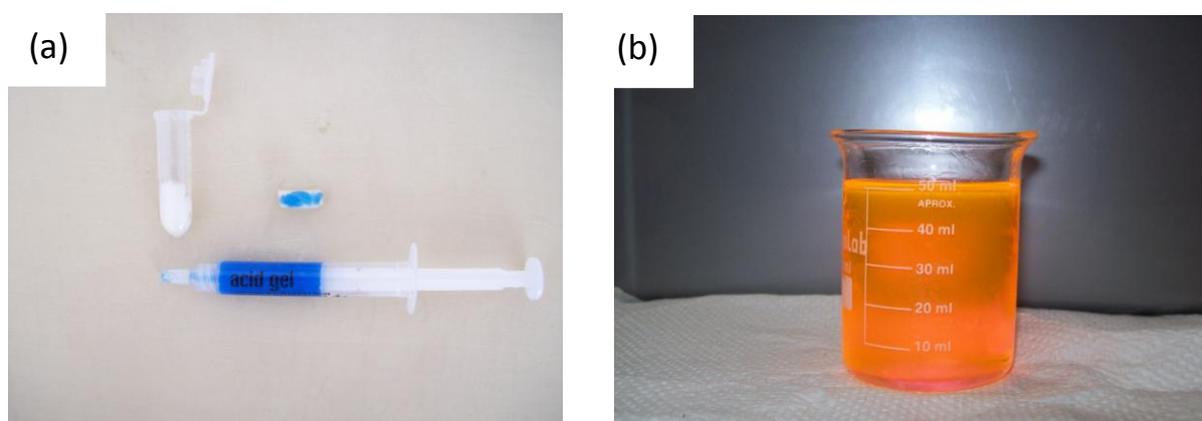


Figura13 (a) Processo de demineralização do esmalte bovino; **(b)** Corante laser ativo rodamina 6G a 0,0037% em volume em etileno glicol. ($10^{-4}M$).

Estas amostras piloto possibilitaram também que fosse estabelecido o melhor arranjo, alinhamento de espelhos, lentes e outros componentes referentes ao laser de bombeio, bem como a definição dos componentes, fibras e arranjos necessários para a coleta dos sinais das emissões a serem levadas ao espectrômetro, cuja finalidade é mostrar graficamente o possível sinal e emissão de laser randômico e também para o osciloscópio responsável pela visualização do perfil temporal da referida emissão.

Num segundo momento, caso fosse verificada a ocorrência de emissão de laser randômico para essas amostras piloto, as demais amostras deveriam ser submetidas a um modelo de ciclagem de pH para formação de uma lesão de mancha branca^{37, 43}. Os modelos de ciclagem de pH foram

desenvolvidos para avaliar a perda mineral e ganho mineral que ocorrem naturalmente no ambiente bucal, podendo simular o processo de cárie, entre outras coisas⁴⁴.

Os espécimes piloto foram então imersos na solução de corante laser ativo rodamina 6G a 0,0037% em volume, (10^{-4} M), tendo o etileno glicol como solvente^{13,45}, por um período que foi determinado experimentalmente, pois não existiam dados na literatura a esse respeito. Como o diâmetro da molécula da rodamina 6G é 1,24 nm⁴⁶, esperava-se que esta se difundisse uniformemente no esmalte dental através de suas microporosidades.

O experimento foi então iniciado testando-se a capacidade de difusão do corante laser ativo rodamina 6G em etileno glicol, nos tecidos dentais e objetivando o estabelecimento de sua concentração ótima.

4.1.1. Amostras utilizadas

4.1.1.1. Amostras dentais submetidas a simulação de lesão de cárie incipiente em solução desmineralizante.

Num primeiro experimento piloto foram usadas quatro amostras de dentes bovinos (cedidas pela Prof^a. Dr^a. Ilka Tiemy Kato). As amostras mediam 2,0 mm por 2,0 mm, sendo que duas delas apresentavam esmalte dental hígido e as outras duas apresentavam simulação de lesão cariiosa que foram formadas por meio da imersão das amostras em solução tampão de acetato subsaturado (2 mL/mm²), por 32 horas á 37°C. A solução desmineralizante foi preparada com tampão de acetato 0,05 M contendo: 1,28 mM Ca; 0,74 mM P; 0,03 µgF/mL em pH 5,0³⁷ Como bacteriostático foi adicionado 4,3 mmol/L timol⁴⁷. No preparo desta solução foram utilizados ácido acético (CH₃COOH), nitrato de cálcio [Ca (NO₃)], potássio hidrogenofosfato (KH₂PO₄) e fluoreto de sódio (NaF) (Merck KGaA, Germany).

As quatro amostras, foram imersas na solução de corante laser ativo rodamina 6G a 0,0037% em volume em etileno glicol, (concentração de 10^{-4} M), conforme experimento realizado por de Matos *et al.*⁴⁵, mostrado na **Figura 14**.



Figura 14 Amostras de esmalte dental bovino. **(a)** Amostra hígida; **(b)** Amostra submetida à solução demineralizante, (solução tampão de acetato subsaturado 2,0 mL/mm², por 32 horas a 37°C).

As amostras permaneceram imersas por 4 horas e meia, sendo que esse tempo foi arbitrário. Tanto o esmalte como a dentina ficaram expostos a solução e ao serem retiradas e secas, apresentaram-se coradas na parte dentinária e praticamente sem coloração no esmalte.

4.1.1.2. Amostras dentais submetidos a ataque ácido

Num segundo experimento, foram utilizadas cinco amostras de dentes bovinos de 5,0 mm por 10,0 mm. Sendo divididas da seguinte forma:

- Uma amostra de esmalte hígido e não lixado;
- Uma amostra de esmalte hígido e lixado;
- Uma amostra de esmalte desmineralizado e não lixado;
- Uma amostra de esmalte desmineralizado e lixado;
- Uma amostra casada e lixada, ou seja, metade da área da amostra 25mm² de esmalte desmineralizado e os outros 25 mm² de esmalte hígido.

As amostras desmineralizadas tiveram como objetivo simular uma grande desorganização tecidual para uma comparação entre os sinais emitidos. Essas amostras *não* representam simulações de mancha branca, uma vez que *não* se constituem modelos que mimetizem a perda e ganho mineral que ocorre naturalmente no meio bucal.

A amostra casada teve como objetivo a observação dos espectros emitidos pelo tecido dental hígido e o desmineralizado na mesma amostra. Caso estes espectros apresentassem

diferenças significativas poderia ser viável a utilização deste método para o diagnóstico de cáries incipientes.

A princípio resolveu-se lixar parte das amostras (Silicon Carbide Grinding Paper, 2500 BUEHLER e Microcut Silicon Carbide, Wet or Dry, P 4000 BUEHLER – USA), para obter-se uma superfície o mais plana possível, pois se acreditava que o sinal do cone de retroespalhamento ficasse mais colimado para superfícies planas, considerando que uma superfície rugosa causa espalhamento adicional do feixe retroespalhado. Outra razão para o lixamento das amostras foi descartar a possibilidade que o corante laser ativo rodamina 6G não se difundisse o suficiente em profundidade, uma vez que a lesão de mancha branca é *subsuperficial*, o que foi reproduzido nas amostras submetidas à solução demineralizante (**seção 4.1.1.1**), porém não nas descalsificadas com ácido fosfórico a 37%, uma vez que não se constituem em amostras com simulação de cárie através de modelos estabelecidos cientificamente.

A seguir, toda parte dentinária de todas as amostras foram recobertas com um verniz resistente a ácido (esmalte de unha Impala Tech – Laboratório Avamiller de cosméticos Ltda), e recobertas com cera Utilidade Wilson, (Polidental Ind. & Com. Ltda), (**Figura 15**). Foram então imersas em solução de rodamina 6G, na mesma concentração de 10^{-4} M em etileno glicol, pelo período de 4 horas e meia, quando então foram retiradas e secas com papel absorvente. As superfícies do esmalte dental de todas as amostras mostraram-se levemente corados nas suas bordas mais externas.



Figura 15: Amostra dental bovina, recoberta com verniz resistente a ácido e recoberta com cera utilidade Wilson.

4.1.1.3 Amostras dentais submetidas a ataque ácido alterando-se a concentração e o tempo de imersão em solução de rodamina 6G em etileno glicol.

Num terceiro experimento, já com alguns parâmetros estabelecidos, optou-se por fazer uma solução saturada do corante laser ativo rodamina 6G a 0,1% em volume em etileno glicol ($2,6 \times 10^{-3} \text{ M}^1$), como mostrado na **Figura 16**.

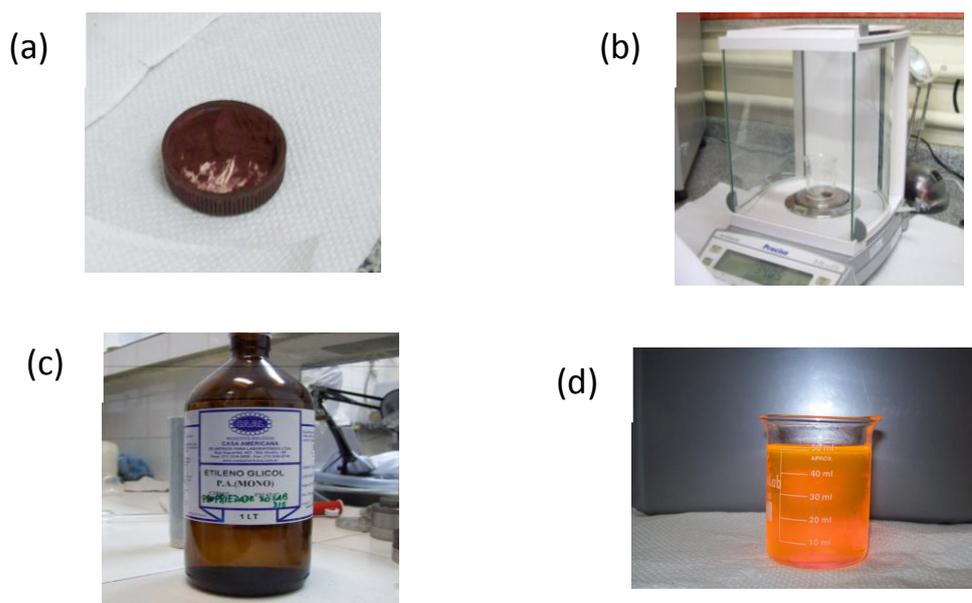


Figura 16: Manipulação do corante laser ativo rodamina 6G. **(a)** Pó de rodamina de dimensão nanométrica. **(b)** Balança de precisão. **(c)** Etileno glicol pró análise, Mono. **(d)** Solução saturada de rodamina 6G a 0,1% em volume em etileno glicol ($2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Foram utilizadas amostras com as mesmas características das utilizadas na seção **4.1.1.2**, sendo que, nesse caso toda parte dentinária de todos os espécimes foi envolvida com cera número 7 (Epoxyglass Ind. & Com. de Produtos Ltda.), pela a técnica de enceramento progressivo (**Figura 17 (a)**). Nessa técnica a cera é derretida em lamparina para fins odontológicos, através de um instrumento gotejador e aplicada na amostra a fim de impedir difusão da rodamina 6G através de suas bordas (como possivelmente tenha ocorrido com a cera utilidade), de forma que a difusão se desse somente pela superfície dental. Cada um dos espécimes foi então colocado em “ependorfs” individuais de 2,0 ml, preenchidos com a solução saturada de rodamina 6G ($2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$), (**Figura 17 (b)**) e armazenados em temperatura ambiente e no escuro¹.

