

CENTRO UNIVERSITÁRIO CENTRAL PAULISTA
UNICEP SÃO CARLOS
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

Heitor Hussni Casarin

Alterações químicas e morfológicas do esmalte irradiado com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos

São Carlos
2021

Heitor Hussni Casarin

Alterações químicas e morfológicas do esmalte irradiado com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Odontologia do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP São Carlos - como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Alexandra Chinelatti

São Carlos

2021

Ficha de identificação da obra

HUSSNI CASARIN, Heitor

Alterações químicas e morfológicas do esmalte irradiado com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos/ Heitor Hussni Casarin. – São Carlos: Unicep, 2021. 47 páginas.

Orientadora: Michelle Alexandra Chinelatti

Monografia (Conclusão de Curso) – Centro Universitário Central Paulista, Unicep, Odontologia, 2021.

1. Femtosegundo 2.MEV 3. Raman 4.subablativos

Heitor Hussni Casarin

Alterações químicas e morfológicas do esmalte irradiado com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Odontologia” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Odontologia do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP São Carlos.

São Carlos, 12 de Novembro de 2021.

Profa. Dra. Michelle Alexandra Chinelatti
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Michelle Alexandra Chinelatti
Orientadora
Centro Universitário Central Paulista – UNICEP São Carlos

Profa. Dra. Luara Aline Pires
Avaliadora
Centro Universitário Central Paulista – UNICEP São Carlos

Prof. Dr. William M. A. Maximiano
Avaliador
Centro Universitário Central Paulista – UNICEP São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, porque foi graças ao esforço deles que hoje posso concluir o meu curso;
Dedico este trabalho a Deus, o qual me iluminou desde o começo e sem ele o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha Orientadora e amiga, a professora Michelle Alexandra Chinelatti, por ter me aceitado no desafio desse projeto e ter sido presente em todos os momentos, me orientando e motivando.

Agradeço aos companheiros de Laboratório de Pesquisas LiOA2 (Laboratório de Inovações Optrônicas para Oftalmologia e Agricultura) do IFSC – USP (Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo) cujo apoio deles foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, a qual me estendeu a mão desde o início e que sem ela, não teria conseguido concluir esse desafio

Agradeço os professores, colegas de curso que estiveram envolvidos de alguma forma neste trabalho e que me ajudaram ao longo dessa caminhada

Agradeço a Deus, por ter colocado em minha vida pessoas incríveis e por ter me dado esta oportunidade.

RESUMO

Considerando a composição química do esmalte dental, especialmente o conteúdo de carbonato que apresenta maior relação com a prevenção de cárie, e a escassez de estudos empregando laser de femtosegundo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações químicas e morfológicas do esmalte irradiado com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos, por meio de espectroscopia Raman, Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram utilizados dentes incisivos bovinos recém-extraídos para a obtenção de 30 espécimes de esmalte (5mm X 5mm). A composição química da amostra controle foi analisada por meio de espectrometria Raman para aquisição do espectro de absorção, sendo delimitadas as áreas sob as bandas de carbonato e fosfato. Esta análise foi utilizada para avaliação da alteração na composição química da amostra após a irradiação. A irradiação dos espécimes foi realizada com o sistema laser Ti:Safira (Libra S, Coherente), modo pulsado no regime de femtosegundos (aproximadamente 70 fs) e modo focalizado (distância focal de 20 cm), potência média 1 W, e tempo de exposição de 15 segundos. Após a irradiação, as áreas sob as bandas de absorção de carbonato e fosfato foram delimitadas em cada espécime. Os dados de espectrometria Raman foram analisados por meio do teste t de Student ($\alpha=5\%$). Comparando os espectros dos espécimes irradiados com os não irradiados, os resultados mostraram um aumento significativo do valor das áreas para os picos de fosfato e uma redução significativa do valor da área para o pico do carbonato e para a razão carbonato/fosfato. As análises em MCVL e em MEV, respectivamente, não revelaram alteração estrutural na subsuperfície e alterações morfológicas na superfície do esmalte irradiado. Concluiu-se que a irradiação com laser de femtosegundo utilizando parâmetros subablativos promoveu uma redução do conteúdo de carbonato e da razão carbonato/fosfato, sem alterar a estrutura e a morfologia do esmalte dental.

Palavras-chave: Femtosegundo; Raman; MCVL; MEV;

ABSTRACT

Chemical composition of dental enamel has a great relationship with the prevention of caries. The objective of the present work was to evaluate the chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel with subablative parameters using Raman spectroscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). Bovine incisor teeth were used to obtain 30 enamel specimens (5mm x 5 mm). The chemical composition of the control sample was analyzed by Raman spectrometry to acquire the absorption spectrum, delimiting the areas under the carbonate and phosphate bands. This analysis was used to evaluate the change in the chemical composition of the sample after irradiation. The specimens were irradiated (IRR) with a Ti:Sapphire laser system (pulsed and focused modes, femtosecond regime 70 fs, average power of 1 W and exposure time of 15 s). After irradiation, the areas under the carbonate and phosphate absorption bands were delimited in each specimen. Raman spectrometry data were analyzed using Student's t-test ($\alpha = 5\%$). By comparing the spectra of the IRR and non-irradiated (NI) specimens, the results showed a significant increase in the area value for the phosphate peaks and a significant reduction in the area value for the carbonate peak and the carbonate:phosphate ratio. CLSM and SEM analyses did not reveal structural alterations in the subsurface nor morphological alterations in the IRR enamel surface, respectively. It was concluded that femtosecond laser irradiation using subablative parameters reduced the carbonate content and the carbonate/phosphate ratio without altering the structure and morphology of the dental enamel.

Keywords: confocal laser scanning microscopy, Raman spectrometry, scanning electron microscopy;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro de cada espécime já processado	20
Figura 2- Média dos espectros e picos para os grupos irradiados e não irradiados.....	21
Figura 3- Destaque dos picos de interesse apresentados na Figura 2.....	22
Figura 4- Áreas dos picos e totais para os grupos irradiados e não irradiados	24
Figura 5- Intensidade dos picos para os grupos irradiados e não irradiados	24
Figura 6- Imagens representativas em microscopia confocal de varredura a laser dos cortes longitudinais dos blocos de esmalte.....	25
Figura 7- Micrografias representativas em MEV das superfícies de esmalte no aumento de 4000x.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores obtidos para o espectro de cada espécime.....	21
Tabela 2: Valores médios obtidos para área e intensidade dos picos de interesse dos grupos irradiados e não irradiados.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MCVL: Microscopia Confocal de Varredura a Laser

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

W: Watts

Er: Érbio

Cr YSGG: Laser de óxido de gadolínio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio

Er YAG: Laser de granada de ítrio-alumínio dopado com érbio

Nd YAG: Laser de granada ítrio alumínio dopada com neodímio

λ : Comprimento de onda

m: Mili (equivalente a 10^{-3})

IRR: Irradiado

NI: Não Irradiado

μ : Micro (equivalente a 10^{-6})

min: minutos

%: Percentual

°C: Graus Celsius

J: Joule

n: Nano (equivalente a 10^{-9})

CO₂: Dióxido de carbono

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVO	15
3.MATERIAL E MÉTODOS	16
4.RESULTADOS.....	20
5.DISSCUSSÃO	27
6.CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO A – Artigo resultante publicado em periódico internacional	37

1. INTRODUÇÃO

As lesões de cárie em esmalte são resultados de sucessivos ciclos de desmineralização e de reprecipitação de minerais presentes na saliva (remineralização), como os íons cálcio e fosfato (KASSEBAUN et al. 2015; AOBA, 2004). Tais desmineralizações, quando tratadas precocemente, podem regredir sem causar nenhum prejuízo à estrutura dental (FEATHERSTONE, FONTANA e WOLFF, 2018; BRADSHAW e LYNCH 2013).

Frente à dificuldade de controlar os processos de desmineralização do esmalte dental, novas tecnologias vêm sendo estudadas, como o emprego da irradiação com lasers de alta intensidade. Lasers de alta intensidade têm sido utilizados no esmalte dental com parâmetros subablativos para a prevenção e paralisação de lesões de cárie (FORMAINI et al. 2014). A irradiação do esmalte dental com os lasers de CO₂, Er (érbio), Cr:YSGG (óxido de gadolínio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio), Er:YAG (laser de granada de ítrio-alumínio dopado com érbio) e Nd:YAG (laser de granada ítrio alumínio dopada com neodímio), quando empregados com finalidade preventiva, modifica a morfologia e as propriedades físicas do esmalte incluindo fusão, recristalização e derretimento dos cristais de hidroxiapatita (FORMAINI et al. 2014; TAVARES et al. 2012). O objetivo de modificar a estrutura química e cristalina do esmalte dental é favorecer a estabilização dos íons cálcio e fosfato por meio da redução significativa do conteúdo de material orgânico intercrystalino, água e carbonato (substância que confere maior solubilidade à hidroxiapatita), aumentando a resistência do tecido à desmineralização (CORRÊA-AFONSO et al. 2012).

Os lasers de alta intensidade podem ser empregados no modo contínuo ou pulsado. Ambos são capazes de inibir a progressão de cárie, sendo o modo contínuo menos utilizado, pois oferece maiores riscos para o uso in vivo pelo aumento de temperatura na superfície e maior propagação para o interior do tecido dental, diferentemente do modo pulsado que permite que haja um relaxamento térmico entre um pulso e outro, diminuindo a propagação de calor para as camadas internas do tecido (CHEN et al. 2016). No entanto, a irradiação no modo pulsado convencional com pulsos de curta duração gera uma forte onda de choque térmico, podendo acarretar danos às superfícies dos tecidos dentais, tais como rachaduras e fissuras (BEHEROOZIBAKHSH, 2018). Conseqüentemente, os efeitos positivos da irradiação na resistência ácida do esmalte seriam diminuídos, pois a presença de rachaduras e

fissuras tornaria a superfície de esmalte mais suscetível à difusão de microrganismos e ácidos presentes no fluido do biofilme dental (BEHEROOZIBAKHSH, 2018).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de lasers de pulsos ultra-curtos, como o laser de femtosegundo, tem resultado em um interesse crescente em aplicações odontológicas devido à sua capacidade de ablação precisa e eficaz com ausência de dano colateral ao tecido proveniente de ondas de choque térmico (CHEN et al. 2015). Como a duração de pulso de um laser de femtosegundo é menor do que o tempo de relaxamento térmico dos tecidos, dentina ou esmalte são ionizados antes que a difusão térmica ocorra, restringindo a geração de efeitos térmicos (Petrov, Pecheva e WALMSLEY, 2018). Em estudos preliminares de ablação minimamente invasiva de esmalte e dentina utilizando laser de femtosegundo, diferentes parâmetros de irradiação foram testados para a escolha de parâmetros ótimos para a ablação em que não foram obtidos danos colaterais nem superaquecimento do tecido dentário (CHEN et al. 2016, PETROV, PECHEVA e WALMSLEY, 2018).

Entretanto, existe uma escassez de estudos relatando a utilização de laser de femtosegundo no esmalte dental com parâmetros subablativos para a prevenção e paralisação de lesões de cárie. Nesse sentido, o conhecimento sobre a composição química e a morfologia do esmalte dental irradiado com laser de femtosegundo é significativo para o desenvolvimento de estudos sobre prevenção de cárie.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, in vitro, os efeitos da irradiação do laser de femtosegundo com parâmetros subablativos sobre a composição química, estrutura e morfologia do esmalte dental.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O fator em estudo foi Tratamento do Esmalte em 2 níveis (A. Laser femtosegundo; B. Sem tratamento). A amostra do estudo foi composta por 30 espécimes de esmalte, os quais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (n=15), resultantes dos níveis do fator em estudo. A variável de resposta quantitativa foi alteração química do esmalte, avaliada por meio de espectroscopia Raman. As variáveis alteração estrutural subsuperficial do esmalte e alteração morfológica superficial do esmalte foram avaliadas qualitativamente por meio de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente.

Preparação dos espécimes

Os procedimentos de preparação dos espécimes foram realizados no Laboratório Pré-Clínico de Odontologia do UNICEP. Foram utilizados 30 dentes incisivos bovinos (obtidos em um único frigorífico - Frigorífico Mondelli, Bauru – SP), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - Protocolo CEUA nº 9745050419 – (documento em anexo).

Os dentes obtidos foram lavados com água corrente e detergente aniônico e limpos por meio de raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes e água, com escova tipo Robinson em baixa rotação. Os dentes foram então mantidos em um recipiente tampado contendo solução de timol a 0,01%, em refrigerador, para evitar o crescimento de fungos.

Para a preparação dos espécimes, inicialmente os incisivos tiveram suas coroas e raízes separadas por meio de uma secção localizada a 1 mm abaixo da junção amelocementária com um disco flexível diamantado dupla face montado em peça reta e micromotor odontológico de baixa rotação. As coroas dentais foram seccionadas nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual, de modo a serem obtidos blocos retangulares com dimensões de 5 mm x 5 mm. As superfícies de esmalte dos blocos foram polidas manualmente utilizando discos de lixa d'água (granulações 600 e 1200) e discos de feltro com pastas de diamante 0,3 µm e 0,05 µm. Entre a aplicação das lixas e das pastas de alumina, as amostras foram lavadas com água deionizada por 1 minuto. No final do polimento, a limpeza das amostras foi realizada por imersão

em cuba ultrassônica por 10 minutos para remoção de eventuais debris das superfícies.