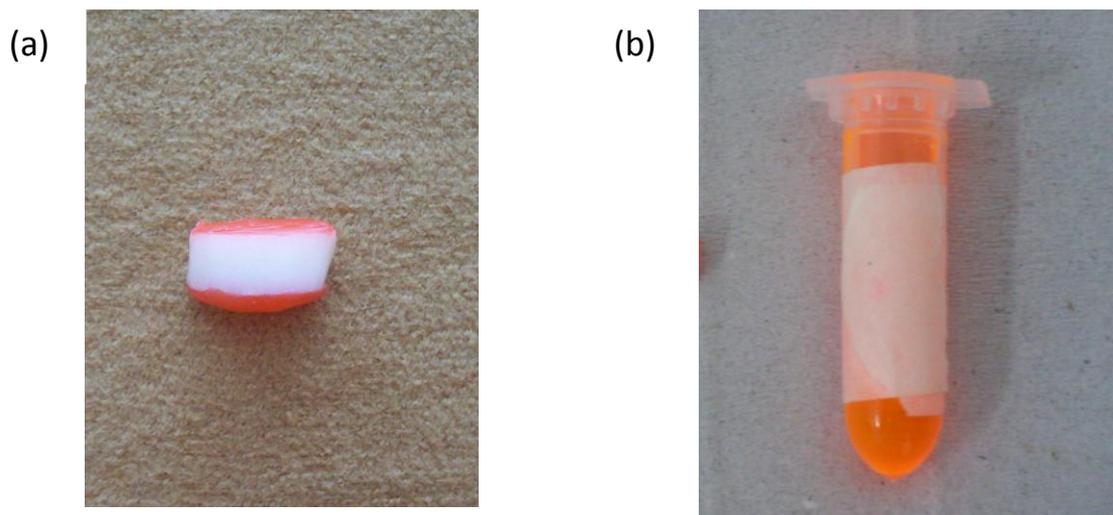


Figura 17 (a) Amostra envolta em cera nº7; (b) Amostras armazenadas individualmente em “eppendorfs” contendo solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}M$ em etileno glicol.

Ao serem retirados após 96 horas, os espécimes foram lavados em água corrente (o que não foi feito anteriormente), e secos com papel absorvente. Observou-se que os espécimes *não lixados* submetidos ou não a desmineralização apresentavam-se completamente corados pela solução de rodamina 6G. Já os espécimes que foram *lixados* incluindo a parte descalcificada da amostra casada, coraram muito pouco ou nada, conforme pode ser observado na **Figura 18**. Os espécimes voltaram para solução de rodamina 6G e permaneceram nas condições citadas acima até completar uma semana de imersão.



Figura 18: À esquerda amostras de esmalte dental bovino com e sem desmineralização e não lixadas. À direita amostras de esmalte dental bovino com e sem desmineralização lixadas. Acima, amostras desmineralizadas. Submetidas ao corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3} M$ em etileno glicol, após 94 horas de imersão.

Ao final de sete dias de imersão no corante as amostras foram novamente retiradas da solução, lavadas e secas com papel absorvente e mostraram uma maior difusão do corante no esmalte dental. A amostra casada e lixada que havia corado muito pouco se mostrou agora bem corada no lado hígido do esmalte e pouco corada no lado desmineralizado (**Figura 19**).



Figura 19: À esquerda amostras de esmalte dental bovino com e sem demineralização. No meio, amostra casada e lixada (com e sem demineralização). À direita amostras de esmalte bovino lixadas com e sem desmineralização. Submetidas ao corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M, em etileno glicol, após 7 dias de imersão.

4.1.2. O arranjo experimental

Em lasers randômicos, a emissão retroespalhada da amostra é comumente observada de forma que possa ser identificada alguma amplificação desta^{13,44}. Neste experimento o feixe laser de bombeamento utilizado foi gerado pela cavidade fabricada pela empresa Sino-Laser (Pequim, China), caracterizada como sendo um laser de Nd:YAG (óxido de ítrio alumínio dopado com neodímio), de $\lambda=1064$ nm, sendo que foi escolhido o SH (Segundo harmônico), desde laser de $\lambda=532$ nm, o qual se situa na banda de absorção da rodamina 6G como observado na **Figura 20**.

O espectro de absorção da rodamina 6G, **Figura 20(a)**, foi obtido utilizando um espectrômetro (modelo Cary 5000 - marca Varian), sendo que uma gota da solução de rodamina 6G a 0,1% em etilenoglicol foi colocada entre duas lâminas de microscópio e submetida a varredura para os vários comprimentos de onda. O espectro de emissão, **Figura 20(b)**, foi obtido com um fluorímetro cuja abertura da fenda de excitação foi de 3,0 mm e a de detecção de 2,0 mm.

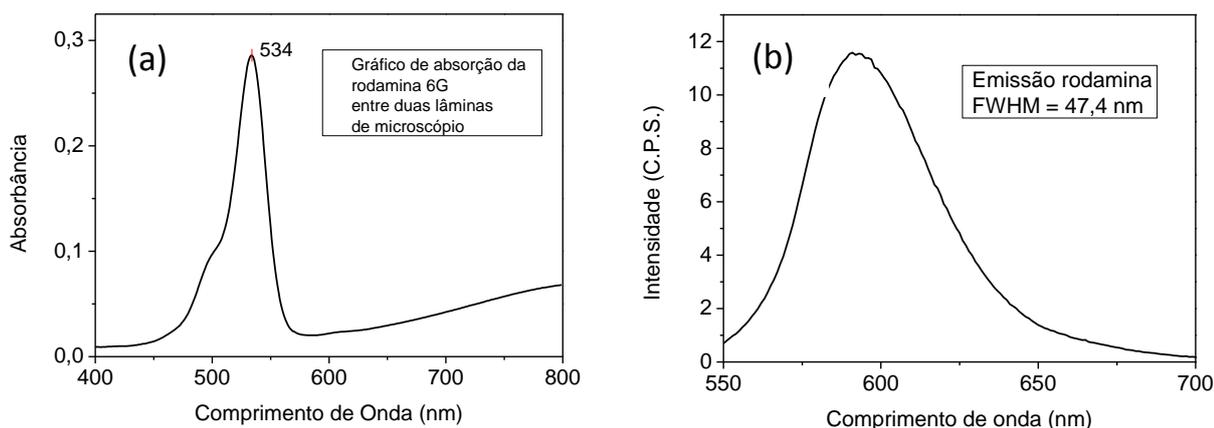


Figura 20: Características espectrais do corante laser ativo rodamina 6G. (a) Espectro de absorção da amostra, uma gota da solução foi colocada entre duas lâminas de microscópio e submetida ao espectrômetro *Carry 5000*; (b) Espectro de emissão da amostra obtido através de um fluorímetro.

O cristal de Nd:YAG (1 mol%), presente na região central do módulo (**Figura 21**) é bombeado transversalmente por meio de 12 diodos laser dispostos radialmente a 120 graus em torno do bastão com um total de 1200 W de potência. A emissão laser no comprimento de onda de 1064 nm é obtida após a utilização de uma cavidade de Fabry-Pérot (ressonador plano-paralelo possuindo um espelho HR1064 - alta refletividade - em uma de suas extremidades e sendo que sua outra extremidade permite 20% de transmissão para essa banda). A largura do pulso foi de 9,0 ns e a energia variou até 1,5 mJ por pulso, sendo que a taxa de repetição foi de 10Hz.



Figura 21: Cristal de Nd:YAG (1 mol%)

A presença de estados tripleto com longa vida para decaimento é reconhecido como o principal fator limitando a “performance” de lasers de corante e colocando restrições ao uso da fonte de bombeio a ser utilizada com estes meios^{46,48}. Em virtude das características do nível

triplete, existe sob condições da excitação uma depopulação do estado singlete no nível fundamental e a possibilidade de absorção de nível tripleto-triplete⁴⁸. Estes efeitos negativos aumentam com a duração do tempo de bombeio. Logo o ideal é utilizar pulsos curtos, mas intensos, como no caso de lasers chaveados.

Uma possibilidade para geração de lasers chaveados é a utilização de absorvedor saturável. Neste experimento foi utilizado o absorvedor de Cr^{4+} :YAG com 50% de transmissão. Desta forma foi possível a obtenção de um pulso com curta duração, cerca de 9,0 ns de duração, **Figura 22(a)**.

Um cristal de KTP (KTiOPO_4) tipo 2 (descreve o tipo de casamento de fase realizado, nesse caso e-o-e), com ajuste de fase crítico e 10 mm de comprimento foi posicionado extra cavidade para fazer a dobra de frequência do bombeio, obtendo-se assim o $\lambda=532$ nm, **Figura 22(b)**. Um máximo de 1,5 mJ por pulso foi obtido em $\lambda=532$ nm, com potência pico de bombeio de 0,2 MW.

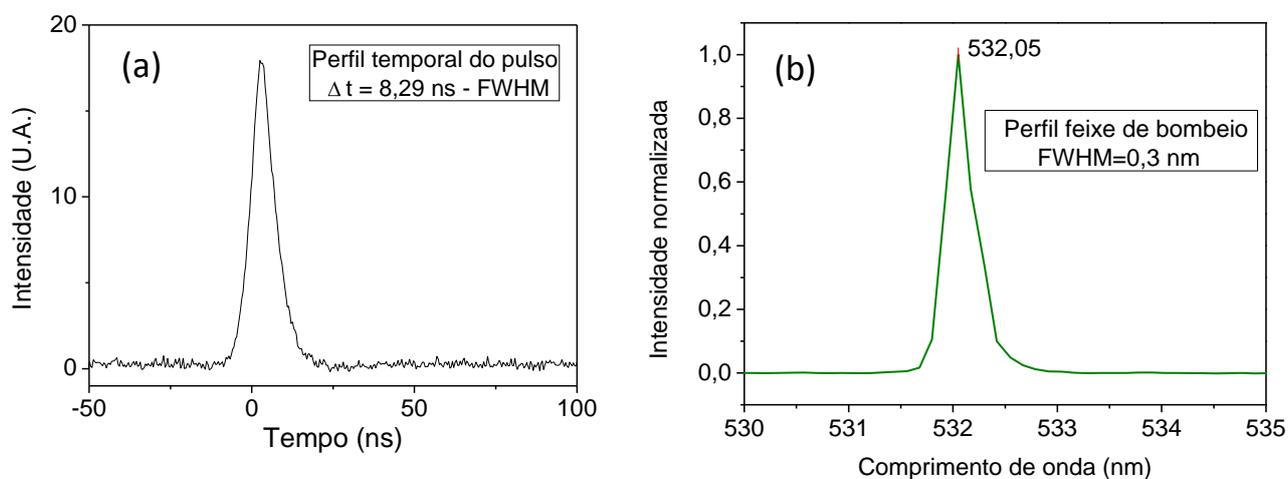


Figura 22: Características feixe de bombeio. **(a)** Perfil temporal do pulso chaveado medido com osciloscópio de 1 GHz e 5 GS/s e detector PIN com 160 ps de tempo de subida; **(b)** Perfil espectral para o mesmo pulso.

A **Figura 23** apresenta todo o arranjo montado para obtenção do laser de bombeio.