Com o objetivo de delimitar a área a ser irradiada, etiquetas adesivas com dimensões de 3 mm x 3 mm foram posicionadas sobre a superfície de esmalte dos espécimes com auxílio de pinça e explorador. Os espécimes assim preparados foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (n=15) de acordo com o tratamento realizado nas superfícies de esmalte.

Tratamentos do esmalte

- A. ***Laser de femtosegundo (irradiado)***: a irradiação foi realizada com o sistema laser Ti:Safira (Libra S, Coherente) pulsado no regime de femtosegundos (aproximadamente 70 fs), com comprimento de onda de 801 nm, operando a uma taxa de repetição de pulso constante de 1 kHz no modo focalizado (distância focal de 20 cm). A superfície da área de esmalte exposta do espécime foi posicionada perpendicularmente ao feixe de laser no seu foco e irradiada com potência de 1 W, energia por pulso de 1 mJ e tempo de exposição de 15 segundos. O sistema laser utilizado pertence ao Laboratório de Inovações Tecnológicas Optrônicas para Oftalmologia e Agricultura (LIO2A), do Grupo de Óptica do IFSC-USP.
- B. ***Sem tratamento (não irradiado)***: controle.

Análise por espectrometria Raman

As superfícies de esmalte expostas foram analisadas por meio de espectroscopia Raman no espectrômetro da Ocean Optics (Inc., Dunedin, FL, USA), com excitação por laser de diodo ($\lambda=785$ nm) e resolução espectral de 11 cm^{-1} . As medidas foram feitas com excitação na potência de 400 mW, 5 segundos de aquisição e 3 aquisições, com o espectro final sendo a média de cada uma destas três medidas.

Todos os espectros foram tratados utilizando rotina de processamento em MatLab utilizada para tal fim. Esta realiza a seguinte lista de processos para cada espectro:

- Remoção de ruídos para suavização da curva;
- Remoção de curva de base com uso de polinomial de ordem seis;
- Remoção de oscilações de segunda ordem no interior das curvas;
- Definição dos picos de interesse;

- Plot de Lorentziana com máximo no pico de interesse;
- Cálculo da área de cada pico de interesse;
- Cálculo da intensidade de cada pico de interesse;
- Cálculo da área total do espectro.

Os picos selecionados para análise (Paolillo et al. 2019) foram:

- 438 nm – Pico relacionado ao fosfato modo vibracional ν_2 PO_4^{-3} na hidroxiapatita
- 582 nm – Modo vibracional ν_4 PO_4^{-3} na hidroxiapatita
- 960 nm – Alongamento vibracional simétrico dos íons fosfato (modo vibracional ν_1 PO_4^{-3} na hidroxiapatita)
- 1070 nm – Pico do carbonato CO_3^{-2}

Também foi feita a análise da razão carbonato/fosfato (1070 nm/960 nm), por meio da análise da razão entre os valores obtidos para os picos de ambos.

Os dados foram primeiramente separados de acordo com cada grupo (Irradiado – IRR - e Não Irradiado- NI). Além disso, foi retirada a média dos espectros (M). Também foi feita a organização dos dados obtidos para as áreas gerais dos espectros, com as médias para cada grupo, assim como em relação às áreas e intensidades de cada um dos picos de interesse (razão carbonato/fosfato 1070/960), através da análise da razão entre os valores obtidos para os picos de ambos.

Análise em microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal de varredura a laser foi utilizada para avaliar a extensão da alteração estrutural na subsuperfície do esmalte após a irradiação com laser de femtossegundo. Para isso, o espécime foi fixado com cera pegajosa em uma placa de acrílico a fim de ser realizada uma secção longitudinal no centro da área delimitada com um disco diamantado dupla-face montado em peça-reta de baixa rotação, resultando em duas metades. Uma das metades foi utilizada para a realização de microscopia confocal de varredura a laser e a outra metade foi destinada para observação da morfologia superficial em microscópio eletrônica de varredura.

As metades destinadas a microscopia confocal de varredura a laser foram incluídas em blocos de resina acrílica para serem obtidos cortes longitudinais com 1 mm de espessura, os quais foram posteriormente polidos com lixas d'água de granulação 600 e 1200 e feltro com pasta de alumina de 1 μm , e em seguida limpos em

cuba ultrassônica por 5 min para remoção de resíduos. Os cortes foram posicionados em lâminas de microscopia e levados ao microscópio confocal de fluorescência (Zeiss, modelo LSM 780 invertido) pertencente ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos – USP, com excitação de laser de Argônio com comprimento de onda de 488 nm, e lentes objetivas de 10x e 20x de aumento. Para avaliar a alteração na subsuperfície do esmalte, foram observadas as imagens resultantes das diferenças nos sinais fluorescentes emitidos pelo esmalte irradiado quando comparados ao tecido sem irradiação (CHINELATTI et al. 2017, RADLANSKI et al. 2001).

Análise da morfologia superficial em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises da morfologia superficial em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em cinco espécimes dos grupos irradiado e não irradiado. O preparo dos espécimes para MEV consistiu, primeiramente, de limpeza por imersão em cuba ultrassônica por 10 min, e posteriormente desidratação por imersão sequencial em soluções de álcool etílico com concentrações crescentes, sendo em álcool etílico 25% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 75% por 20 minutos, 90% por 30 minutos e 100% por 60 minutos. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas em estufa a 70 °C por 12 horas. Por fim, as amostras foram metalizadas recebendo cobertura de ouro para serem observadas em microscópio eletrônico de varredura (Philips XL-30 FEG) pertencente ao Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, com aumento de 4000x, sendo registradas as áreas mais representativas das alterações morfológicas da superfície do esmalte dos espécimes irradiados e não irradiados.

Análise dos dados

Os dados obtidos pelas análises de espectrometria Raman foram submetidos a análise estatística por meio do teste t de Student não pareado, com nível de significância de 5%, utilizando o software de análise estatística SPSS. As imagens obtidas por meio das avaliações de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura foram analisadas qualitativamente.

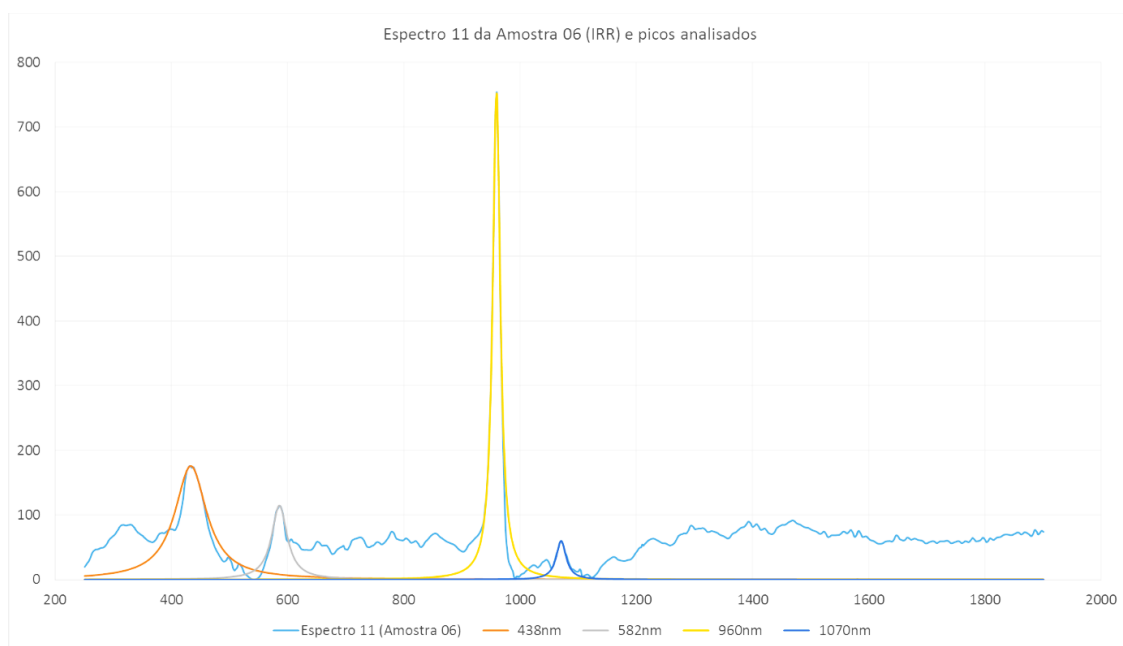
4.RESULTADOS

Espectrometria Raman

Os espectros Raman obtidos possibilitaram a identificação de picos referentes aos compostos característicos do esmalte dental PO_4^{-3} ν_1 , PO_4^{-3} ν_2 , PO_4^{-3} ν_4 , CO_3^{-2} ν_1 . Em todos os espécimes foi identificada a presença dos grupos fosfato e carbonato. Foi possível identificar três modos vibracionais referentes ao grupo fosfato, sendo PO_4^{-3} ν_1 em 960 nm, PO_4^{-3} ν_2 em 438 nm e PO_4^{-3} ν_4 em 582 nm. Para o carbonato, apenas um modo vibracional foi identificado em 1070 nm (CO_3^{-2} ν_1).

Os espectros após processamento seguiram o formato como indicado na Figura 1, na qual pode-se observar o espectro de um espécime do grupo irradiado processado, assim como as quatro Lorentzianas plotadas sob os picos de interesse.

Figura 1: Espectro já processado com quatro picos de interesse destacados para cada espécime.



Fonte: Próprio autor

Além das 5 curvas apresentadas, foram obtidos para cada espectro os valores de área e intensidade de cada pico, assim como a área total do espectro. Os valores podem ser observados na Tabela 1.

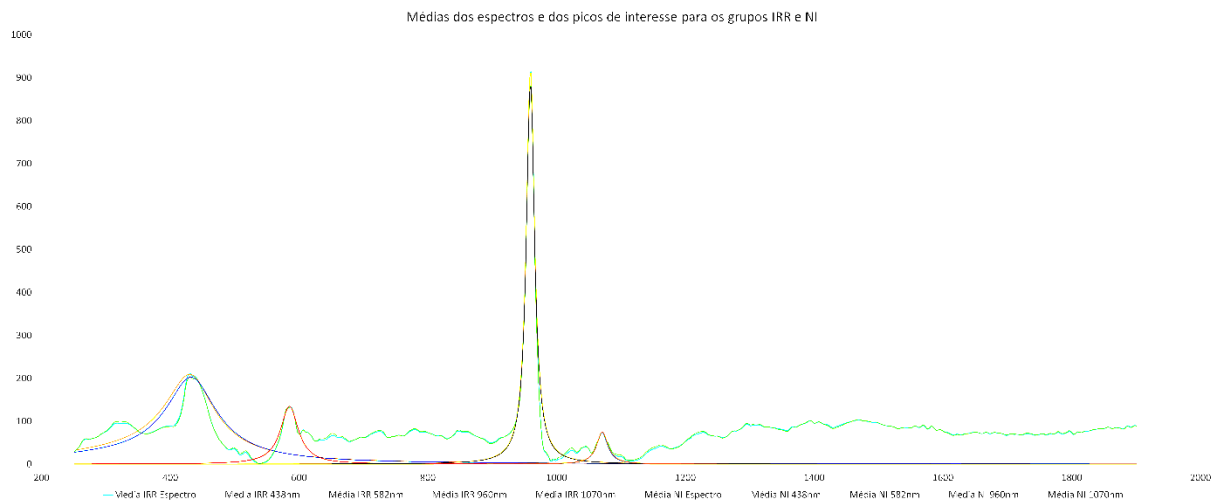
Tabela 1: Valores obtidos para o espectro de cada espécime

Espectro 11	Área Total: 108939,3			
Espécime 06	438 nm	582 nm	960 nm	1070 nm
Área	3464607	1544245	8968729	1056972
Intensidade	175,7642	114,5989	754,7708	59,87771

Fonte: Próprio autor

Os espectros foram analisados através da comparação das médias dos dois grupos irradiado (IRR) e não irradiado (NI). A Figura 2 apresenta as diferenças entre eles.