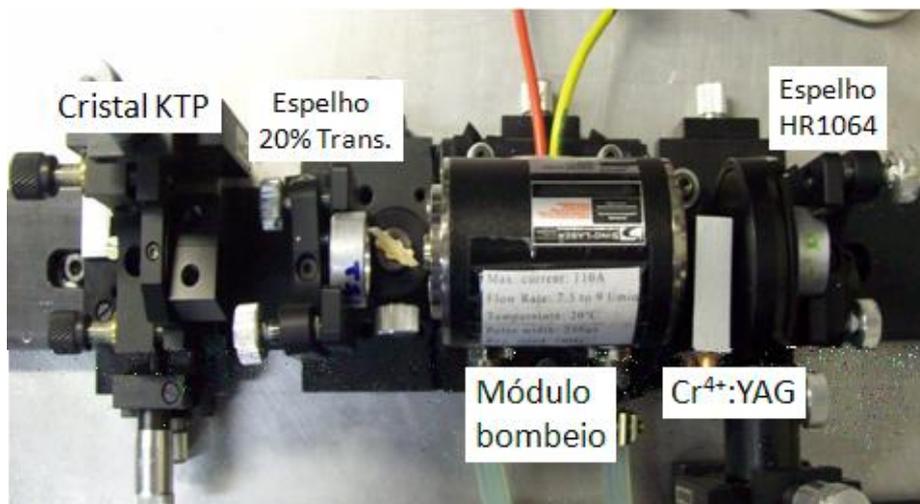


Figura 23: Arranjo do laser de bombeio.

A conversão do $\lambda=1064$ nm em $\lambda=532$ nm não é perfeita, por esta razão foi utilizado um separador harmônico para que apenas o $\lambda=532$ nm fosse utilizado no bombeio (**Figura 24(a)**). Anteriormente à amostra foi posicionada uma lente convergente com foco de 20 mm (**Figura 24(b)**). A **Figura 24(c)** mostra o detalhe da emissão do $\lambda=532$ nm.

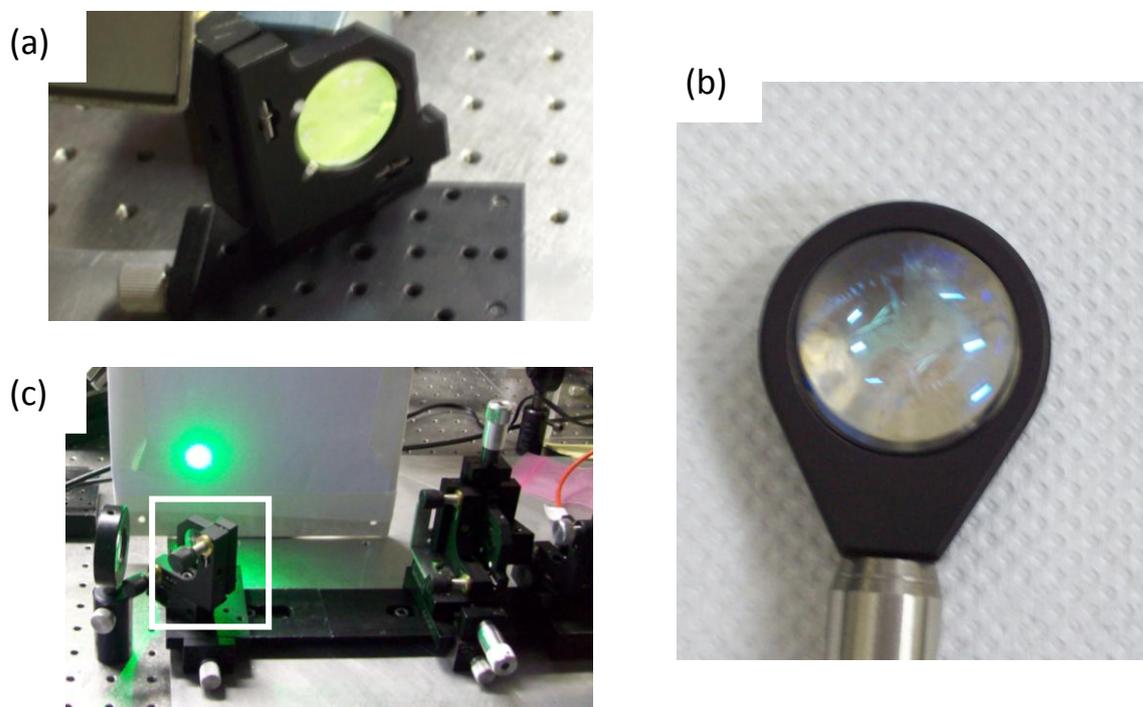


Figura 24: (a) Separador harmônico; (b) Lente convergente com foco de 20mm; (c) Emissão do $\lambda = 532$ nm

Após o bombeio, a luminescência retroespalhada do meio altamente dispersivo foi separada do feixe de bombeio utilizando-se um separador de feixes (**Figura. 25 (a) e (b)**) (espectro pode ser observado na **Figura 26(a)**). Em seguida foi analisada:

- Espectralmente: utilizando-se um espectrômetro *Ocean Optics*, Modelo: HR4000, com resolução espectral de 3,5 nm para fibra óptica com 200 μm e de 0,3 nm para fibra óptica com 5,0 μm de diâmetro de núcleo. Detectando comprimentos de onda no intervalo 235-750 nm (**Fig 27(a) e (b)**).

- Temporalmente: utilizando um fotodetector de Silício com resolução de 1,0 ns e um osciloscópio da *Lecroy*, Modelo WaveRunner Xi com resolução de 1,0 GHz e 5,0 Gs/s (**Figura 27(c)**).

Em frente ao sistema de detecção foi posicionado um filtro dicróico para que somente a emissão retroespalhada da amostra fosse transmitida (transmissividade para comprimentos de onda acima de 550 nm), **Figura 26(b) e (c)**. A **Figura 28** apresenta um esquema deste arranjo.

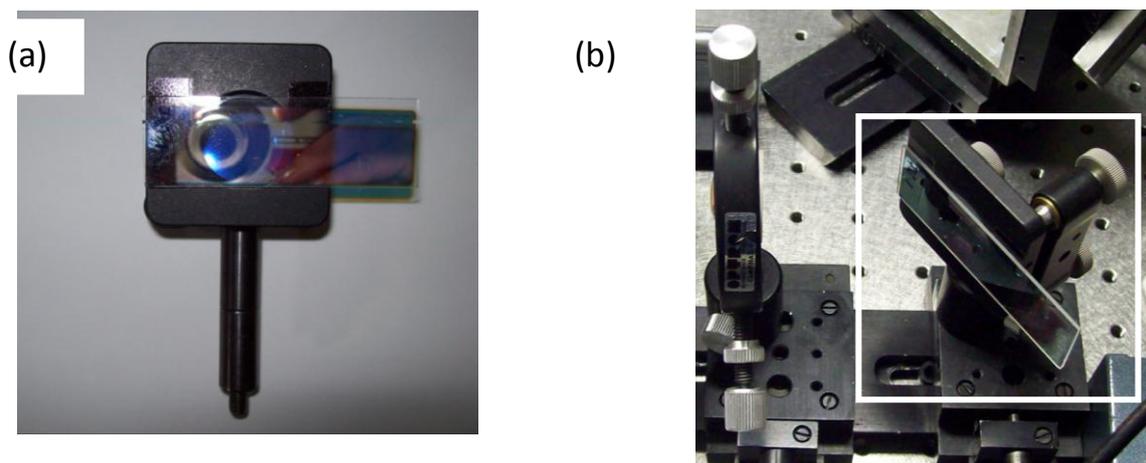


Figura 25: (a) Separador de feixes utilizado para coleta da radiação retroespalhada. (b) Detalhe no arranjo.

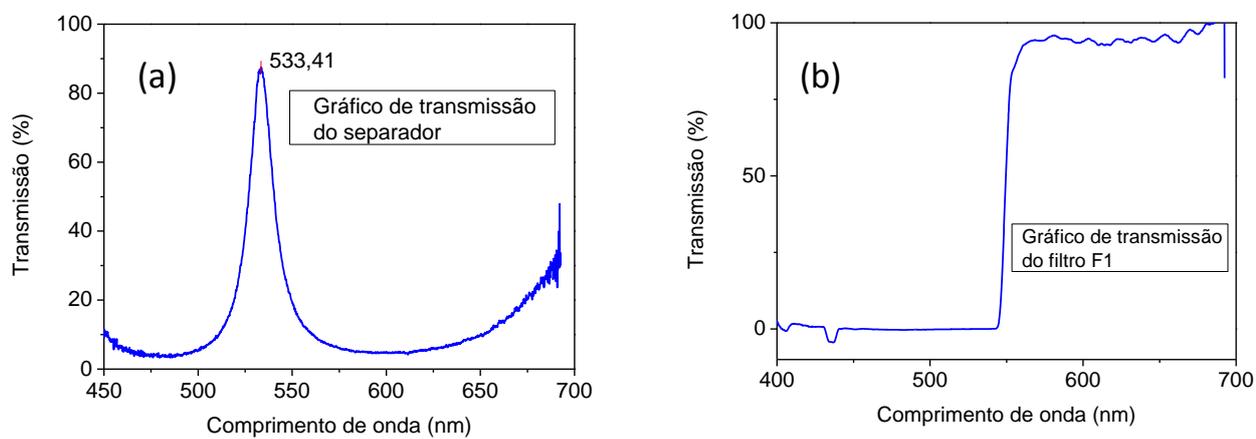


Figura 26: (a) Espectro separador de feixe. (b) Espectro de transmissividade do filtro dicróico. F1. (c) Foto do filtro.