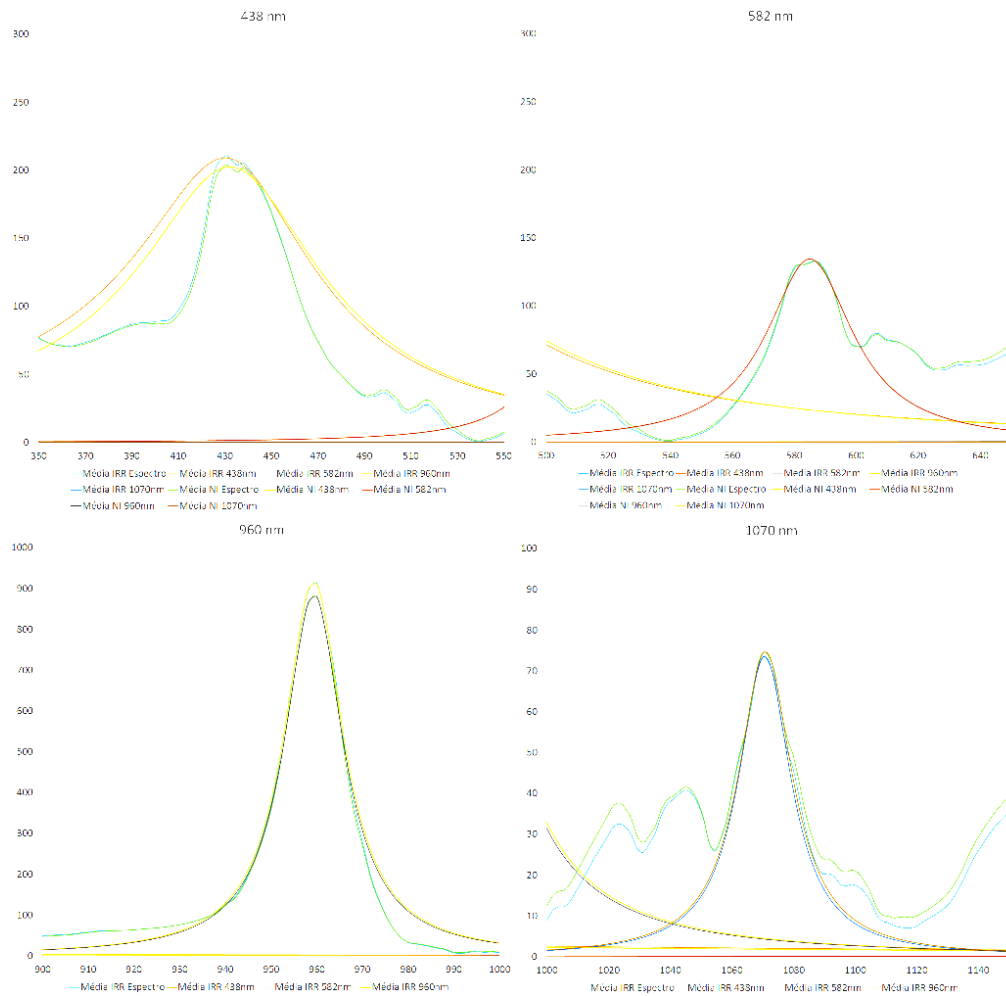
Figura 2: Média dos espectros e picos para os grupos IRR e NI.



Fonte: Próprio autor

Para melhor visualização, os picos apresentados na Figura 2 aparecem em destaque na Figura 3.

Figura 3: Destaque dos picos de interesse apresentados na Figura 2.



Fonte: Próprio autor

Também foram calculadas as médias para os picos escolhidos e os valores obtidos para as áreas e intensidades podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 4: Áreas dos picos e totais para os grupos IRR e NI além da razão entre os grupos.

Tabela 2: Valores médios obtidos para área e intensidade dos picos de interesse dos grupos irradiados e não irradiados

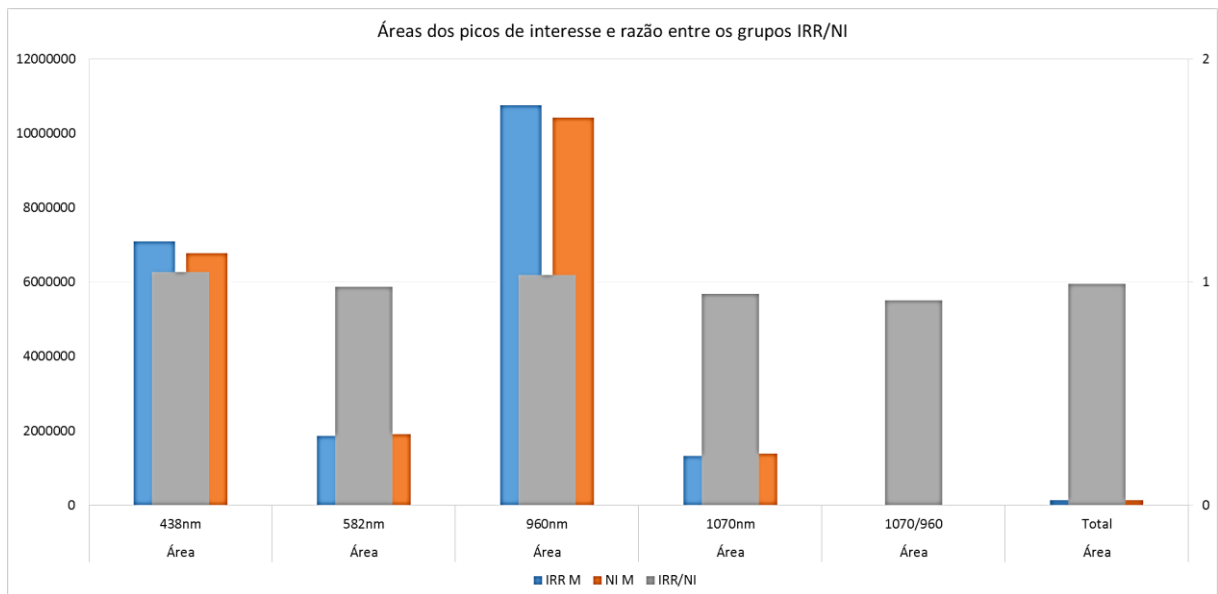
Pico	438 nm		582 nm		960 nm		1070 nm	
	Irradiado	Não irradiado	Irradiado	Não irradiado	Irradiado	Não irradiado	Irradiado	Não irradiado
Área	7199944*	6839137	1874794,71	1905279	10808357,94*	10379849	1319260,556*	1388109
Intensidade	220,3193	211,8616	135,4812	135,1924	918,5372	886,564	73,8593	75,0856

No sentido horizontal: * Indica diferença estatisticamente significativa entre as médias das áreas dos picos de interesse dos grupos irradiados e não irradiados (teste t de Student, $p < 0,05$). **Fonte:** Próprio autor.

Analisando as áreas dos picos de interesse, nota-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do valor das áreas para os picos de fosfato 438 nm e 960 nm quando considerados os espectros dos grupos irradiados com os não irradiados. Para o pico de fosfato 582 nm não houve alteração significativa ($p > 0,05$) nos valores das áreas dos grupos irradiados e não irradiados. Para o pico do carbonato (1070 nm) houve redução significativa ($p < 0,05$) do valor da área do grupo irradiado quando comparado ao grupo não irradiado.

Conforme apresentado na Figura 4: Áreas dos picos e totais para os grupos IRR e NI além da razão entre os grupos., observou-se uma redução nos valores das áreas correspondentes para a razão carbonato/fosfato (1070 nm/960 nm); não houve alteração significativa para a área total.

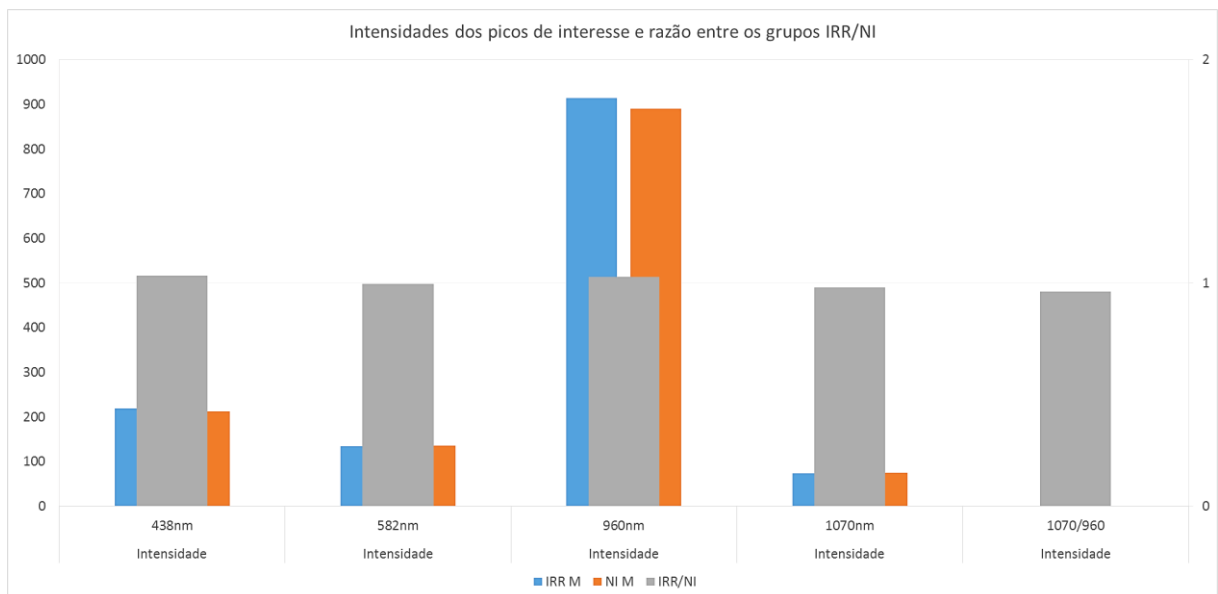
Figura 4: Áreas dos picos e totais para os grupos IRR e NI além da razão entre os grupos.



Fonte: Próprio autor

Além disso, na análise dos resultados das intensidades apresentados na Figura 5, pode-se observar aumento na intensidade dos picos em 438 nm e 960 nm.

Figura 5. Intensidade dos picos para os grupos IRR e NI além da razão entre os grupos.

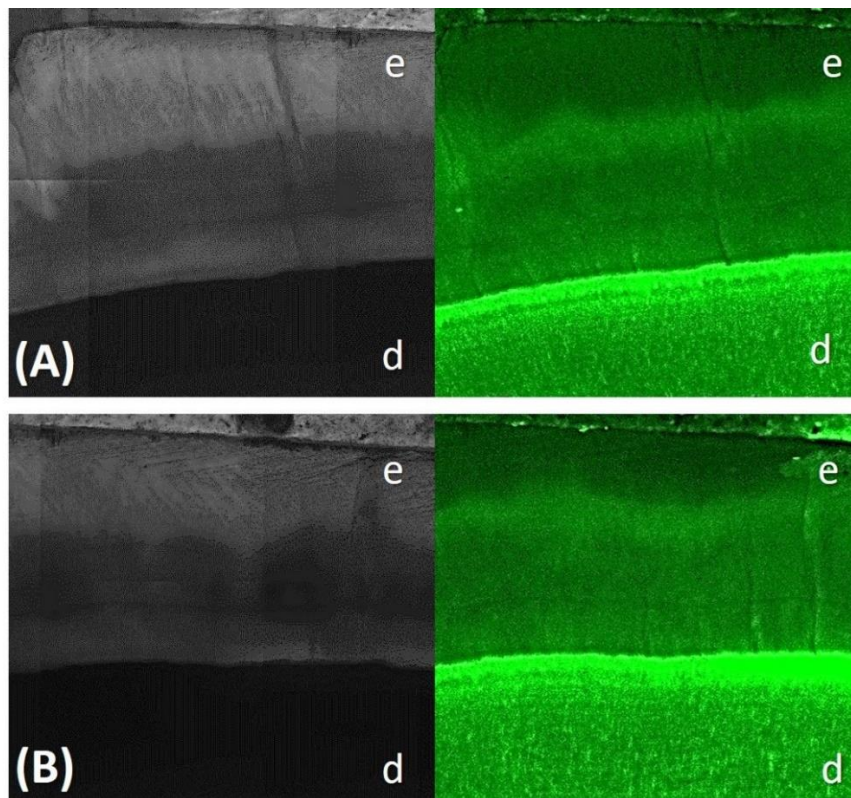


Fonte: Próprio autor

Microscopia confocal de varredura a laser

As imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser indicaram que não houve alteração estrutural na subsuperfície do esmalte irradiado (Figura 6.A), pois não foram identificadas diferenças nos sinais fluorescentes emitidos pelo esmalte irradiado quando comparados ao tecido sem irradiação (Figura 6.B).

Figura 6. Imagens representativas em microscopia confocal de varredura a laser dos cortes longitudinais dos blocos de esmalte. **(A)**: Subsuperfície do esmalte irradiado com laser de femtosegundo; **(B)**: Subsuperfície do esmalte não irradiado. Não são observadas diferenças nos sinais fluorescentes emitidos pelo esmalte irradiado quando comparados ao esmalte não irradiado. **e.** esmalte; **d.** dentina.