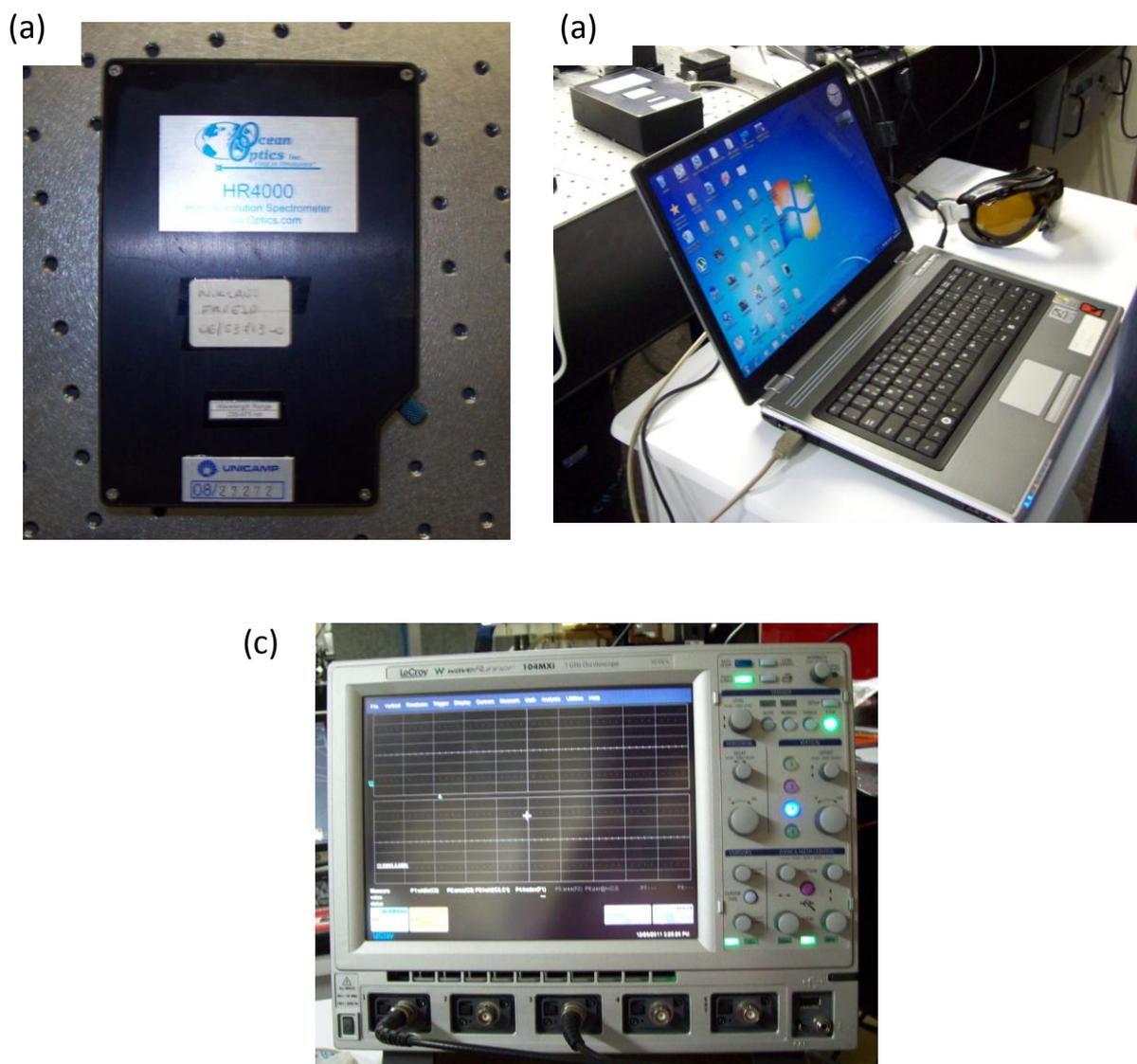


Figura 27: (a) Espectrômetro da *Ocean Optics*, modelo HR 4000, resolução espectral de 3,5 nm para fibra óptica com 100 μm de diâmetro de núcleo e 0,3 nm para fibra óptica com 5,0 μm de diâmetro de núcleo, para detecção de comprimentos de onda entre 235nm a 750 nm; (b) Acoplado ao computador; (c) Osciloscópio *Lecroy*, modelo WaveRunner Xi, resolução de 1,0 GHz e 5,0 GS/s.



Figura 28: Esquema do arranjo utilizado nos experimentos.

5. RESULTADOS

5.1. Ocorrência de laser randômico com elementos espalhadores em solução corante laser ativo.

Primeiramente foi feito um experimento para verificação da emissão de laser randômico da solução de rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol, utilizando-se 10^9 cm^{-3} de partículas de rutila (TiO_2), com tamanho da partícula de 100 nm, como centros espalhadores, para obtenção de laser randômico e evidência de que o laser de bombeio tem a possibilidade de ser utilizado nos experimentos, além de apresentar um resultado semelhante ao que seria esperado com as amostras dentais⁴⁵. A solução foi colocada em cubeta de cristal de quartzo e bombeada com o SH do laser de Nd:YAG, **Figura 31 (a)**.

A **Figura 29** apresenta o espectro obtido do laser randômico. Para comparação é possível observar que a emissão é bem mais estreita (FWHM = 3,92 nm) que a de fluorescência (FWHM = 50 nm, **Figura 20 (b)**).

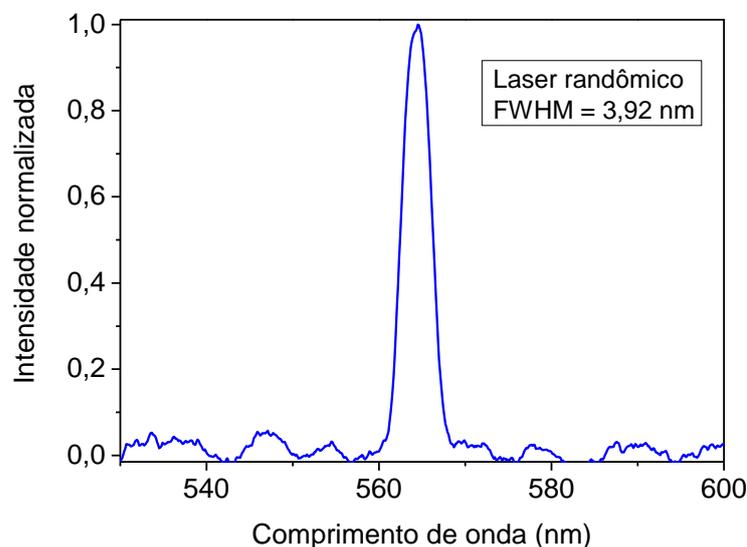


Figura 29: Espectro da emissão de laser randômico pela solução de rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol com rutila (TiO_2), como centros espalhadores.

Além disso, reproduziu-se o experimento anterior substituindo a rutila por um pó de esmalte dental bovino como centros espalhadores com o objetivo de evidenciar que os cristais de hidróxiapatita têm a capacidade de funcionar como o meio difuso espalhador para a ocorrência de laser randômico no esmalte dental bovino.

O pó de esmalte dental (**Figura 30 (a)**) foi obtido através do desgaste de cinco amostras dentais bovinas com broca de tungstênio (Modelo Maxicut nº 251 – GX 060, Meisinger, Germany), montada em peça de mão em micromotor de baixa rotação (KAVO INTRAmatic 181 DBN, KAVO DO BRASIL). Para este experimento foi utilizado $2,85 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ espalhadores de hidróxiapatita na solução de rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol, que ao ser excitada pelo laser de bombeio, emitiu laser randômico conforme pode ser visto na **Figura 30 (b)**, o que corrobora com a hipótese de que os cristais de hidróxiapatita “in natura” também funcionem como elementos espalhadores.

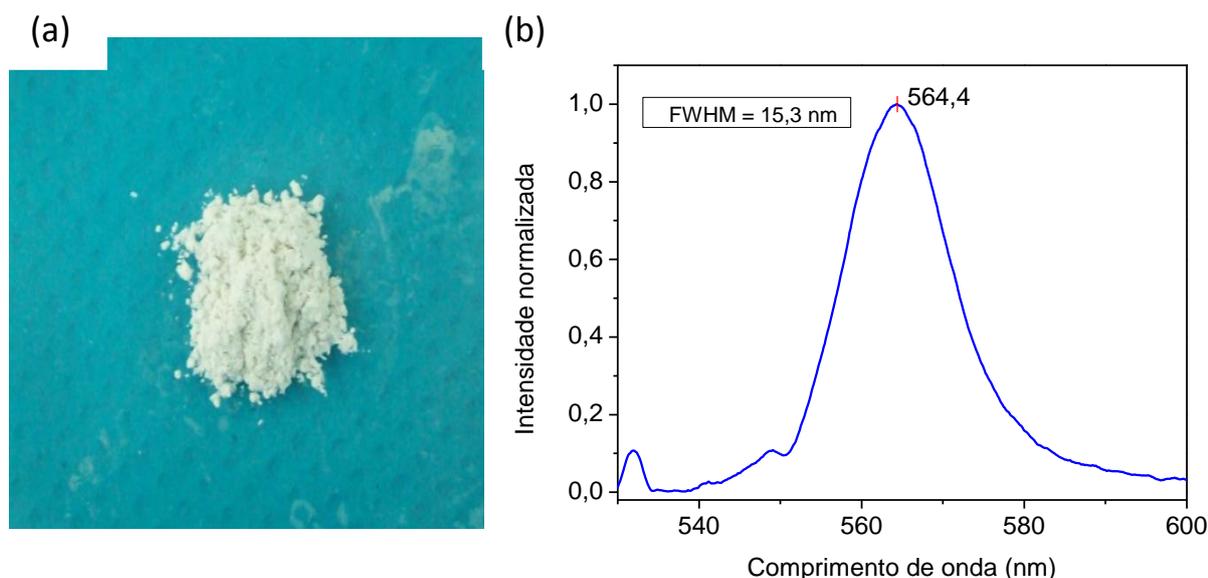


Figura 30: Características do pó de esmalte dental bovino. **(a)** Pó obtido com broca de tungstênio (modelo Maxicut nº 251, Meisinger-Germany), montada em peça de mão em micromotor odontológico (Kavo INTRAmatic 181 DBN, KAVO DO BRASIL, Ind & Com.); **(b)** Emissão de laser randômico pela solução de rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol com pó de esmalte dental bovino.

5.2. Primeiras tentativas de verificação da ação do laser randômico para o esmalte dental bovino.

As amostras citadas na **seção 4.1.1.** foram então, montadas na plataforma da cavidade “sino laser” sobre um bloco de cera pegajosa (Cera Utilidade Wilson, Polidental Ind. & Com. Ltda), para serem bombeadas perpendicularmente pelo SH do laser de Nd:YAG. Primeiramente foram testadas as amostras da **seção 4.1.1.1.**, sendo que estas emitiram fluorescência aparentemente devido à grande penetração da rodamina 6G na *dentina* destas amostras.

Por esta razão utilizamos as amostras maiores da **seção 4.1.1.2.** e cobrimos a parte dentinária com a cera pegajosa. O detalhe do bombeio pode ser visto pela **Figura 31(b).**

A **Figura 31(c)** apresenta o momento do bombeio da amostra pelo $\lambda=532$ nm, e a **Figura 31(d)** o detalhe da emissão de fluorescência da amostra. A **Figura 32** apresenta o gráfico obtido de fluorescência da amostra de dente hígido e lixado. Para obtenção deste espectro foi necessário aproximar a fibra óptica quase de frente à amostra, visto que a fluorescência era muito fraca, eliminando a possibilidade de coletar um sinal retroespalhado.

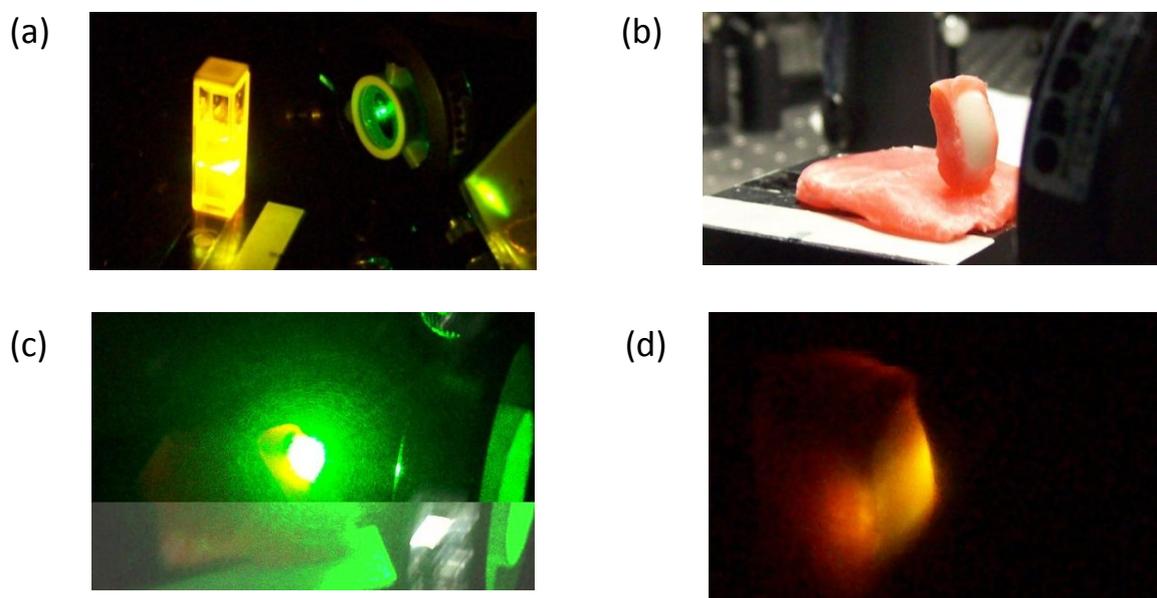


Figura 31: (a) Emissão de fluorescência pela rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol; (b) Posicionamento da amostra dental na plataforma do arranjo; (c) Bombeio da amostra pelo $\lambda=532$ nm; (d) Emissão de fluorescência pela amostra dental infiltrada com rodamina 6G.

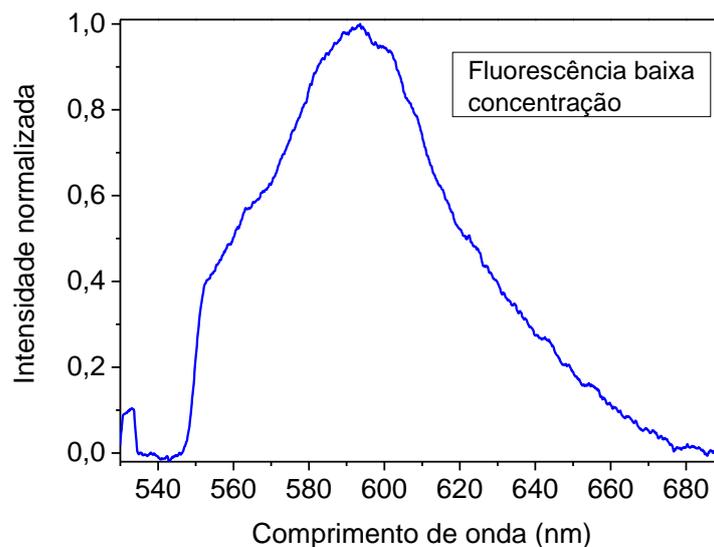


Figura 32: Espectro de fluorescência da amostra de esmalte hígido e lixado infiltrado com o corante laser ativo rodamina 6G a 10^{-4} M em etileno glicol

Como a intensidade de fluorescência era muito fraca, decidiu-se aumentar o tempo de imersão das amostras e a concentração do corante laser ativo, **seção 4.1.1.3**. Dessa forma, utilizando a amostra de dente hígido sem lixar, a mais corada (**Figura 19**), obteve-se um sinal de fluorescência muito mais intenso e por isso conseguiu-se coletar o sinal retroespalhado, conforme pode ser observado pela **Figura 33**. A **Figura 34** apresenta uma comparação entre os sinais obtidos por esta amostra e o obtido com a amostra com baixa concentração de rodamina, a intensidade foi normalizada para que fosse possível ver as diferenças nos espectros.

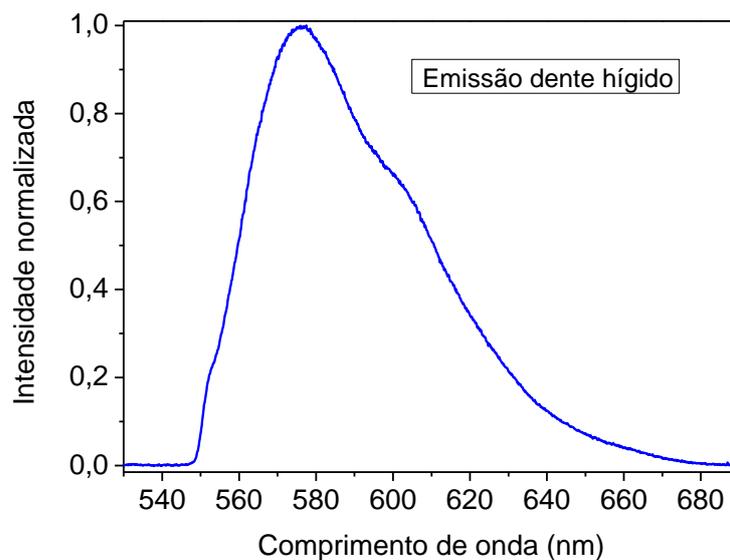


Figura 33: Espectro de fluorescência retroespalhada na amostra de esmalte dental hígido e sem lixar, infiltrada com solução do corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol.

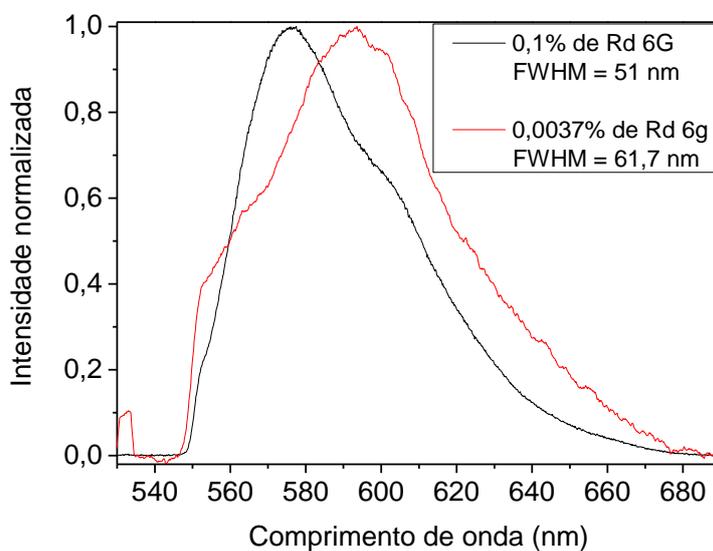


Figura 34: Espectros de fluorescência, comparativo para as diferentes concentrações do corante laser ativo rodamina 6G em etileno glicol. **Preto:** O sinal foi retroespalhado. **Vermelho:** O sinal foi coletado muito próximo a amostra.

Através de um alinhamento do sistema de detecção foi possível determinar variações no espectro retroespalhado por esta amostra, conforme podemos notar pela **Figura 35**. Nesta figura é possível observar que para posições diferentes de inclinação do sistema de detecção (fibra óptica), sinais singulares foram obtidos.

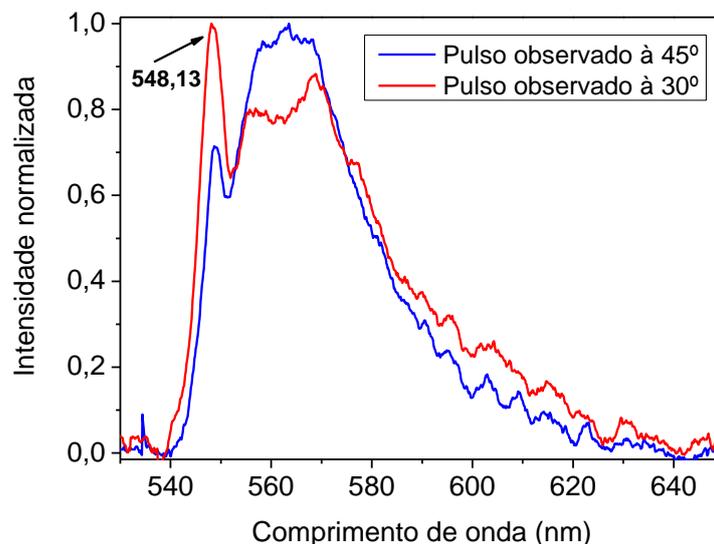


Figura 35: Espectros dos sinais emitidos pela amostra dental hígida e sem lixar, infiltrada com solução do corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, para diferentes posicionamentos da amostra na plataforma do arranjo do laser de bombeio.

Num primeiro momento, supôs-se que estes sinais singulares obtidos espectralmente pudessem ser provenientes de microcavidades formadas no meio altamente espalhador, sugerindo emissão de laser randômico.

Entretanto, após reproduzir-se esta metodologia para outras amostras, inclusive amostras desmineralizadas (**Figura 36**), verificou-se que este padrão se repetia e estava vinculado à dependência do sistema de detecção com a inclinação do filtro (F1) posicionado em frente à fibra óptica.

Como pode ser observado pela **Figura 37** o sinal detectado pelo espectrômetro deve ter sido modulado pelo perfil de transmissividade do filtro dicróico, principalmente pelo fato das singularidades nos gráficos obtidos coincidirem com a região limite da curva de transmissividade

deste (**Figura 26(b)**, transmissão filtro), o que vem corroborar com a hipótese desses sinais gerados terem ocorrido devido um problema relativo ao filtro.

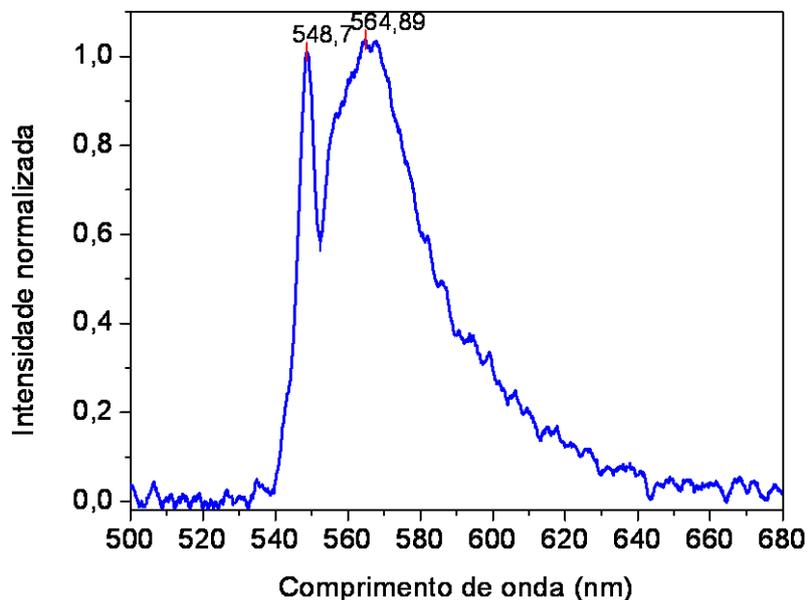


Figura 36: Sinal detectado ao utilizar amostra desmineralizada.

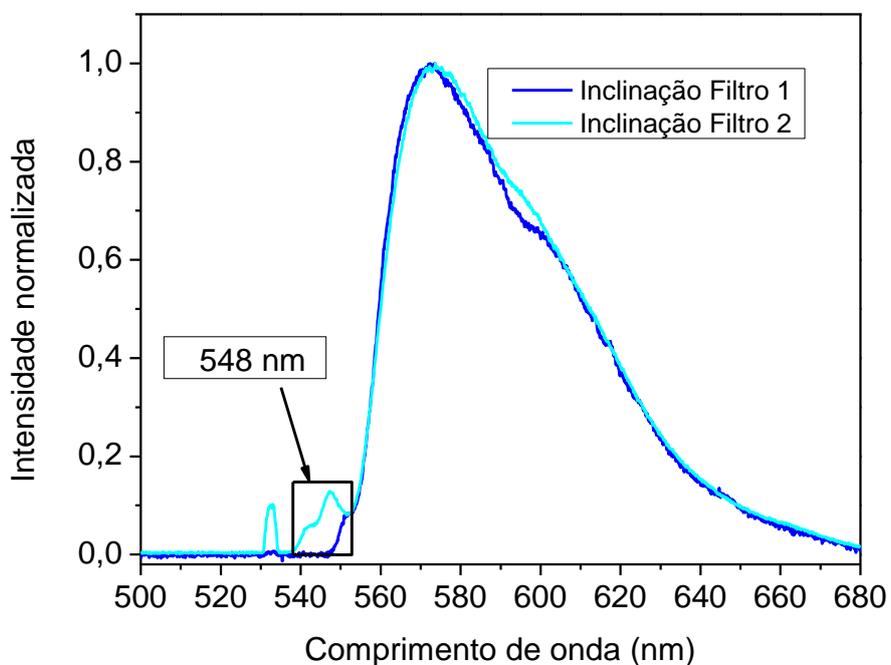


Figura 37: Espectro de emissão da amostra dental hígida. Destaque para emissão em 548 nm, presente para determinadas inclinações do filtro dicróico (F1).