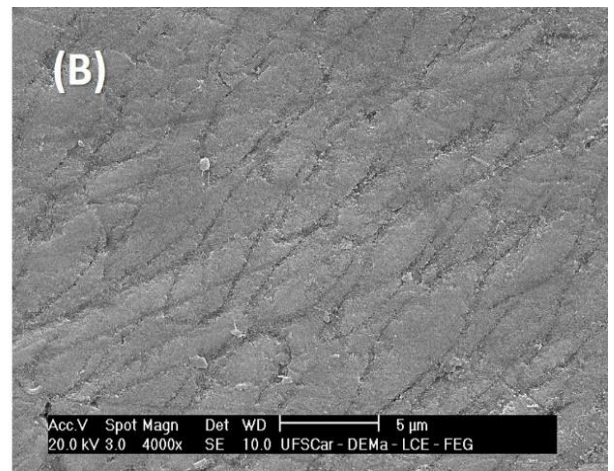
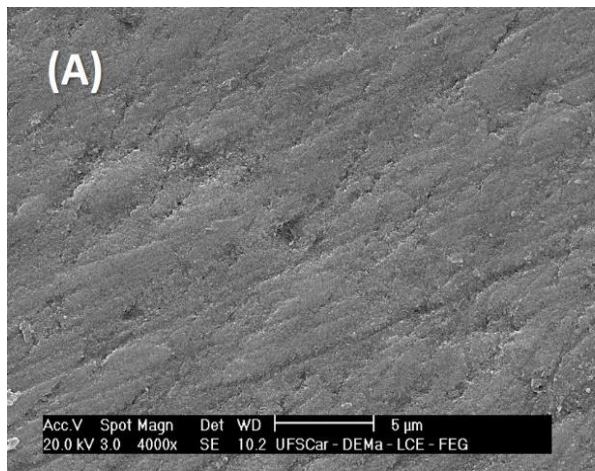
Fonte: Próprio autor

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias selecionadas como representativas da superfície dos espécimes de esmalte avaliados são apresentadas na Figura 7, A-B. As imagens correspondentes ao esmalte não irradiado (Figura 7. A) mostram uma superfície de morfologia homogênea, predominantemente densa e lisa, típicas de esmalte sadio. Os espécimes de esmalte irradiado com laser de femtosegundo (Figura 7. B)

apresentaram características semelhantes e não foram observadas alterações morfológicas significantes, fato que pode ser constatado pela ausência de microtrincas e áreas de fusão, além de nenhum grau de desorganização na superfície dos prismas.

Figura 7: Micrografias representativas em MEV das superfícies de esmalte no aumento de 4000x. (A). Superfície do esmalte não irradiado; (B). Superfície do esmalte irradiado com laser de femtosegundo.



Fonte: Próprio autor

5.DISCUSSÃO

A ablação do esmalte por lasers de femtossegundo tem sido demonstrada por vários autores (CHEN et al. 2016, Chen et al. 2015, LOGANATHAN et al. 2021, LE, BERTRAND e VILAR 2016, YUAN et al. 2017), porém não há uma caracterização detalhada das superfícies irradiadas com laser de femtossegundo empregando parâmetros subablativos, uma vez estudos anteriores demonstraram a capacidade dos lasers de alta potência com parâmetros subablativos de tornar o esmalte dental mais ácido-resistente (FORNAINI et al. 2014, CHAN et al. 2017, GERALDO-MARTINS, LEPRI e PALMA-DIBB 2013, TAVARES et al. 2012, CORRÊA-AFONSO et al. 2012, BEHROOZIBAKHSH 2018). O papel da irradiação a laser na prevenção da cárie tem sido amplamente estudado com foco no aumento da resistência à cárie causada por uma diminuição na taxa de desmineralização do esmalte (GERALDO-MARTINS, LEPRI e PALMA-DIBB 2013, TAVARES et al. 2012). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar as modificações químicas e estruturais do esmalte induzidas pela irradiação com laser de femtossegundo empregando parâmetros subablativos, o que poderia indicar se este tratamento seria uma estratégia favorável para a prevenção de lesões de cárie inicial. A análise por meio de espectroscopia Raman tem sido utilizada para a caracterização da estrutura química/molecular do esmalte dental e tem se mostrado cada vez mais importante devido a sua elevada especificidade bioquímica (WENTRUP-BYRNE et al. 1997, AOBA 2004), FEATHERSTONE, FONTANA, WOLFF 2018). Em análises realizadas em esmalte, o pico localizado em 960 nm tem sido atribuído ao grupo fosfato ν_1 e o pico presente em 1070 nm tem sido atribuído modo vibracional 1 do grupo carbonato (carbonato do tipo B).

Estudos utilizando hidroxiapatita, tem sugerido que mesmo pequenos níveis de alteração na composição química (por exemplo substituição por carbonato) podem induzir alterações na largura e na posição dos picos presentes no espectro Raman, principalmente no caso dos modos ν_1 e ν_3 do fosfato (PENEL et al. 1998). Da mesma forma, as intensidades dos picos carbonato e fosfato têm exibido valores maiores atribuídos a superfície externa do esmalte, enquanto intensidades menores têm sido encontradas nas porções mais internas do esmalte, indicando uma redução no grau de cristalinidade da hidroxiapatita (XU et al. 2012). Alterações ocorridas nas intensidades dos picos presentes no espectro Raman têm sido, ainda, associadas a

alterações na orientação dos cristalitos do esmalte (TSUDA e ARENDS 1997). Neste estudo, de acordo com os resultados obtidos pela análise de espectroscopia Raman do esmalte irradiado com laser de femtosegundo, foi possível identificar os picos característicos do esmalte dental em todos os espécimes. Os espectros do tecido irradiado mostraram um aumento de intensidade dos picos na região de 960 nm, referente ao fosfato ν_1 , e na região de 438 nm, referente ao fosfato ν_3 , e, ainda uma redução na intensidade do pico na região de 1070 nm, referente ao carbonato.

Além disso, estudos que realizaram análise química por meio de espectroscopia Raman do esmalte irradiado com diferentes tipos de laser mostraram uma diminuição no teor de carbonato e, conseqüentemente, um aumento da resistência ácida do esmalte (TSUDA e ARENDS 1997, ELLIOT 1973, HEWKO et al. 2008). Considerando a química subjacente às lesões de cárie inicial em esmalte, uma teoria que explica a preservação da área subsuperficial na zona de cárie é o baixo teor de carbonato do esmalte, já que se acredita que o carbonato tenha um efeito desestabilizador (ELIOTT, 1973). O carbonato, embora seja um precursor da hidroxiapatita, pode causar defeitos no cristal, se encaixa mal na rede cristalina e gera mais apatita solúvel em ácido (SPIZZIRRI et al. 2012). No presente estudo, os resultados da análise por espectroscopia Raman mostraram que houve uma diminuição do conteúdo de carbonato na superfície do esmalte irradiado com laser de femtosegundo quando comparado ao esmalte não irradiado, o que, conseqüentemente, pode ter um papel na redução de sua dissolução, prevenindo a cárie do esmalte.

Além disso, a razão carbonato/fosfato tem sido considerada um indicador da susceptibilidade do esmalte ao ataque ácido durante o processo de formação da cárie (AKKUS, KARASICK e ROPERTO 2017, CAVALLI et al. 2018). A diminuição da razão carbonato/fosfato tem sido encontrada na análise do esmalte submetido à desmineralização em comparação ao esmalte sadio (BARRERA-ORTEGA et al 2020, CAVALLI et al. 2018).

A análise das áreas dos picos de interesse revelou um aumento significativo do valor das áreas para os picos fosfato 438 nm e 960 nm dos espécimes irradiados. As intensidades relativas dos picos referentes ao fosfato têm sido associadas a cristalinidade do cristal apatita, de maneira que quanto maior a organização do cristal, maior a intensidade destes picos. Da mesma maneira, uma diminuição na intensidade dos picos fosfato foram encontradas em lesões de cárie inicial no esmalte (CAVALLI

et al. 2018). Os aumentos observados nos valores de área dos picos fosfato referentes ao esmalte irradiado com laser de femtosegundo podem ser um indicativo de que houve uma melhora na organização da fase cristalina do esmalte após a irradiação.

Para a prevenção da desmineralização do esmalte dental, a luz laser deve ser fortemente absorvida e convertida de forma eficiente em calor sem causar danos estruturais aos tecidos subjacentes ou circundantes, com a vantagem de alterar a composição ou diminuir solubilidade de tecidos duros dentais (YUAN et al. 2017). O microscópio confocal de varredura a laser é capaz de identificar o sinal fluorescente emitido pela estrutura dentária, possibilitando a visualização das características do esmalte dental e a variação do conteúdo mineral (CHINELATTI et al. 2017, RADLANSKI et al. 2001, AL-OBAIDI 2020). As imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser indicam que não houve alteração na subsuperfície do esmalte irradiado com laser de femtosegundo, pois não foram identificadas diferenças nos sinais fluorescentes emitidos pelo esmalte irradiado quando comparados ao esmalte não irradiado.

De acordo com a avaliação morfológica por MEV realizada no esmalte dos espécimes dos grupos irradiado e não irradiado, foi observado que a irradiação com o laser de femtosegundo não promoveu alterações no esmalte. As imagens correspondentes ao esmalte irradiado apresentaram características semelhantes ao esmalte não irradiado, mostrando uma superfície de morfologia homogênea, predominantemente densa e lisa, com ausência de microtrincas, áreas de fusão, rugosidades e sem desorganização na superfície dos prismas. Essas características são compatíveis com o arranjo dos cristais da rede cristalina da superfície do esmalte e com o aumento da cristalinidade do tecido. Somado à ausência da rugosidade superficial, reduz a aderência do biofilme dental e pode ser considerada uma característica de prevenção. Sabe-se que a presença de trincas, áreas de rugosidade e prismas expostos na superfície do esmalte podem agir como pontos de fragilidade, promovendo áreas mais susceptíveis ao ataque ácido, favorecendo a desmineralização em profundidade das trincas, além de serem considerados locais favoráveis para o acúmulo de bactérias cariogênicas (RODRÍGUES-VILCHIS et al. 2011).

O presente estudo não realizou testes para avaliar se a solubilidade do esmalte em meio ácido foi comprometida. Relatos da literatura sugerem que o aumento de carbonato está relacionado com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões de cárie e erosão dental (XU 2012, SPIZIRRI et al. 2012). Baixos níveis de carbonato têm sido associados a menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido produzido pelo processo de formação da cárie (TSUDA e ARENDS 1997). O presente estudo observou alterações significativas nos índices de carbonato e fosfato entre os grupos avaliados. Apesar disso, mais estudos são necessários para avaliar se as alterações no conteúdo de carbonato e fosfato apresentadas pelo presente estudo são suficientes para promover alterações na solubilidade do esmalte em meio ácido.

6.CONCLUSÃO

A irradiação do esmalte dental com laser de femtosegundo com parâmetros subablativos promoveu uma redução significativa do conteúdo de carbonato e da razão carbonato/fosfato, sem alterar a estrutura e a morfologia do tecido dental.

7.REFERÊNCIAS

KASSEBAUM NJ, BERNABÉ E, DAHIYA M, BHANDARI B, MURRAY CJ, MARCENES W. Global burden of untreated caries: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 2015; 94:650-8.

AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis.* 2004; 10 (5): 249-57.

FEATHERSTONE JD, FONTANA M, WOLFF M. Novel anticaries and remineralization agents: Future research needs. *J Dent Res* 2018; 97:125-7.

BUZALAF MA, PESSAN JP, HONÓRIO HM, TEN CATE JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:97-114

BRADSHAW DJ, LYNCH RJ. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J.* 2013; 63 Suppl 2:64-72.

FORNAINI C, BRULAT N, MILIA G, ROCKL A, ROCCA JP. The use of sub-ablative Er:YAG laser irradiation in prevention of dental caries during orthodontic treatment. *Laser Ther.* 2014; 23(3):173-81.

CHANG NN, JEW JM, SIMON JC, CHEN KH, LEE RC, FRIED WA, CHO J, DARLING CL, FRIED D. Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4 μm on surface morphology, permeability, and acid resistance. *Lasers Surg Med.* 2017; 49(10):913-927.

GERALDO-MARTINS VR, LEPRI CP, PALMA-DIBB RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1):33-9.

TAVARES JG, EDUARDO CDE P, BURNETT LH JR, BOFF TR, DE FREITAS PM. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(8):433-7.

CORRÊA-AFONSO AM, BACHMANN L, ALMEIDA CG, CORONA SA, BOR-SATTO MC. FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(9):1153-8.

CHEN H, LI H, SUN Y, WANG Y, LÜ P. Femtosecond laser for cavity preparation in enamel and dentin: ablation efficiency related factors. *Sci Rep.* 2016; 6:20950.

BEHROOZIBAKHSH M et al. Evaluation of crystalline changes and resistance to demineralization of the surface of human dental enamel treated with Er:YAG laser and fluoride using x-ray diffraction analysis and Vickers microhardness. *Laser Phys.* 2018; 6:065602.

CHEN H, LIU J, LI H, GE W, SUN Y, WANG Y, LÜ P. Femtosecond laser ablation of dentin and enamel: relationship between laser fluence and ablation efficiency. *J Biomed Opt.* 2015; 20(2):28004. Doi: 10.1117/1.JBO.20.2.028004.

PETROV T, PECHEVA E, WALMSLEY AD, DIMOV S. Femtosecond laser ablation of dentin and enamel for fast and more precise dental cavity preparation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018; 90:433-438.

PAOLILLO FR, ROMANO RA, DE MATOS L, MARTIN AA, GUIMARÃES FEG, DE CASTRO NETO JC, BAGNATO VS. Short-term and long-term effects of osteoporosis on incisor teeth and femoral bones evaluated by Raman spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2019; 37(1):18-27. Doi: 10.1007/s00774-018-0903-6.

CHINELATTI MA, TIRAPELLI C, CORONA SAM, JASINEVICIUS RG, PEITL O, ZANOTTO ED, PIRES-DE-SOUZA FCP. Effect of a Bioactive Glass Ceramic on the Control of Enamel and Dentin Erosion Lesions. *Braz Dent J.* 2017; 28(4):489-497.