Para eliminação desta modulação no sinal detectado proveniente do filtro, uma possibilidade seria substituí-lo por um filtro absorptivo ou por um com transmissão a partir dos 540 nm (e não nos 550 nm como o filtro atual). Entretanto, optou-se apenas em rotacionar o filtro atual numa outra inclinação no intuito de praticamente eliminar este sinal.

5.3. Ação do laser randômico no esmalte dental bovino.

Decidiu-se então fazer um novo grupo de amostras, pois as antigas já estavam muito ablacionadas pelo laser de bombeio. O grupo foi similar ao anterior, somente que desta vez, todas as amostras foram secas com ar comprimido a pressão de 90 psi, por 5,0 minutos antes de serem imersas na solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, de forma que não restasse nenhuma água no interior do tecido dental. Por motivo semelhante, as amostras ao serem retirada da solução após o período de uma semana, foram lavadas e novamente secas com ar comprimido a 90 psi de pressão por 5,0 minutos sendo que esses tempos foram arbitrários.

Até então, todos estes experimentos tinham sido feitos com fibra óptica multimodo de 200 μm (**Figura 38 (b)**), de diâmetro de núcleo, que possui uma resolução de 3,4 nm e que não possibilita a captação dos sinais de forma a se visualizar detalhes espectrais. Sendo assim, optou-se por aproximar os componentes do arranjo: fibra, lente, filtro, e amostra dental ao foco, de forma a captar o sinal retroespalhado com maior intensidade e poder ser utilizada uma fibra óptica multimodo com 50 μm (**Figura 38 (c)**) ou uma monomodo com 5,0 μm de diâmetro de núcleo (**Figura 38 (a)**), que possuem uma resolução de 1,0 nm e 0,3 nm, respectivamente.

Entretanto, o sinal continuou fraco para estas fibras com maior resolução, de forma que somente captação de ruído foi conseguida. Assim, todos os demais experimentos continuaram sendo feitos com a fibra de 200 μm com resolução de 3,4 nm.

(a)



(b)



(c)



Figura 38: Fibras ópticas: **(a)** Monomodo de $5,0\mu\text{m}$ de diâmetro de núcleo, resolução de $0,3\text{ nm}$; **(b)** Multimodo de $200\ \mu\text{m}$ de diâmetro de núcleo, resolução de $3,4\text{ nm}$; **(c)** Multimodo de $50\ \mu\text{m}$ de diâmetro de núcleo, resolução de $1,0\text{ nm}$.

A **Figura 39** mostra o novo arranjo com aproximação dos componentes.

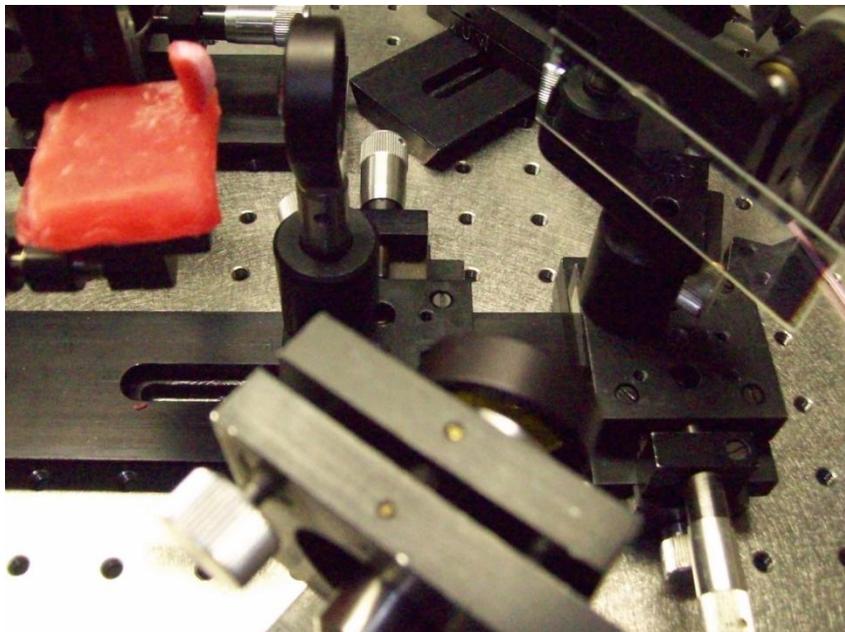


Figura 39: Novo posicionamento dos componentes do arranjo do laser de bombeio. Aproximação da fibra óptica, filtro, lente convergente e amostra dental ao foco.

As amostras, secas com ar comprimido, foram posicionadas na plataforma do novo arranjo, e ao serem bombeadas com o laser de Nd:YAG, *emitiram laser randômico*. A **Figura 40 (a), (b) e (c)** apresenta os espectros de laser randômico obtidos para uma amostra dental hígida e sem lixar em diferentes posições desta. A **Figura 40 (d)** mostra o perfil espacial do laser randômico emitido. Na parte central desta emissão destaca-se um sinal mais intenso, característica de emissão coerente, e outro mais largo e menos intenso ao seu redor, característica de espalhamento incoerente.

A **Figura 41** apresenta os espectros de laser randômico obtidos ao se bombear uma amostra descalcificada e não lixada. Do ponto de vista espectral, não existem elementos que possam diferenciar a emissão de uma amostra sadia de uma descalcificada, embora ambas emitam laser randômico com diferentes estreitamentos de linha.

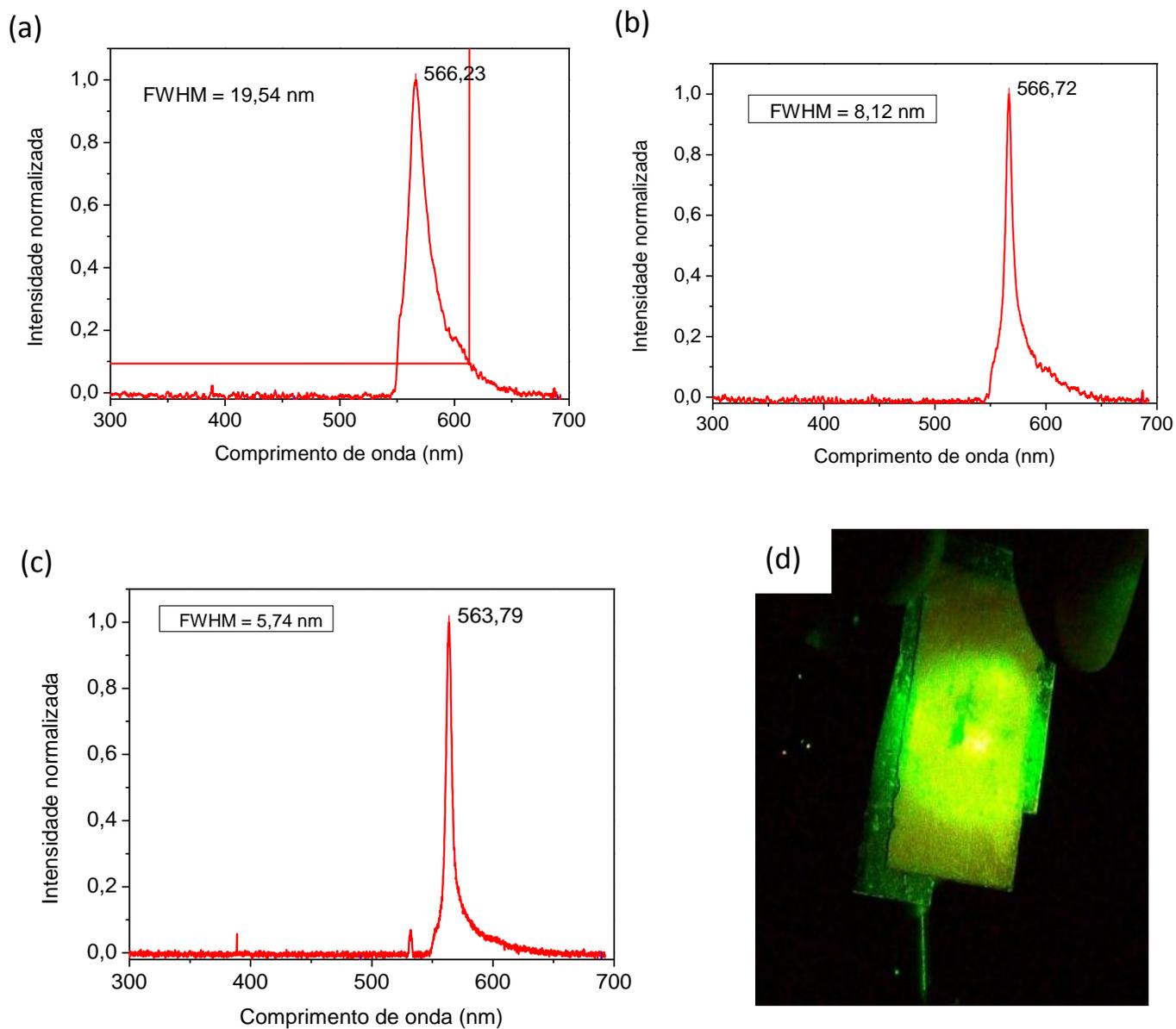


Figura 40: Emissão de laser randômico pela amostra dental bovina hígida e sem lixar, infiltrada com o corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol em diferentes posições desta; (a) FWHM = 19,54 nm; (b) FWHM = 8,12 nm; (c) FWHM = 5,74 nm; (d) Perfil espacial do laser randômico emitido por esta amostra.