RADLANSKI RJ, RENZ H, WILLERSINN U, CORDIS CA, DUSCHNER H. Outline and arrangement of enamel rods in human deciduous and permanent enamel. 3D-

reconstructions obtained from CLSM and SEM images based on serial ground sections. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109:409-414.

LOGANATHAN S, SANTHANAKRISHNAN S, BATHE R, ARUNACHALAM M. FTIR and Raman as a noninvasive probe for predicting the femtosecond laser ablation profile on heterogeneous human teeth. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021; 115:104256. Doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104256.

LE QT, BERTRAND C, VILAR R. Femtosecond laser ablation of enamel. *J Biomed Opt.* 2016; 21(6):65005. doi: 10.1117/1.JBO.21.6.065005.

YUAN F, ZHENG J, SUN Y, WANG Y, LYU P. Regulation and Measurement of the Heat Generated by Automatic Tooth Preparation in a Confined Space. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35(6):332-337. Doi: 10.1089/pho.2016.4242.

WENTRUP-BYRNE E, ARMSTRONG CA, ARMSTRONG RS, COLLINS BM. FOURIER transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. *J Raman Spectrosc.* 1997; 28(2-3): 151-8.

PENEL G, LEROY G, REY C, BRES E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63(6): 475-81.

XU C, REED R, GORSKI JP, WANG Y, WALKER MP. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *J Mater Sci.* 2012; 47(23): 8035-43.

TSUDA H, ARENDS J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 539-47.

ELLIOTT JC. The problems of the composition and structure of the mineral components of the hard tissues. *Clin Orthop Relat Res.* 1973; 93: 313-45.

KO AC, HEWKO M, SOWA MG, DONG CC, CLEGHORN B, CHOO-SMITH LP. Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system. *Opt Express*. 2008; 16(9): 6274-84.

SPIZZIRRI PG, COCHRANE NJ, PRAWER S, REYNOLDS EC. A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy. *Caries Res*. 2012; 46(4): 353-60.

AKKUS A, KARASIK D, ROPERTO R. Correlation between micro-hardness and mineral content in healthy human enamel. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9(4):e569-e573. Doi: 10.4317/jced.53345.

BARRERA-ORTEGA C C 1, VÁZQUEZ-OLMOS A R 2, SATO-BERRÚ R Y 2, ARAIZA-TÉLLEZ M A. Study of Demineralized Dental Enamel Treated with Different Fluorinated Compounds by Raman Spectroscopy. *J Biomed Phys Eng*. 2020; 10(5):635-644. doi: 10.31661/jbpe.v0i0.2003-1089.

CAVALLI V, ROSA DAD, SILVA DPD, KURY M, LIPORONI PCS, SOARES LES, MARTINS AA. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26:e20170589. Doi: 10.1590/1678-7757-2017-0589.

AL-OBAIDI R.A,D · SALEHI H.A · COLLART-DUTILLEUL P.Y.A · JACQUOT B.B · TASSERY H.A,B · CUISINIER F.J.G.A · GERGELY C.C · CLOITRE T. Relationship between Changes in Chemical Composition of Enamel Subsurface Lesions and the Emitted Nonlinear Optical Signals: An in vitro Study. *Caries Res* 2020; 54:144–153. <https://doi.org/10.1159/000505904>.

RODRÍGUEZ-VILCHIS LE, CONTRERAS-BULNES R, OLEA-MEJÌA OF, SÁNCHEZ-FLORES I, CENTENO-PEDRAZA C. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(7): 493-500.

ALVES, MARIA BERNADETE MARTINS; ARRUDA, SUSANA MARGARETH. Como fazer referências: bibliográficas, eletrônicas e demais formas de documento. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Biblioteca Universitária, c2001. Disponível em: <http://www.bu.ufsc.br/design/framerefer.php>. Acesso em: 11 abr. 2013.

ANEXO A – Cópia do artigo resultante publicado em abril de 2021 no periódico
Microscopy Research and Technique

Chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel using subablative parameters

Heitor Hussni Casarin¹ | Vicente Silva Mattos² | Jarbas Caiado de Castro Neto² | Michelle Alexandra Chinelatti¹ 

¹School of Dentistry, Central Paulista University Center – UNICEP São Carlos, São Carlos, Brazil

²São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, Brazil

Correspondence

Michelle Alexandra Chinelatti, UNICEP São Carlos, Curso de Odontologia, Rua Miguel Petroni 5111, CEP 13563-470, São Carlos-SP, Brazil.

Email: michinelatti@hotmail.com

Review Editor: Alberto Diaspro

Abstract

Chemical composition of dental enamel has a great relationship with the prevention of caries. The objective of the present work was to evaluate the chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel with subablative parameters using Raman spectroscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). Bovine incisor teeth were used to obtain 30 enamel specimens ($5 \times 5 \text{ mm}^2$). The chemical composition of the control sample was analyzed by Raman spectrometry to acquire the absorption spectrum, delimiting the areas under the carbonate and phosphate bands. This analysis was used to evaluate the change in the chemical composition of the sample after irradiation. The specimens were irradiated (IRR) with a Ti:Sapphire laser system (pulsed and focused modes, femtosecond regime 70 fs, average power of 1 W and exposure time of 15 s). After irradiation, the areas under the carbonate and phosphate absorption bands were delimited in each specimen. Raman spectrometry data were analyzed using Student's *t*-test ($\alpha = 5\%$). By comparing the spectra of the IRR and non-irradiated (NI) specimens, the results showed a significant increase in the area value for the phosphate peaks and a significant reduction in the area value for the carbonate peak and the carbonate:phosphate ratio. CLSM and SEM analyses did not reveal structural alterations in the subsurface nor morphological alterations in the IRR enamel surface, respectively. It was concluded that femtosecond laser irradiation using subablative parameters reduced the carbonate content and the carbonate/phosphate ratio without altering the structure and morphology of the dental enamel.

KEYWORDS

confocal laser scanning microscopy, Raman spectrometry, scanning electron microscopy

1 | INTRODUCTION

Caries disease is still very prevalent in underdeveloped and developing countries and is the result of successive cycles of demineralization and reprecipitation of minerals present in saliva (remineralization), such as calcium and phosphate ions (Aoba, 2004; Kassebaum et al., 2015). When treated early, such demineralizations can regress without causing any damage to the dental structure (Bradshaw &

Lynch, 2013; Buzalaf, Pessan, Honório, & ten Cate, 2011; Featherstone, Fontana, & Wolff, 2018).

Due to the difficulty of controlling the enamel demineralization processes, new technologies have been studied, such as the use of irradiation with high-intensity lasers, which have been used in dental enamel with subablative parameters for the prevention and control of caries lesions (Fornaini, Brulat, Milla, Rock, & Rocca, 2014). When used for preventive purposes, the irradiation of dental enamel with CO_2 , Er:Cr:YSGG, Er:YAG

and Nd:YAG lasers modifies the enamel morphology and physical properties, including melting, recrystallization, and melting of hydroxyapatite crystals (Fornaini et al., 2014; Chang et al., 2017; Geraldo-Martins, Lepri, & Palma-Dibb, 2013; Tavares, de Eduardo, Burnett Jr, Boff, & de Freitas, 2012). The objective of modifying the chemical and crystalline structure of dental enamel is to favor the stabilization of calcium and phosphate ions by significantly reducing the content of intercrystalline organic material, water, and carbonate, increasing tissue resistance to demineralization (Corrêa-Afonso, Bachmann, Almeida, Corona, & Borsatto, 2012).

High-intensity lasers can be used either in continuous or pulsed mode. Although both can inhibit the progression of caries, the continuous mode is less used as it offers greater risks for in vivo use due to the increase in the surface temperature and greater propagation inward the dental tissue. On the other hand, the pulsed mode allows a thermal relaxation between one pulse and another, reducing the heat propagation into the tissue inner layers (Chen, Li, Sun, Wang, & Lü, 2016). However, irradiation in the conventional pulsed mode with short pulses generates a strong thermal shock wave, which can cause damage to the surfaces of dental tissues, such as cracks and fissures (Behroozibakhsh, Shahabi, Ghavami-Lahiji, Sadeghian, & Nazari, 2018). Consequently, the positive effects of irradiation on the acid resistance of the enamel would be reduced since the presence of cracks and fissures would make the enamel surface more susceptible to the diffusion of microorganisms and acids present in the dental biofilm fluid (Behroozibakhsh et al., 2018).

In recent years, the development of ultra-short pulse lasers such as the femtosecond laser has resulted in an increasing interest in dental applications due to its accurate and effective ablation ability with no collateral tissue damage from thermal shock waves (Chen et al., 2015). As the pulse duration of a femtosecond laser is shorter than the thermal relaxation time of the tissues, dentin or enamel is ionized before the occurrence of thermal diffusion, restricting the generation of thermal effects (Petrov, Pecheva, Walmsley, & Dimov, 2018). In preliminary studies of minimally invasive enamel and dentin ablation using femtosecond laser, different irradiation parameters were tested to choose optimal parameters for ablation with no collateral damage or overheating of the dental tissue (Behroozibakhsh et al., 2018; Chen et al., 2015; Chen et al., 2016; Petrov et al., 2018).

However, few studies report the use of femtosecond laser in dental enamel with subablative parameters for the prevention and control of caries lesions. In this sense, it is essential to analyze the chemical composition and morphology of femtosecond laser-irradiated dental enamel for the development of studies on caries prevention. Therefore, the objective of this work was to evaluate in vitro the effects of femtosecond laser irradiation with subablative parameters on the chemical composition, structure, and morphology of dental enamel.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental design

The factor under study was *enamel treatment* in two levels: (a) laser femtosecond irradiation and (b) no treatment. The study

sample consisted of 30 enamel specimens, which were randomly divided into two groups ($n = 15$), resulting from the levels of the factor under study. The quantitative response variable was *enamel chemical change*, evaluated by Raman spectroscopy. The *enamel subsurface structural change* and the *enamel superficial morphological change* variables were qualitatively evaluated using laser scanning confocal microscopy and scanning electron microscopy (SEM), respectively.

2.2 | Preparation of specimens

The specimen preparation procedures were performed at the Pre-Clinical Dentistry Laboratory at UNICEP. Thirty bovine incisor teeth were used after approval by the Ethics Committee on the Use of Animals—CEUA, protocol No. 9745050419.

The obtained teeth were washed with running water and anionic detergent, followed by ultrasonic cleaning and prophylaxis with pumice stone and water using a Robinson Brush in low rotation. The teeth were then kept in a capped container containing 0.01% thymol solution inside a refrigerator to prevent the growth of fungi.

For the preparation of the specimens, firstly the incisors had their crowns and roots separated by a section located 1 mm below the cemento-enamel junction using a flexible double-sided diamond disc mounted on a micromotor low speed handpiece. The dental crowns were sectioned in the mesiodistal and buccal-lingual directions in order to obtain rectangular slabs with dimensions of 5×5 mm. The enamel surfaces of the slabs were manually polished using 600- and 1,200-grit silicon carbide paper discs and 0.3- and 0.05- μm diamond paste on cloth. Between the application of silicon carbide paper and diamond paste, the samples were washed with deionized water for 1 min. After polishing, the samples were cleaned by immersion in an ultrasonic cleaner for 10 min to remove any debris from the surfaces.

To delimit the area to be IRR, adhesive labels with dimensions of 3×3 mm were placed on the enamel surface of the specimens with the aid of tweezers and dental explorer. The as-prepared specimens were randomly distributed into the two groups ($n = 15$) according to the treatment performed on the enamel surfaces.

2.3 | Enamel treatments

1. *Femtosecond laser (IRR)*: the irradiation was performed using the Ti:Sapphire laser system (Libra S, Coherent) pulsed in the femtosecond regime (approximately 70 fs) with a wavelength of 801 nm, operating at a constant pulse repetition rate of 1 kHz in focused mode (focal length of 20 cm). The surface of the exposed enamel area of the specimen was positioned perpendicular to the laser beam and IRR with a power of 1 W, pulse energy of 1 mJ, and exposure time of 15 s.
2. *No treatment (NI)*: control.

2.4 | Raman spectrometry analysis

The exposed enamel surfaces were analyzed by Raman spectroscopy using an Ocean Optics spectrometer (Inc., Dunedin, FL, USA) with excitation by diode laser ($\lambda = 785$ nm) and spectral resolution of 11 cm^{-1} . Three measurements were made with a power excitation of 400 mW and an acquisition time of 5 s, being the final spectrum the average of these three measurements.

All spectra were treated using a MatLab processing routine. It performs the following list of processes for each spectrum:

- Noise removal for curve smoothing.
- Base curve removal using six-order polynomial.
- Removal of second-order oscillations within the curves.
- Definition of peaks of interest.
- Lorentzian plot with maximum at the peak of interest.
- Calculation of the area of each peak of interest.
- Calculation of the intensity of each peak of interest.
- Calculation of the total spectrum area.

The peaks selected for the analysis (Paolillo et al., 2019) were:

- 438 nm—Peak related to phosphate (PO_4^{-3} ν_2 vibrational mode in hydroxyapatite)
- 582 nm— PO_4^{-3} ν_4 vibrational mode in hydroxyapatite
- 960 nm—Symmetric vibrational elongation of phosphate ions (PO_4^{-3} ν_1 vibrational mode in hydroxyapatite)
- 1,070 nm— CO_3^{-2} carbonate peak

The analysis of the carbonate/phosphate ratio (1,070:960 nm) was also carried out by considering the ratio between the values obtained for the peaks of both.

The data were first separated according to each group (IRR and NI). Then, the spectra average (M) was taken. The organization of the data obtained for the general areas of the spectra was also made based on the averages for each group, as well as in relation to the areas and intensities of each peak of interest (carbonate:phosphate ratio—1,070:960) through the analysis of the ratio between the values obtained for the peaks of both.

2.5 | Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis

CLSM was used for an in-depth evaluation of the extent of the structural change in the enamel subsurface after femtosecond laser irradiation. To this end, the specimen was fixed with sticky wax on an acrylic plate in order to make a longitudinal section in the center of the delimited area using a double-sided diamond disc mounted on a micro-motor low speed handpiece, resulting in two halves. One half was used to perform CLSM, while the other was used to observe the surface morphology in a scanning electron microscope.

The halves intended for laser scanning confocal microscopy were embedded in acrylic resin slabs to obtain longitudinal cuts with a thickness of 1 mm, which were later polished with 600- and 1,200-grit silicon carbide papers and 1- μm diamond paste on cloth. Subsequently, they were cleaned in an ultrasonic cleaner for 5 min for residue removal. The sections were placed on microscope slides and taken to the confocal fluorescence microscope (Zeiss, model LSM 780, inverted), with argon laser excitation with a 488-nm wavelength and 10 \times and 20 \times magnification objective lenses. To evaluate the change in the enamel subsurface, the images resulting from the differences between fluorescent signals emitted by the IRR enamel when compared to the tissue without irradiation were observed (Chinelatti et al., 2017; Radlanski, Renz, Willersinn, Cordis, & Duschner, 2001).

2.6 | Analysis of superficial morphology by SEM

The analysis of superficial morphology by SEM was performed on five specimens from the IRR and NI groups. The preparation of the specimens consisted of cleaning by immersion in an ultrasonic cleaner for 10 min, followed by dehydration by sequential immersion in ethyl alcohol solutions with increasing concentrations: 25% ethyl alcohol for 20 min, 50% for 20 min, 75% for 20 min, 90% for 30 min, and 100% for 60 min. Afterwards, the samples were stored in an oven at 70°C for 12 hr. Lastly, the samples were metallized and covered with gold to be observed in a scanning electron microscope (Phillips XL-30 FEG), at a magnification of 4,000 \times , in order to record the most representative areas of the morphological changes on the enamel surface of IRR and NI specimens.

2.7 | Data analysis

The data obtained by Raman spectrometry were subjected to statistical analysis using the unpaired Student's *t*-test with a 5% significance level in the SPSS software. On the contrary, the images obtained by laser scanning confocal microscopy and SEM were analyzed qualitatively.

3 | RESULTS

3.1 | Raman spectrometry

The Raman spectra obtained enabled the identification of peaks related to the characteristic dental enamel compounds: PO_4^{-3} ν_1 , PO_4^{-3} ν_2 , PO_4^{-3} ν_4 , and CO_3^{-2} ν_1 . The presence of phosphate and carbonate groups was identified in all specimens. It was possible to observe three vibrational modes referring to the phosphate group: PO_4^{-3} ν_1 at 960 nm, PO_4^{-3} ν_2 at 438 nm, and PO_4^{-3} ν_4 at 582 nm. For carbonate, only one vibrational mode was identified at 1070 nm (CO_3^{-2} ν_1).

The spectra after processing followed the format shown in Figure 1, in which the spectrum of a specimen from the processed IRR group, as well as the four Lorentzians plotted under the peaks of interest, can be observed.

In addition to the five curves presented, the area and intensity values of each peak were obtained for each spectrum, as well as the total area of the spectrum. The values can be seen in Table 1.

The spectra were analyzed by comparing the averages of the IRR and NI groups. Figure 2 shows the differences between them.

For better visualization, the peaks shown in Figure 2 are highlighted in Figure 3.

The averages of the chosen peaks were also calculated, and the values obtained for the areas and intensities can be seen in Table 2 and Figure 4.

By analyzing the areas of the peaks of interest, a significant increase ($p < .05$) was noted in the area values for the phosphate peaks at 438 nm and 960 nm when considering the spectra of the IRR and NI groups. Differently, for the phosphate peak at 582 nm there was no significant change ($p > .05$), while for the peak at 1070 nm a significant decrease in the area value of the IRR group ($p < .05$) in comparison with the NI group could be observed.

According to Figure 4, there was a reduction in the values of the corresponding areas for the carbonate:phosphate ratio (1,070:960 nm). However, no significant change in the total area was observed.

Additionally, from the analysis of the results regarding the intensities shown in Figure 5 it was possible to note an increase in the intensity of the peaks at 438 and 960 nm.

3.2 | Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

The images obtained by CLSM indicated that there was no structural change in the subsurface of the IRR enamel (Figure 6a), as no differences were identified in the fluorescent signals emitted by the IRR enamel when compared to the tissue without irradiation (Figure 6b).

3.3 | Scanning electron microscopy (SEM)

The micrographs selected as representative of the surface of the enamel specimens evaluated are shown in Figures 7a,b. The images corresponding to the NI enamel (Figure 7a) show a surface with predominantly dense and smooth homogeneous morphology, typical of healthy enamel. Although the femtosecond laser-irradiated enamel specimens (Figure 7b) presented similar characteristics, no significant morphological changes—which can be seen by the absence of microcracks and melting areas—and no degree of disorganization on the surface of the prisms could be observed.

TABLE 1 Illustrative table of the values obtained for the spectrum of each specimen

Spectrum 11	Total area: 108939,3			
Specimen 06	438 nm	582 nm	960 nm	1070 nm
Area	3464607	1544245	8968729	1056972
Intensity	175,7642	114,5989	754,7708	59,87771

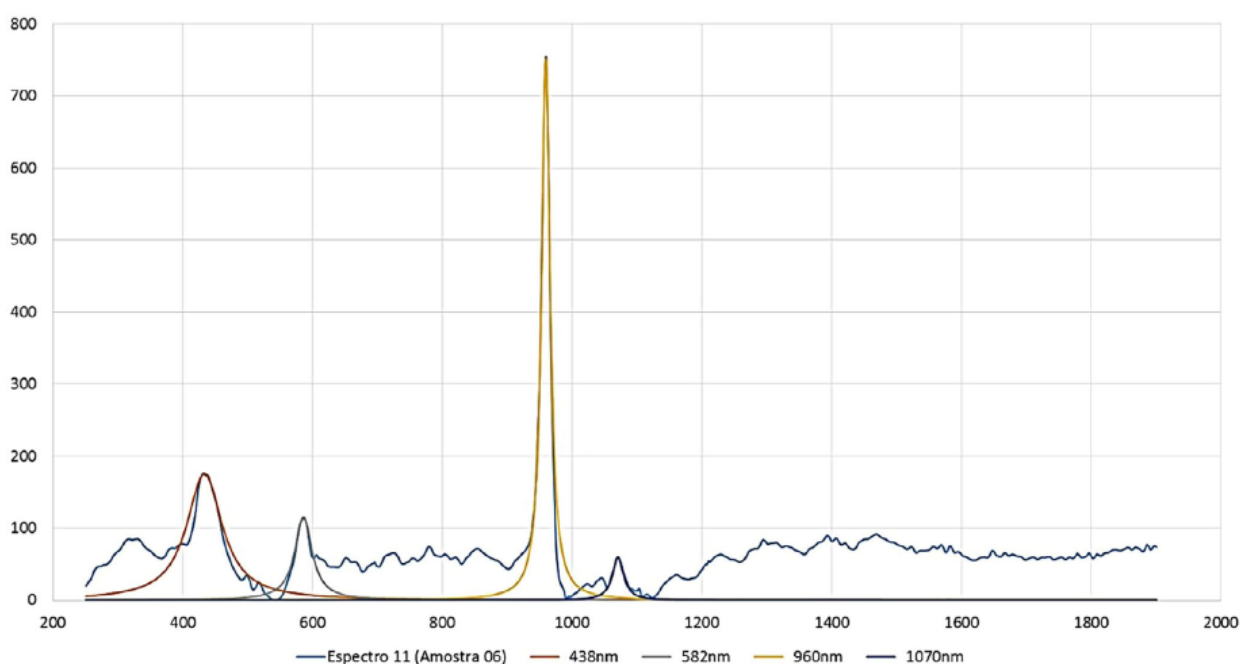


FIGURE 1 Illustrative figure showing the processed spectrum with the four peaks of interest highlighted for each specimen [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

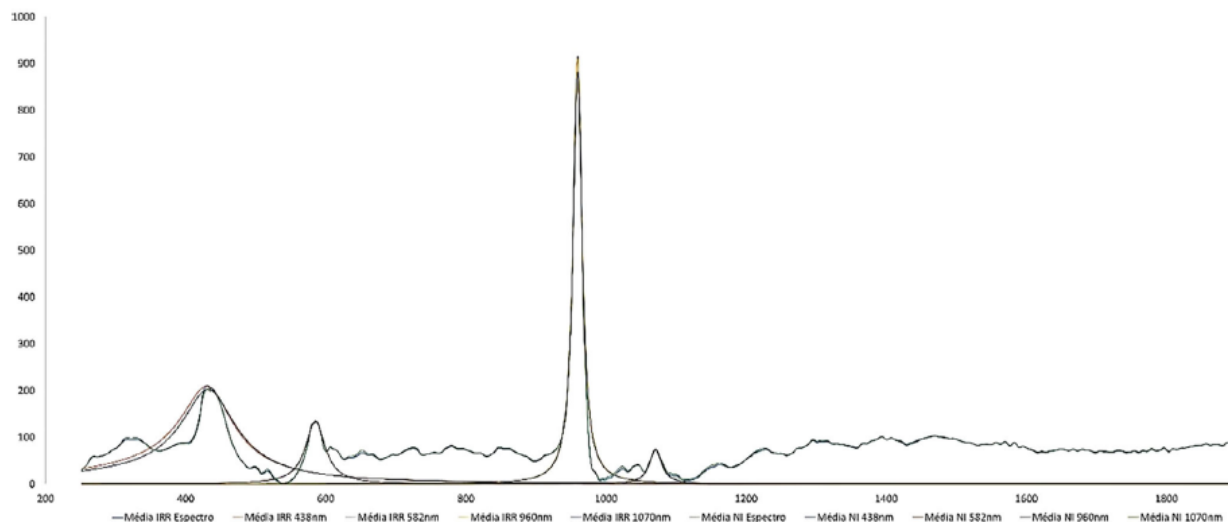


FIGURE 2 Mean values of the spectra and peaks of interest for irradiated and non-irradiated groups [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

4 | DISCUSSION

Enamel ablation by femtosecond lasers has been demonstrated by several authors (Chen et al., 2015; Chen et al., 2016; Le, Bertrand, & Vilar, 2016; Loganathan, Santhanakrishnan, Bathe, & Arunachalam, 2021; Yuan, Zheng, Sun, Wang, & Lyu, 2017). Nevertheless, there is no detailed characterization of femtosecond laser-irradiated surfaces using subablative parameters, since previous studies have demonstrated the ability of high-power lasers with subablative parameters to make dental enamel more acid-resistant (Behroozibakhsh et al., 2018; Chang et al., 2017). The role of laser irradiation in caries prevention has been widely studied with a focus on the increase of caries resistance caused by a decrease in the enamel demineralization rate (Geraldo-Martins et al., 2013; Tavares et al., 2012). Thus, the objective of the present study was to determine the chemical and structural changes in enamel induced by femtosecond laser irradiation using subablative parameters, which could indicate whether this treatment would be a favorable strategy for the prevention of early caries lesions.

Considered increasingly important due to its high biochemical specificity, Raman spectroscopy analysis has been used to characterize the chemical/molecular structure of dental enamel (Wentrup-Byrne, Armstrong, Armstrong, & Collins, 1997). In enamel analyses, the peak located at 960 nm has been attributed to the phosphate Group ν_1 mode, while the peak at 1070 nm has been associated with the ν_1 vibrational mode of the carbonate group (type B carbonate). Studies using hydroxyapatite have suggested that even small levels of change in chemical composition (e.g., substitution by carbonate) can induce changes in the width and position of the peaks present in the Raman spectrum, especially in the case of phosphate ν_1 and ν_3 modes (Penel, Leroy, Rey, & Bres, 1998). Likewise, the carbonate and phosphate peak intensities have exhibited higher values attributed to the

external enamel surface, while lower intensities have been found in the innermost portions of the enamel, indicating a reduction in the degree of crystallinity of the hydroxyapatite (Xu, Reed, Gorski, Wang, & Walker, 2012). Additionally, changes in peak intensities present in the Raman spectrum have been associated with changes in the orientation of enamel crystallites (Tsuda & Arends, 1997). In this study, according to the results obtained by Raman spectroscopy analysis of the femtosecond laser-irradiated enamel it was possible to identify the characteristic dental enamel peaks in all specimens. The spectra of the IRR tissue showed an increase in peak intensity in the 960-nm region, referring to phosphate ν_1 mode, and in the 438-nm region, related to phosphate ν_3 mode, as well as a reduction in peak intensity in the 1,070-nm region, referring to carbonate.