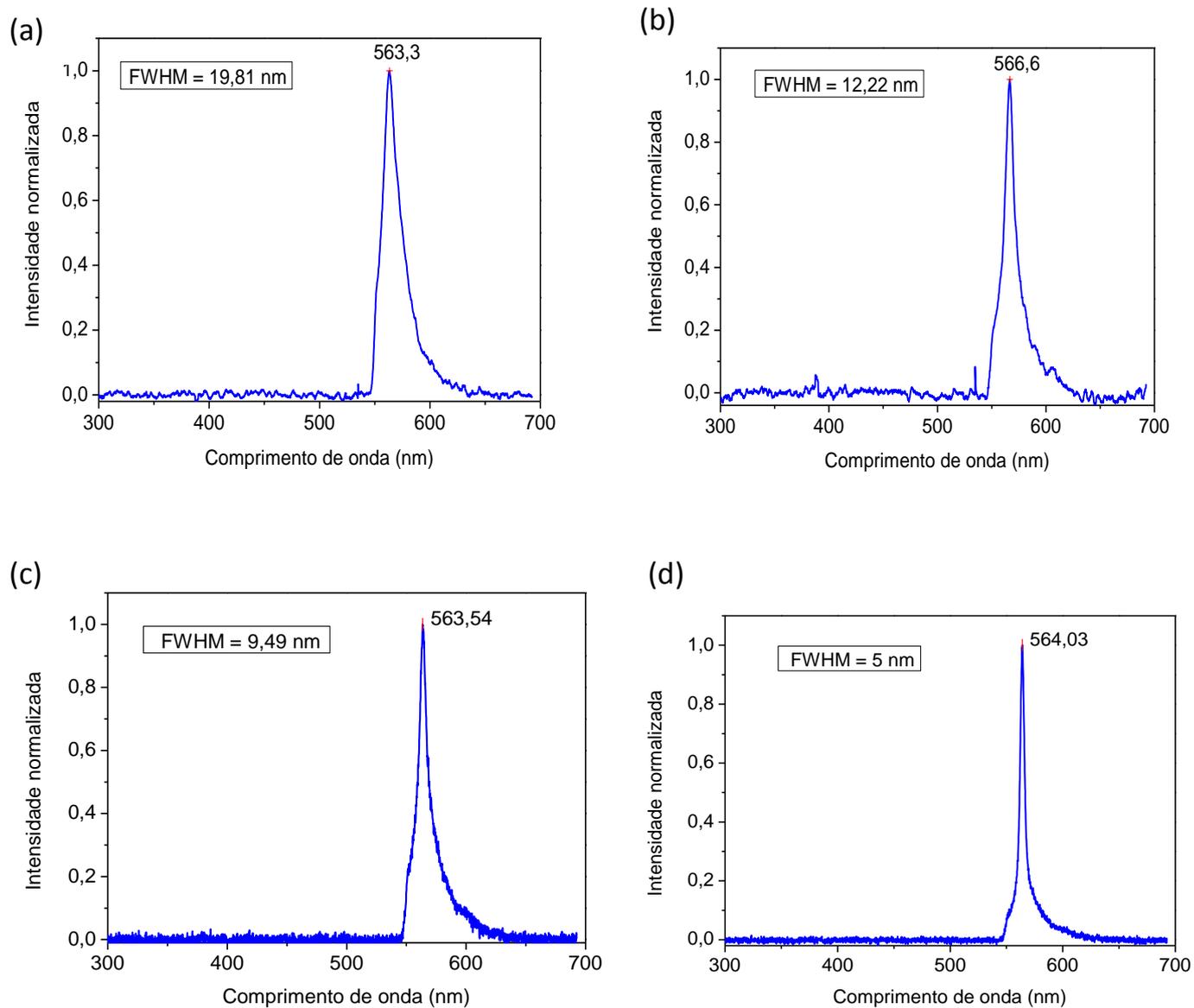


Figura 41: Emissão de laser randômico pela amostra dental bovina desmineralizada e sem lixar, infiltrada com o corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}M$ em etileno glicol em diferentes posições desta; (a) FWHM = 19,81 nm; (b) FWHM = 12,22 nm; (c) FWHM = 9,49 nm; (d) FWHM = 5,0 nm.

Colocou-se também duas amostras da **seção 4.1.1.1.**, uma hígida e uma submetida a solução desmineralizadora, *lixadas* na solução corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol pelo período de 15 dias. Os espectros obtidos podem ser visualizados na **Figura 42**. Notou-se nos experimentos que o sinal emitido por ambas foi menos intenso e o espectro mais largo, características possivelmente relativas à obliteração dos microporos do esmalte dental devido ao processo de lixamento das amostras.

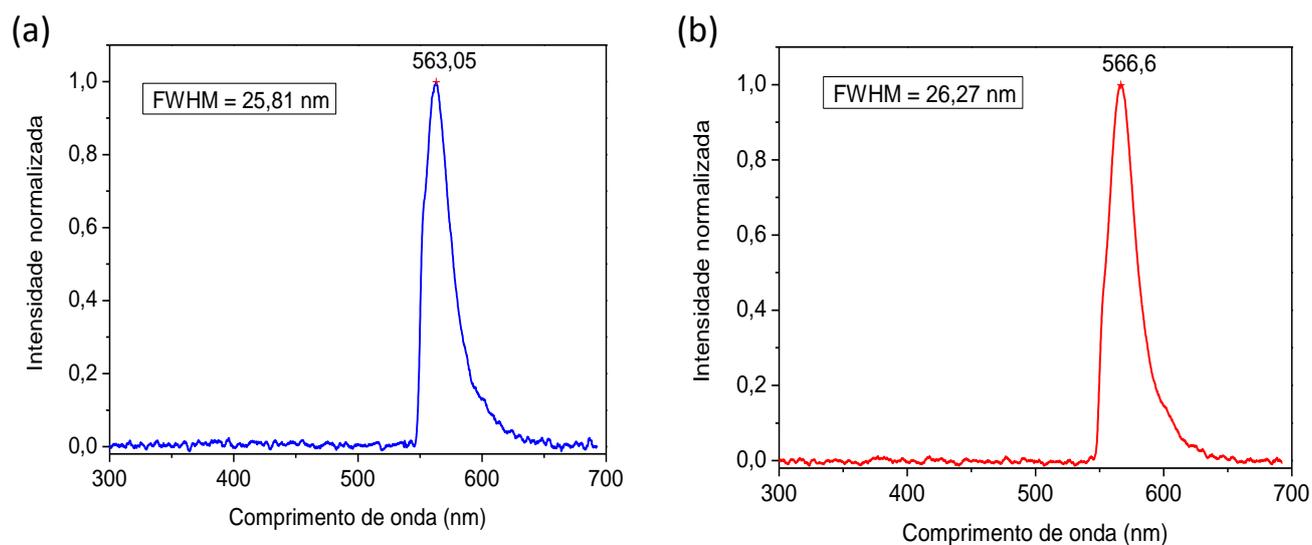


Figura 42: Emissão de laser randômico das amostras lixadas e infiltradas com o corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol por 15 dias. (a) Descalcificada, FWHM = 25,81 nm; (b) Hígida, FWHM = 26,27 nm.

6. DISCUSSÃO

Sendo um estudo inédito, a possível detecção de laser randômico em tecido dental tendo como meio espalhador os cristais de hidróxiapatita e como meio de ganho o corante laser ativo rodamina 6G em etileno glicol, não possui metodologia pré-estabelecida.

No presente trabalho os experimentos piloto foram iniciados a partir das metodologias utilizadas na literatura para detecção da emissão de laser randômico com o corante laser ativo rodamina 6G, utilizando rutila (TiO_2), como centros espalhadores^{13,45}.

Dos estudos piloto realizados pôde-se concluir que a rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, tem a capacidade de difundir-se no tecido dental bovino, sendo que 4 horas e meia foram o suficiente para que sua infiltração ocorresse no tecido dentinário, uma vez que este possui estrutura canicular apresentando alto grau de permeabilidade, assim certas substâncias podem penetrá-lo atingindo a polpa^{15,22}. Sua composição é semelhante ao osso humano em relação à porcentagem de conteúdo mineral e de substâncias orgânicas^{15,22} sendo que o tecido ósseo emite laser randômico quando submetido ao corante laser ativo rodamina 800 em DMSO como foi demonstrado por Q. Song *et al*⁷.

O esmalte dental é o tecido mais mineralizado e mais duro do corpo humano, sendo constituído por cristais de hidróxiapatita firmemente unidos cujo distanciamento uns dos outros se dá por finos espaços inter cristalinos e tendo sua matriz orgânica drasticamente reduzida em relação à dentina^{15,22}. Por ser formado predominantemente por matriz inorgânica era esperado que a difusão do corante laser ativo rodamina 6G no esmalte dental fosse dificultada, apesar deste apresentar graus de difusibilidade^{26,27,28}.

A difusão de partículas de uma substância é uma função da temperatura, viscosidade do fluido, do tamanho das partículas e da concentração destas. A difusão explica o fluxo de moléculas de uma região de concentração mais alta para uma de concentração mais baixa. O resultado da difusão é uma gradual mistura de materiais⁴⁹.

Embora o peso molecular da rodamina 6G seja elevado (479,08 g/mol), em relação ao peróxido de hidrogênio (34 g/mol), que se difunde quase que prontamente no esmalte dental, o diâmetro da partícula de rodamina 6G é de 1,24 nm⁴⁶ e a partir do momento que foi

aumentada a concentração deste corante laser ativo em etileno glicol de 10^{-4} M para $2,6 \times 10^{-3}$ M e concomitantemente aumentado o tempo de imersão dos espécimes na solução, esta passou a difundir-se no esmalte dental sadio e no desmineralizado bem mais homogeneamente.

Com o tempo de imersão de 96 horas a difusão do corante laser ativo rodamina 6G pôde ser muito bem visualizada, porém ainda assim as amostras de esmalte dental que foram *lixadas*, quer seja este esmalte sadio ou desmineralizado, apresentaram-se muito pouco coradas e de forma heterogênea como pode ser observado na **Figura 18**.

Aumentando-se o tempo de imersão dos espécimes na solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol para 7 dias, observou-se um nítido aumento da infiltração do corante em todas as amostras como mostrado na **Figura 19**. Para a amostra casada que foi lixada, pode-se observar nitidamente a diferença de impregnação do corante para o lado mineralizado e para o demineralizado, que foi muito pouco.

Pôde-se observar que todas as amostras que foram *lixadas*, tanto as de esmalte hígido como desmineralizado apresentaram-se pouco ou quase nada coradas, sendo que a amostra *desmineralizada lixada* foi a que menos difundiu o corante. Isso talvez possa ter ocorrido devido a formação de esfregaço de partículas de esmalte que obliteraram os microporos dificultando a infiltração do corante. O lixamento foi feito para impedir que a superfície rugosa dental interferisse na informação contida no cone de retro-espalhamento. Porém, como este apresentou-se bem definido no experimento, **Figura 40 (d)**, mesmo com superfícies não lixadas e como não é o objetivo do presente trabalho verificar a influência da rugosidade de superfície no cone de retroespalhamento, optou-se pela investigação de laser randômico somente nas amostras que não foram lixadas.

Nos primeiros experimentos, notou-se picos de emissão característicos da fluorescência retroespalhada, cujo espectro para determinados posicionamentos da amostra na plataforma mostrou-se singular, como pode ser observado na **Figura 35**, diferindo bastante do espectro do sinal emitido quando a concentração de rodamina 6G era a ótima mas captada em outro local da amostra onde se conseguiu detectar somente fluorescência, como mostrado na **Figura 33**. Podemos observar que para dois posicionamentos diferentes da amostra na plataforma, diferentes emissões com estreitamento espectral bastante sugestivo de emissão de laser randômico puderam ser coletados, porém, estudando-se detalhadamente as propriedades

do filtro utilizado concluiu-se que estes espectros se davam não devido a emissão de laser randômico mas devido as propriedades ópticas do filtro que, devido ao seu “*coating*” formava estes estreitamentos espectrais próximos ao comprimento de onda de 548 nm e portanto muito próximo do limite de transmissividade de filtro, como pode ser visto na **Figura 26 (b)**.

As amostras dentais do segundo grupo foram secas com ar comprimido a 90 psi de pressão antes e depois de serem imersas na solução de rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, com a finalidade de que toda água presente dentro do esmalte dental evaporasse, uma vez que esta poderia estar interferindo nos resultados esperados por obliterar os microporos e impedir a livre penetração do corante. Por motivo semelhante, as amostras ao serem retiradas da solução após o período de uma semana, foram lavadas e novamente secas com ar comprimido a 90 psi de pressão, por 5,0 minutos, com o objetivo de que todo o etileno glicol presente dentro do tecido dental evaporasse. O etileno glicol é um álcool cujo índice de refração para o comprimento de onda de 532 nm é de 1,43 sendo que o índice de refração do esmalte é de 1,64. Com a evaporação do etileno glicol os locais da amostra dental, antes ocupados por ele, foram preenchidos por ar, cujo índice de refração é 1,0. Aumentando-se a diferença entre os índices de refração entre ambos, um maior número de canais de amplificação do sinal luminoso foi gerado, devido à diminuição do livre caminho médio percorrido pela luz, o que fez com que o ganho fosse suficiente para a ocorrência de laser randômico.

A verificação dos detalhes dos espectros de emissão de laser randômico ficaram limitados pelo sistema de detecção quanto as fibras ópticas utilizadas na coleta do sinal. O ideal é que fosse utilizada fibra óptica monomodo de 5,0 μm de diâmetro de núcleo, com resolução de 0,3 nm para melhor observação de detalhes espectrais (**Figura 38(a)**), porém a quantidade de luz captada nesta fibra de menor diâmetro mostrou-se insuficiente para a detecção de sinal. Então optou-se por utilizar uma fibra multimodo de 200 μm de diâmetro de núcleo com resolução de 3,5 nm, sendo que conseguiu-se a *detecção de laser randômico*, porém sem detalhes mais refinados dos espectros.