In addition, studies that performed chemical analysis of the enamel IRR with different types of laser by Raman spectroscopy showed a decrease in the carbonate content, and consequently an increase in the acid resistance of the enamel (Elliott, 1973; Ko et al., 2008; Tsuda & Arends, 1997). Considering the chemistry underlying the initial enamel caries lesions, an indicator that explains the preservation of the subsurface area in the caries zone is the low enamel carbonate content, as it is believed that the carbonate has a destabilizing effect (Elliott, 1973). Although it is a precursor of hydroxyapatite, carbonate can cause defects in the crystal, poorly fitting in the crystalline network and generating more acid-soluble apatite (Spizzirri, Cochrane, Prawer, & Reynolds, 2012). Herein, the results of Raman spectroscopy analysis indicated a decrease in the carbonate content on the surface of the femtosecond laser-irradiated enamel when compared to the NI enamel, which consequently may have a role in the reduction of its dissolution, thus preventing enamel caries.

Furthermore, the carbonate:phosphate ratio has been considered an indicator of the enamel susceptibility to acid attack during the

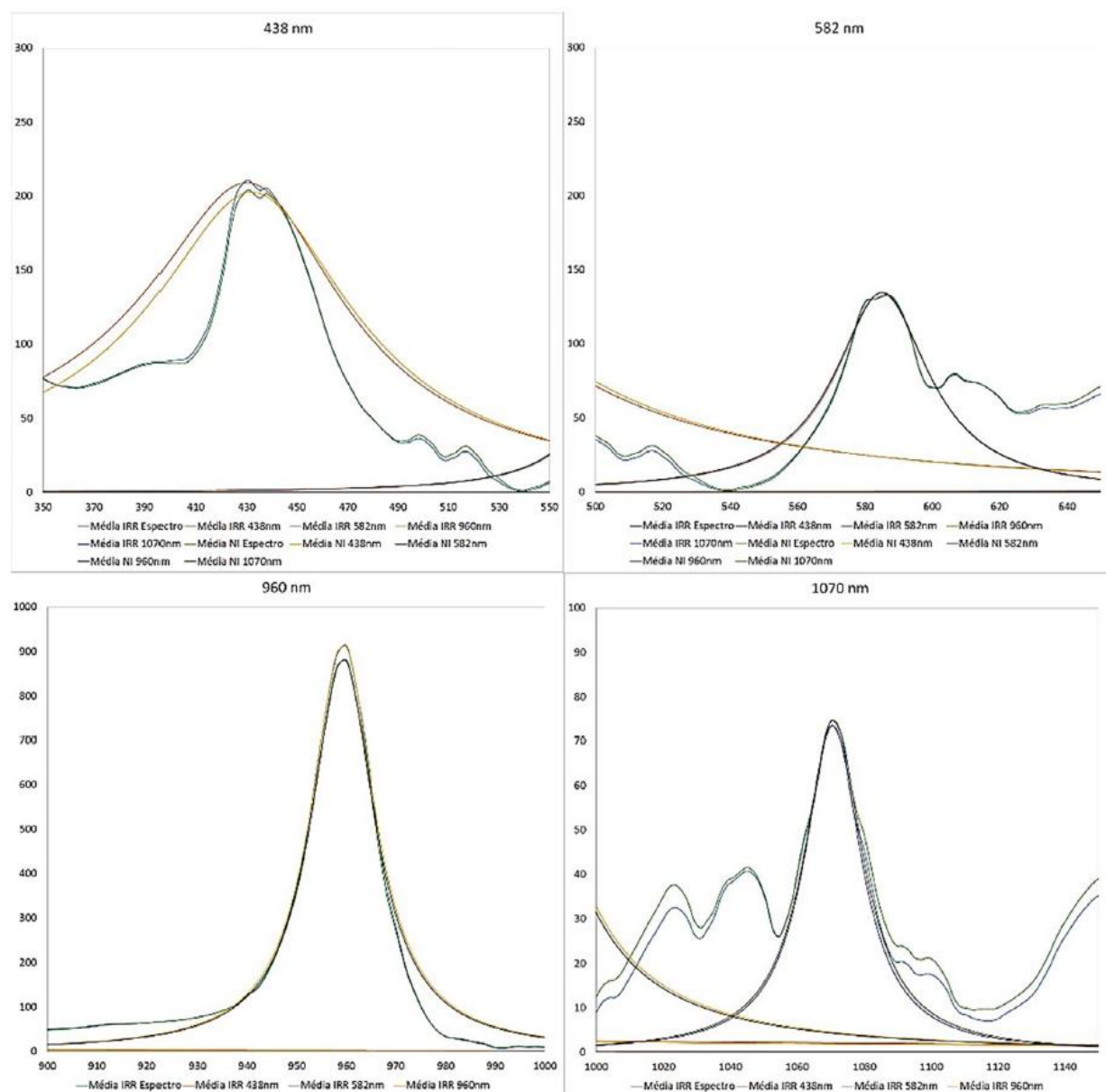


FIGURE 3 Highlight of the peaks of interest shown in Figure 2 [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 2 Average values obtained for the area and intensity of the peaks of interest for irradiated and non-irradiated groups

Peak	438 nm		582 nm		960 nm		1070 nm	
	Irradiated	Non-irradiated	Irradiated	Non-irradiated	Irradiated	Non-irradiated	Irradiated	Non-irradiated
Area	7199944 ^a	6839137	1874794,71	1,905,279	10808357,94 ^a	10379849	1319260,556 ^a	1388109
Intensity	220,3193	211,8616	135,4812	135,1924	918,5372	886,564	73,8593	75,0856

^aIndicates a statistically significant difference between the average areas of the peaks of interest for the irradiated and non-irradiated groups (Student's *t*-test, $p < .05$) (in the horizontal direction).

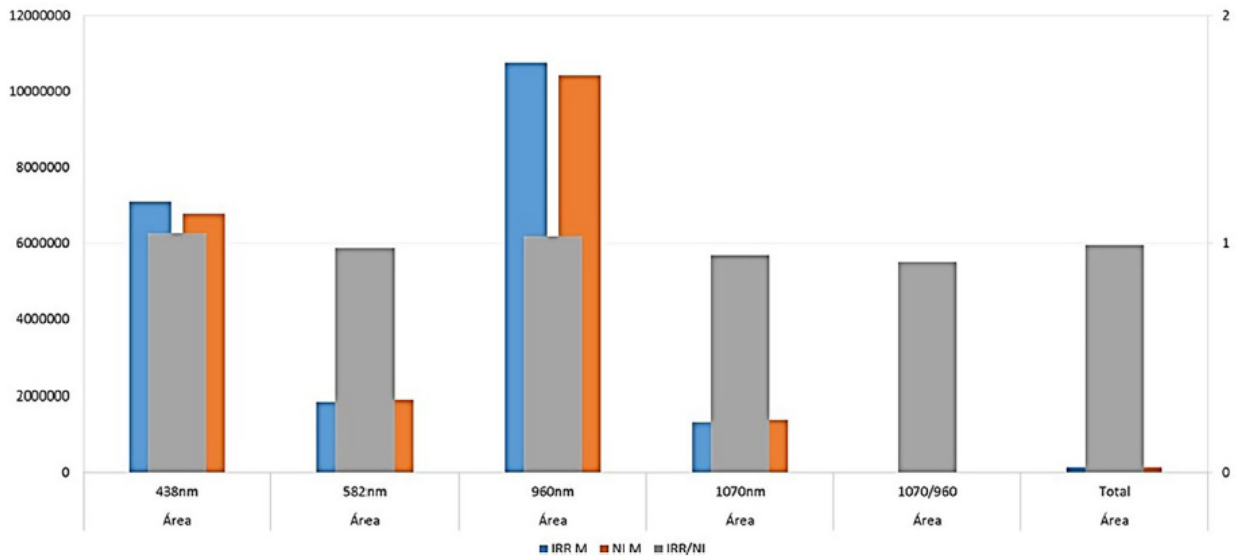


FIGURE 4 Areas of peaks of interest for irradiated (IRR) and non-irradiated (NI) groups and ratio between them (IRR/NI) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

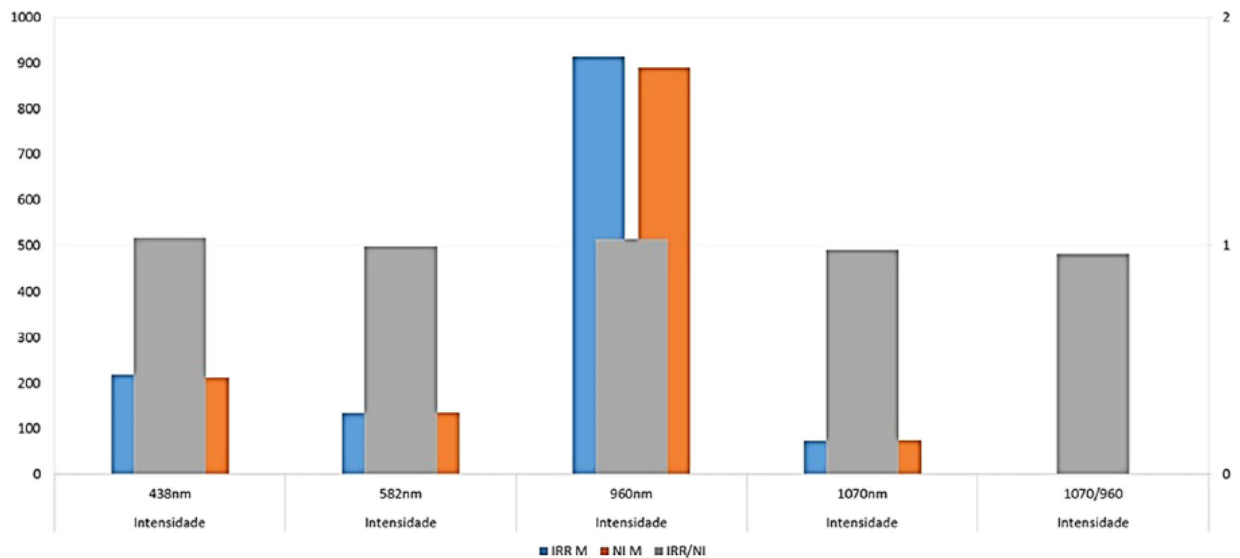


FIGURE 5 Peak intensity for irradiated (IRR) and non-irradiated (NI) groups and ratio between them (IRR/NI) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

caries formation process (Akkus, Karasik, & Roperto, 2017). A decrease in the carbonate:phosphate ratio has been found in the analysis of enamel submitted to demineralization in comparison with healthy enamel (Barrera-Ortega, Vázquez-Olmos, Sato-Berrú, & Araiza-Téllez, 2020).

The analysis of the peak areas of interest revealed a significant increase in the area values for the 438- and 960-nm phosphate peaks of the IRR specimens. The relative intensities of the phosphate peaks have been associated with the crystallinity of the apatite crystal, so that the greater the crystal organization, the greater the

intensity of these peaks. Likewise, a decrease in the intensity of phosphate peaks has been found in initial caries lesions on the enamel surface (Cavalli et al., 2018). The increased values observed in the area of the phosphate peaks referring to the femtosecond laser-irradiated enamel may be an indication of an improvement in the organization of the enamel crystalline phase after irradiation.