No intuito de observar-se os espectros mais detalhadamente e com a possibilidade de se conseguir identificar alguma diferença entre o esmalte sadio e o desorganizado, optou-se por aproximar os componentes do arranjo. Porém, não se conseguiu detectar os sinais provenientes da emissão retroespalhada, embora mais intensa, com uma fibra multimodo de 50 μm de diâmetro de núcleo e resolução de 1,0 nm. Este sistema de detecção não possibilitou a observação dos espectros de laser randômico como esperado, então foi dada sequência aos

experimentos utilizando-se a fibra óptica de 200 μm com a qual *foi detectado a ação de laser randômico em esmalte dental bovino.*

6.1. Sugestões para trabalhos futuros

1- Verificar temporalmente a emissão de laser randômico acoplando concomitantemente a fibra óptica ao espectrômetro e ao osciloscópio, objetivando a análise temporal das emissões juntamente com a análise espectral.

2- Verificar as diferenças desta análise para o tecido dental sadio e desorganizado.

3- Pesquisar melhorias para o sistema de detecção para verificação de detalhes espectrais das emissões de laser randômico pelo tecido dental, objetivando-se uma análise matemática.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

1- O corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol teve a capacidade de difundir-se no esmalte dental bovino quando as amostras ficaram imersas nesta solução por um período de sete dias, em temperatura ambiente e no escuro.

2- O processo de lixamento da amostras interferiu na difusão do corante. Amostras lixadas hígidas ou descalcificadas mostraram pouca infiltração do corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol.

2- O esmalte dental bovino infiltrado com o corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, com ou sem desorganização tecidual por desmineralização, *emite laser randômico* quando bombeado pelo SH do laser de Nd:YAG.

3- A *emissão de laser randômico* pelo esmalte dental bovino infiltrado com o corante laser ativo rodamina 6G a $2,6 \times 10^{-3}$ M em etileno glicol, deu-se com energias de bombeio de 1,3 mJ.

4- O laser randômico emitido pelo esmalte dental infiltrado com um corante laser ativo, tem a potencialidade de vir a ser um sensível detector de mudanças morfológicas dos tecidos dentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ DE ANDRADE, L. H.; **Estudo da difusão de um corante orgânico em resinas compostas polimerizadas por duas fontes de luz. Avaliação através de espectroscopia de fluorescência.** 2004. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”.
- ² DE PAULA, C. E.; In Fundamentos de odontologia. Lasers em Odontologia. *Editora Guanabara Koogan*, 2010.
- ³ GRIFFITHS, B. M.; WATSON, T. F. Resin-dentin interface of scotchbond multi purpose dentin adhesive. *Am. J. Dent.*, v. 8, n. 4, 1995.
- ⁴ WATSON, T. F.; BOYDE, A. The use of fluorescents markers on studing of a dentin desinding agent between a composite restoration and tooth. *Clinical materials*, v. 2, n. 1, 1987.
- ⁵ WATSON, T. F. A Confocal optical microscope study of the morphology of the tooth-restoration interface using Sscotchbond 2 dentin adhesive. *J. Dent. Res.*, v. 68, n. 6, 1989.
- ⁶ BAUER, J. G. & HENSON, J. L. Microleakage: a measure of the performance of direct fillings materials. *Oper. Dent.*, v. 9, n. 1, 1984.
- ⁷ SONG, Q.; XIAO, S.; XU, Z.; LIU, J.; SUN, X.; DRACHEV, V.; SHALAEV, V. M.; AKKUS, O.; KIM, Y. L. Randon Lasing in Bone Tissue. *Optics Letters*; v. 35, n. 9, 2010.
- ⁸ POLSON, R. C.; VARDENY, Z. V. Random lasing in humam tissues. *Applied Physics Letters*, v. 85, n. 7, 2004.
- ⁹ LAWANDY, N. M.; BALACHANDRAN, R. M.; GOMEZ, A. S. L.; A SAUVAIN, E. Random Laser. *Nature*, v. 368, 1994.
- ¹⁰ CAO H.; ZHAO, Y. G.; HO, S. T.; SEELIG, E. W.; WANG, Q. H.; CHANG, R. P. H. Randon Laser Action in Semiconductor Powder, *Physical Review*, v. 54, n. 4, 1996.
- ¹¹ WIERSMA, D. S.; LASENDJIK, A. D. Ligth diffusion with gain and randon laser, *Physical Review E*, v. 54, n. 4, 1996.

- ¹² WIERSMA, D. S. The smallest random laser, *Nature*, v. 406, n. 13, 2000.
- ¹³ RIBAMAR VIEIRA, R. J. **Laser de pó de neodímio com granulação nanométrica.** 2011. Dissertação (mestrado em ciências na área de tecnologia nuclear – materiais), IPEN - São Paulo.
- ¹⁴ PRADHAN, P.; KUMAR, N. *Phys. Rev.*, B50, 1994.
- ¹⁵ S. N. BASKHAR. Histologia e Embriologia Oral de Orban. *Editora Artes Médicas*, 1989.
- ¹⁶ SELFVAST, W. T.; Lasers Fundamentals, *Cambridge University Press*, 1996.
- ¹⁷ SVELTO, O. Principles of lasers, 4th Ed., New York, *Plenum Press*, 1990.
- ¹⁸ LETHOKOV, V. S. Generation of ultrashort light pulses in laser with non-linear absorbent. *Zh. Eksp. I. Fiz.*, v. 53, (1967). Tradução para o inglês em : *Soviet Physics – JETP*, v. 26, 1968.
- ¹⁹ GOUEDARD, C.; HUSSON, D.; SAUTERED, C.; AUZEL, F.; MINGUS, A. Generation of spatially incoherent short pulses in laser pumped neodymium stoichiometric crystals and powders, *Journal of Optical Society of America B*, v. 26, n. 12, 1993.
- ²⁰ WIERSMA, D. S. **Experiments on random lasers.** 2001. Tese (doutorado em física). Faculteit der Wiskunde, informatica, Natuurkunde em strenkunde, Universiteit van Amsterdam, Amsterdã,
- ²¹ CURY, J. A.; Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. *et al.*
- ²² TEM CATE, A. R. Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função, Rio de Janeiro, R. J.: *Guanabara Koogan*, 2001.
- ²³ LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in demineralization- remineralization process. *Cli. Dent.*, v. 10, n. 2, 1999.

- ²⁴ WANG, X. Y.; MILNER, T. E.; DE BOER, J. F.; ZHANG, Y.; PASHLEY, D. H.; NELSON, J. S. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Applied Optics*, v. 38, n. 10, 1999.
- ²⁵ ROBSON, C.; SHORE, R. C.; BROOKES, S. J.; STRAFFORD, S.; WOOD, S. R.; KIRKITAN, J. The chemistry of enamel caries. Crit. Rev. *Oral Biol. Med.*, v. 11, n. 4, 2000.
- ²⁶ FIELDCHTEIN, K. I.; GELIKONOV, G. V.; GELIKONOV, G. M.; ISSANOV, R. R.; KORANOV, R. V.; SERGEEV, A. M. "In vivo" OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. *Optics Express*, v. 3, n. 6, 1998.
- ²⁷ NIEMZ, M. H. Laser-tissue interactions-fundamentals and applications. Germany: *Ed. - Springer Verlag*, 1996.
- ²⁸ THYLSTRUP, A. When caries is caries and what should we do about it? *Quintessence Int.*, v. 29, 1998.
- ²⁹ FEATHERSTONE, J. D. B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v.27, 1999.
- ³⁰ NEWBRUN, E. Cariology.; Baltimore, Maryland: *Williams & Wilkins*, 1978.
- ³¹ MOFFATT, P.; SMITH, C. E.; ST-ARNAUD, R.; NANCI, A. Characterization of Apina, a secreted protein highly expressed in tooth associated epithelia. *J. Cell. Biochem.*, v. 103, n. 3, 2008.
- ³² PARK, J. C.; PARK J. C.; SON, H. H.; KIN, H. J.; JEONG, M. J.; LEE, C. S.; DEY, R.; CHO, MIL L. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 115, n. 2, 2007.
- ³³ BRUDVOLD, F. Chemical composition of the teeth in relation to caries. In: SOGNAES, R. F. Chemistry and prevention of dental caries. *Springfield, MA*: Charles C. Thomas, 1962.
- ³⁴ BRANNSTRON, M.: Dentin and pulp in restorative dentistry, *Wolfe Medical Publication, Ltd.*, London, 1982.

- ³⁵ ROBSON, R. A.: In RODAHL, K.; NICHOLSON, J. T.; BROWN, E. M. Editors: Bone as a tissue, *Mc Grow-Hill Book co.*, the Blackston Division, New York, 1960.
- ³⁶ OLIVEIRA LIMA, J. E. Cárie dentária um novo conceito. *Ver. Dent. Press Ortodontol. Ortoped. Facial*, v. 12, n. 6, 2007.
- ³⁷ QUEIROZ, C. S.; HARA, A. T.; PAES LEME, A. F.; CURY, J. A. pH - cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz. Dent. J.*, v. 19, n. 1, 2008.
- ³⁸ LARSEN, N. J.; BRUN, C. A. Química da cárie dentaria e o flúor- mecanismo de ação. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia clínica: *Livraria Editora Santos*, 1995.
- ³⁹ CHARDWICK, D. J.; CARDEW, G. Dental enamel. London, UK: *Chichester-Wiley*, 1997.
- ⁴⁰ CONSOLARO, A.; Lesões cariosas incipientes e formação de cavidades durante o tratamento ortodôntico. *Rev. Clin. Orton., Dental Press*, V. 5, n. 4, 2006.
- ⁴¹ KOULORIDES, T.; KELLER, S. E.; MANSON-HING, L; LILLEY, V. Enhancement of fluoride effectiveness by experimental cariogenic priming of human enamel. *Caries Res.*, v.14, n.1, 1980.
- ⁴² HARA, A. T.; QUEIRÓZ, C. S.; PAES LEME, A. F.; SERRA, M. C., CURY, J. A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries res.*, v. 37, 2003.
- ⁴³ MORENO, E. C.; ZAHRADNIK, R. T., chemistry of enamel surface desmineralization “*in vitro*”. *J. Dent. Rev.*,v. 53, n. 2, 1974.
- ⁴⁴ WHITE, D. J.; FEATHERSTONE, J. D. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression *in vitro*. *Caries rev.*, v. 21, n. 6, 1987.
- ⁴⁵ DE MATOS, C. J. S.; MENEZES, L. S.; BRITO-SILVA, A. M.; MARTINEZ, M. A.; GÁMEZ, A. S. L.; GOMES, A. S. L.; DE ARAÚJO, C. B. Random Fiber Laser. *Physical Review Letters*, v. 99, n .15, 2007.

⁴⁶ MYSLITSKAYA, N. A.; IVANOV, A.M.; SAMUSEV, I. G.; BRYUKHANOV, V. V. Deactivation of rhodamine 6G triplet-excited molecules and diffusion of nanoparticles in water-alcohol solutions. *Journal of applied spectroscopy*, v. 76, n. 6, 2009.

⁴⁷ FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 20, n. 4, 2005.

⁴⁸ PAPPALARDO, R.; SAMELSON, H.; LEMPICKI, A. Long-Pulse Laser emission from Rhodamine 6G. IEEE. *Journal of Quantum Electronics*, v. QE-6, n. 11, 1970.

⁴⁹ Compêndio IUPAC (União Internacional da Química Pura e aplicada), de Tecnologia Química, 2001.