To prevent demineralization of dental enamel, laser light must be strongly absorbed and efficiently converted into heat without causing structural damage to the underlying or surrounding tissues, with the advantage of altering the composition or reducing the solubility of

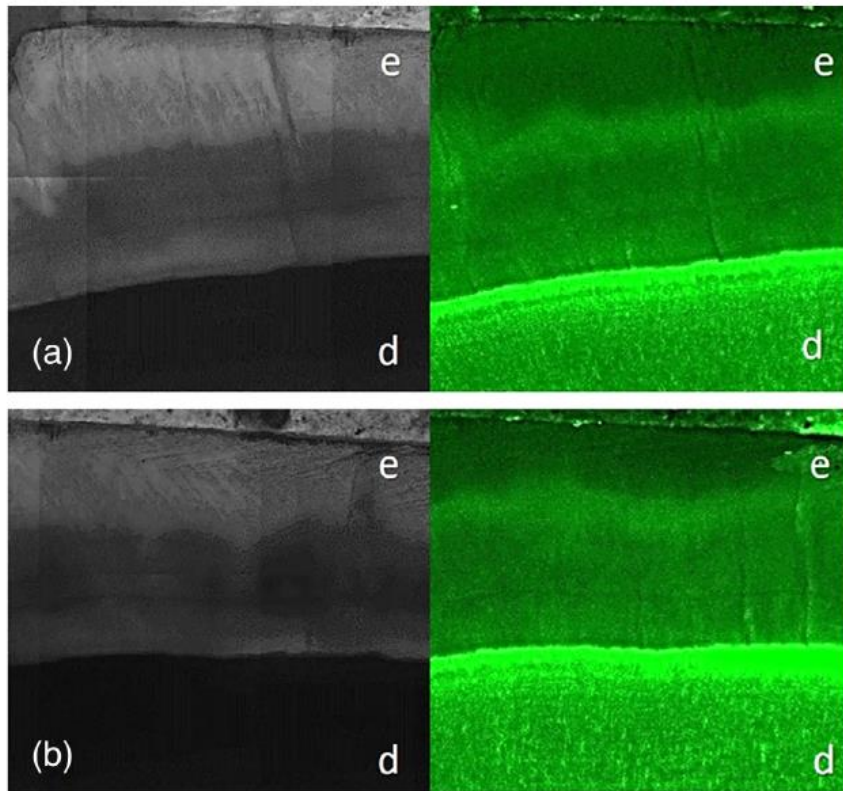


FIGURE 6 Representative images obtained by confocal laser scanning microscopy of longitudinal sections of enamel slabs. (a) Subsurface of femtosecond laser-irradiated enamel. (b) Subsurface of non-irradiated enamel. No differences in the fluorescent signals emitted by the irradiated enamel in comparison with the non-irradiated enamel were observed. e = enamel; d = dentin [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

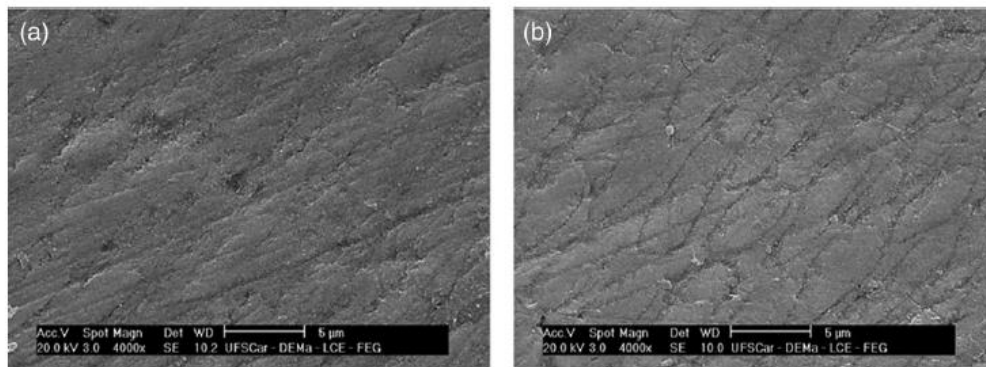


FIGURE 7 Representative SEM micrographs of enamel surfaces at a 4,000 \times magnification. (a) Non-irradiated enamel surface and (b) femtosecond laser-irradiated enamel surface

hard dental tissues (Yuan et al., 2017). The confocal laser scanning microscope is able to identify the fluorescent signal emitted by the dental structure, allowing the visualization of the characteristics of the dental enamel and the variation of the mineral content (Al-Obaidi et al., 2020; Chinelatti et al., 2017; Radlanski et al., 2001). The images obtained by CLSM indicated that there was no change in the subsurface of the femtosecond laser-irradiated enamel, since no differences were identified in the fluorescent signals emitted by the IRR enamel when compared to the NI one.

According to the morphological analysis by SEM performed on the enamel of the IRR and NI specimens, it was observed that

femtosecond laser irradiation did not promote changes in the enamel. The images corresponding to the IRR enamel showed characteristics similar to those of the NI enamel, indicating a predominantly dense and smooth homogeneous morphology surface with no microcracks, areas of fusion, and roughness nor disorganization on the surface of the prisms. These characteristics are compatible with the crystal arrangement of the enamel surface crystalline network and with the increased crystallinity of the tissue. In addition to the absence of surface roughness, these characteristics are responsible for reducing the adhesion of dental biofilm and can be considered a preventive feature. It is known that the presence of cracks, areas of roughness, and

prisms exposed on the enamel surface can act as points of fragility, promoting areas more susceptible to acid attack, thus favoring the deep demineralization of cracks. Besides, these points of fragility are considered favorable places for accumulation of cariogenic bacteria (Rodríguez-Vilchis, Contreras-Bulnes, Olea-Mejía, Sánchez-Flores, & Centeno-Pedraza, 2011).

The present study did not perform any tests to evaluate whether the enamel solubility in acidic medium was compromised. Studies in the literature have reported that the carbonate increase is related to the increased susceptibility to the development of caries lesions and dental erosion (Spizzirri et al., 2012; Xu et al., 2012). Low levels of carbonate have been associated with less solubility and greater resistance to acid attack produced by the caries formation process (Tsuda & Arends, 1997). In this study, we observed changes in the carbonate and phosphate levels between the groups under analysis. Despite this, further studies are necessary to analyze whether changes in the carbonate and phosphate contents presented by this study are sufficient to promote changes in the enamel solubility in acidic medium.

5 | CONCLUSION

The dental enamel irradiation with femtosecond laser using subablative parameters promoted a significant reduction in the carbonate content and the carbonate/phosphate ratio, without altering the structure and morphology of the dental tissue.


ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Professor Dr. Sebastião Pratavieira, from São Carlos Institute of Physics—University of São Paulo, for providing access to the instruments at Confocal Microscopy Laboratory. This work was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant number 2019/21683-5.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Michelle Alexandra Chinelatti  <https://orcid.org/0000-0001-8920-1906>

REFERENCES

- Akkus, A., Karasik, D., & Roperto, R. (2017). Correlation between microhardness and mineral content in healthy human enamel. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9, e569–e573. <https://doi.org/10.4317/jced.53345>
- Al-Obaidi, R., Salehi, H., Collart-Dutilleul, P. Y., Jacquot, B., Tassery, H., Cuisinier, F. J. G., ... Cloitre, T. (2020). Relationship between changes in chemical composition of enamel subsurface lesions and the emitted nonlinear optical signals: An in vitro study. *Caries Research*, 54, 144–153. <https://doi.org/10.1159/000505904>
- Aoba, T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases*, 10, 249–257. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01030.x>
- Barrera-Ortega, C. C., Vázquez-Olmos, A. R., Sato-Berrú, R. Y., & Araiza-Téllez, M. A. (2020). Study of demineralized dental enamel treated with different fluorinated compounds by Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Physics and Engineering*, 10, 635–644. <https://doi.org/10.31661/jbpe.v0i0.2003-1089>
- Behroozibakhsh, M., Shahabi, S., Ghavami-Lahiji, M., Sadeghian, S., & Nazari, N. S. F. (2018). Evaluation of crystalline changes and resistance to demineralization of the surface of human dental enamel treated with Er:YAG laser and fluoride using x-ray diffraction analysis and Vickers microhardness. *Laser Physics*, 28, 065602. <https://doi.org/10.1088/1555-6611/aab2d6>
- Bradshaw, D. J., & Lynch, R. J. (2013). Diet and the microbial aetiology of dental caries: New paradigms. *International Dental Journal*, 63, 64–72. <https://doi.org/10.1111/idj.12082>
- Buzalaf, M. A., Pessan, J. P., Honório, H. M., & ten Cate, J. M. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monographs in Oral Science*, 22, 97–114. <https://doi.org/10.1159/000325151>
- Cavalli, V., Rosa, D. A. D., Silva, D. P. D., Kury, M., Liporoni, P. C. S., Soares, L. E. S., & Martins, A. A. (2018). Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. *Journal of Applied Oral Science*, 26, e20170589. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0589>
- Chang, N. N., Jew, J. M., Simon, J. C., Chen, K. H., Lee, R. C., Fried, W. A., ... Fried, D. (2017). Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4 μm on surface morphology, permeability, and acid resistance. *Lasers in Surgery and Medicine*, 49, 913–927. <https://doi.org/10.1002/lsm.22700>
- Chen, H., Li, H., Sun, Y., Wang, Y., & Lü, P. (2016). Femtosecond laser for cavity preparation in enamel and dentin: Ablation efficiency related factors. *Scientific Reports*, 6, 20950. <https://doi.org/10.1038/srep20950>
- Chen, H., Liu, J., Li, H., Ge, W., Sun, Y., Wang, Y., & Lü, P. (2015). Femtosecond laser ablation of dentin and enamel: Relationship between laser fluence and ablation efficiency. *Journal of Biomedical Optics*, 20, 28004. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.2.028004>
- Chinelatti, M. A., Tirapelli, C., Corona, S. A. M., Jasinevicius, R. G., Peitl, O., Zanotto, E. D., & Pires-de-Souza, F. C. P. (2017). Effect of a bioactive glass ceramic on the control of enamel and dentin erosion lesions. *Brazilian Dental Journal*, 28, 489–497. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201601524>
- Corrêa-Afonso, A. M., Bachmann, L., Almeida, C. G., Corona, S. A., & Borsatto, M. C. (2012). FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. *Archives of Oral Biology*, 57, 1153–1158. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.004>
- Elliott, J. C. (1973). The problems of the composition and structure of the mineral components of the hard tissues. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 93, 313–345. <https://doi.org/10.1097/00003086-197306000-00037>
- Featherstone, J. D., Fontana, M., & Wolff, M. (2018). Novel anticaries and remineralization agents: Future research needs. *Journal of Dental Research*, 97, 125–127. <https://doi.org/10.1177/0022034517746371>
- Fornaini, C., Brulat, N., Milia, G., Rockl, A., & Rocca, J. P. (2014). The use of sub-ablative Er:YAG laser irradiation in prevention of dental caries during orthodontic treatment. *Laser Therapy*, 23, 173–181. <https://doi.org/10.5978/islsm.14-OR-13>
- Geraldo-Martins, V. R., Lepri, C. P., & Palma-Dibb, R. G. (2013). Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers in Medical Science*, 28, 33–39. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1056-9>
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J., & Marcenes, W. (2015). Global burden of untreated caries: A systematic

- review and metaregression. *Journal of Dental Research*, 94, 650–658. <https://doi.org/10.1177/0022034515573272>
- Ko, A. C., Hewko, M., Sowa, M. G., Dong, C. C., Cleghorn, B., & Choo-Smith, L. P. (2008). Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system. *Optics Express*, 16, 6274–6284. <https://doi.org/10.1364/oe.16.006274>
- Le, Q. T., Bertrand, C., & Vilar, R. (2016). Femtosecond laser ablation of enamel. *Journal of Biomedical Optics*, 21, 65005. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.6.065005>
- Loganathan, S., Santhanakrishnan, S., Bathe, R., & Arunachalam, M. (2021). FTIR and Raman as a noninvasive probe for predicting the femtosecond laser ablation profile on heterogeneous human teeth. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 115, 104256. <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2020.104256>
- Paolillo, F. R., Romano, R. A., de Matos, L., Martin, A. A., Guimarães, F. E. G., de Castro Neto, J. C., & Bagnato, V. S. (2019). Short-term and long-term effects of osteoporosis on incisor teeth and femoral bones evaluated by Raman spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 37, 18–27. <https://doi.org/10.1007/s00774-018-0903-6>
- Penel, G., Leroy, G., Rey, C., & Bres, E. (1998). MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcified Tissue International*, 63, 475–481. <https://doi.org/10.1007/s002239900561>
- Petrov, T., Pecheva, E., Walmsley, A. D., & Dimov, S. (2018). Femtosecond laser ablation of dentin and enamel for fast and more precise dental cavity preparation. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 90, 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.070>
- Radlanski, R. J., Renz, H., Willersinn, U., Cordis, C. A., & Duschner, H. (2001). Outline and arrangement of enamel rods in human deciduous and permanent enamel. 3D-reconstructions obtained from CLSM and SEM images based on serial ground sections. *European Journal of Oral Sciences*, 109, 409–414. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2001.00149.x>
- Rodríguez-Vilchis, L. E., Contreras-Bulnes, R., Olea-Mejía, O. F., Sánchez-Flores, I., & Centeno-Pedraza, C. (2011). Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29, 493–500. <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2925>
- Spizzirri, P. G., Cochrane, N. J., Prawer, S., & Reynolds, E. C. (2012). A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy. *Caries Research*, 46, 353–360. <https://doi.org/10.1159/000337398>
- Tavares, J. G., de Eduardo, C. P., Burnett, L. H., Jr., Boff, T. R., & de Freitas, P. M. (2012). Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomedicine and Laser Surgery*, 30, 433–437. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3104>
- Tsuda, H., & Arends, J. (1997). Raman spectroscopy in dental research: A short review of recent studies. *Advances in Dental Research*, 11, 539–547. <https://doi.org/10.1177/08959374970110042301>
- Wentrup-Byrne, E., Armstrong, C. A., Armstrong, R. S., & Collins, B. M. (1997). Fourier transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28, 151–158.
- Xu, C., Reed, R., Gorski, J. P., Wang, Y., & Walker, M. P. (2012). The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *Journal of Materials Science*, 47, 8035–8043. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6693-7>
- Yuan, F., Zheng, J., Sun, Y., Wang, Y., & Lyu, P. (2017). Regulation and measurement of the heat generated by automatic tooth preparation in a confined space. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35, 332–337. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4242>

How to cite this article: Casarin HH, Mattos VS, de Castro Neto JC, Chinelatti MA. Chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel using subablative parameters. *Microsc Res Tech*. 2021;1–10. <https://doi.org/10.1002/jemt.23795>