

Avaliação comparativa da ultraestrutura e propriedades físicas do esmalte bovino, bubalino e humano¹

Bárbara C.L. Nogueira², Piero M. Fernandes², Augusto C.J. Paiva², Nathália C.F. Fagundes², Francisco B. Teixeira² e Rafael R. Lima^{2*}

ABSTRACT.- Nogueira B.C.L., Fernandes P.M., Paiva A.C.J., Fagundes N.C.F., Teixeira F.B. & Lima R.R. 2014. [**Benchmarking of the ultrastructure and physical properties of bovine, buffalo and human enamel.**] Avaliação comparativa da ultraestrutura e propriedades físicas do esmalte bovino, bubalino e humano. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(5):485-490. Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Correa 1, Belém, PA 66075-900, Brazil. E-mail: rafalima@ufpa.br

This study aimed to compare the morphology and physical properties of the enamel structure of bovine, buffalo and human teeth. Analysis of this tissue was performed by scanning electron microscopy, mineral composition, microhardness and surface roughness of enamel in 41 buffalo incisors (*Bos taurus indicus*), 41 bovine incisors (*Pelorovis antiquus*), and 30 human permanent incisors. The results showed a significant similarity between the ultrastructure of enamel in these animal species and the one found in human samples. The chemical elements which presented higher concentration in bovine and buffalo enamel were: O, Ca and P, precisely those that form hydroxyapatite crystals - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Knoop microhardness values showed no statistically significant differences between the three species. However, the surface roughness of buffalo enamel ($2.16\mu\text{m} \pm 0.23$) was significantly higher when compared with human ($0.36\mu\text{m} \pm 0.05$) and bovine teeth ($0.41\mu\text{m} \pm 0.07$). It is concluded that the characteristics and properties of bovine and buffalo enamel, as obtained from our analysis and testing, showed a similar morphology to that of humans. They showed a similar ultrastructural architecture, microhardness and mineral composition equivalent to the human dental tissue, becoming reference models for research.

INDEX TERMS: Tooth enamel, buffalo, bovine, human.

RESUMO.- Este estudo teve como finalidade comparar a morfologia e propriedades físicas da estrutura do esmalte dos dentes bovinos, bubalinos e humanos. A análise deste tecido foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura, composição mineral, microdureza e rugosidade superficial do esmalte em 41 incisivos bubalinos (*Bos taurus indicus*), 41 incisivos bovinos (*Pelorovis antiquus*) e 30 incisivos permanentes de humanos. Os resultados mostraram que a ultraestrutura do esmalte revela uma significativa similaridade das espécies estudadas com a encontrada em amostras humanas. No esmalte bovino e bubalino os elementos químicos que apresentaram maior concentra-

ção foram: O, Ca e P, justamente os que formam os cristais de hidroxiapatita - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Na microdureza Knoop não houve diferença estatisticamente significativa entre as três espécies. Porém, a rugosidade superficial do esmalte bubalino ($2,16\mu\text{m} \pm 0,23$) foi significativamente maior quando comparada aos dentes humano ($0,36\mu\text{m} \pm 0,05$) e bovino ($0,41\mu\text{m} \pm 0,07$). Conclui-se que as características e propriedades do esmalte bovino e bubalino, por meio de análises e testes, apresentou uma morfologia semelhante à de humanos, arquitetura ultraestrutural similar, microdureza e composição mineral equivalente ao tecido dental humano, tornando-se modelos de referência para pesquisas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Esmalte dentário, búfalo, bovino, humano.

¹ Recebido em 3 de janeiro de 2014.

Aceito para publicação em 9 de abril de 2014.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Correa 1, Campus Básico, Guamá, Belém, PA 66075-110, Brasil. *Autor para correspondência: rafalima@ufpa.br

INTRODUÇÃO

Dentes de animais são utilizados em vários estudos in vitro atualmente. O dente bovino é a opção mais frequente es-

colhida pela maioria dos pesquisadores, uma vez que são facilmente obtidos e cada vez mais indicados pelos comitês de ética (Seixas et al. 2007, Matos et al. 2008, Tanaka et al. 2008). O Brasil possui o maior rebanho de búfalos das Américas, com a criação em grande escala direcionada para a produção de carne, restando uma alta disponibilidade de material biológico para outros fins, como os estudos científicos (Santana et al. 2011). Os incisivos são os mais utilizados, devido ser encontrados hígidos em um número alto e possuir uma superfície ampla, geralmente livre de defeitos e lesões de cárie quando comparado com outros dentes (Melberg et al. 1992, Skene 2002, Yassen et al. 2011).

O esmalte dentário de diversos mamíferos possuem similitudes entre si, contudo as especificidades da ultraestrutura do esmalte e sua composição mineral variam entre as espécies e as classes (Fincham et al. 1996, Maas & Dumont, 1999). O esmalte dental é composto por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com oligoelementos incorporados que podem fornecer informações sobre o ambiente e hábitos dietéticos do animal, sendo o mesmo um bioindicador de grande interesse, pois contém informações sobre os elementos depositados neste tecido (Calonius et al. 1965, Naujoks, 1967, Falla-Sotelo et al. 2005).

As semelhanças e diferenças não se limitam às características morfológicas, pois cada espécie apresenta uma dureza e rugosidade superficial próprias. A dureza superficial constitui a resistência que os materiais ou diferentes substratos apresentam. Essa medida pode ser realizada através de três ensaios diferentes: choque, risco ou penetração. O ensaio mais utilizado é o de penetração e consiste na aplicação de uma determinada carga por um aparelho que apresenta um penetrador na sua extremidade em forma de pirâmide ou esfera, o qual penetrará e marcará a superfície do substrato e, em seguida, a mensuração feita pelo penetrador é convertida para índice de dureza (Remizov et al. 1991).

A rugosidade, por sua vez, é o conjunto de desvios microgeométricos, caracterizados pelas saliências e reentrâncias. A leitura da rugosidade é realizada por um apalpador que percorre a superfície, acompanhado de um patim, onde o movimento da agulha é transformado em impulsos elétricos e registrado no mostrador. Esse parâmetro revela informações importantes sobre a idade do animal e deficiência mineral, refletindo na rugosidade superficial do esmalte dental (Santos et al. 2008, Sabatoski et al. 2010).

Neste estudo buscou-se descrever a ultraestrutura do esmalte dental de bubalinos e bovinos por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), determinar a concentração dos elementos presentes neste tecido, além de estabelecer e comparar os valores da microdureza e da rugosidade entre os grupos de animais avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará e pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob parecer nº CEPAE - BIO 013-09.

Foram utilizados 41 incisivos bovinos da espécie *Bos taurus indicus*; 41 incisivos bubalinos da espécie *Pelorovis antiquus*. Os

espécimes foram coletados de animais (com idade média de 24 meses) que foram abatidos na Cooperativa da Indústria Agropecuária do Pará - SOCIPE, situada em Belém, Pará, Brasil.

Utilizou-se 30 incisivos permanentes humanos (extraídos por indicação protética ou por comprometimento periodontal). Os dentes pertenciam a pacientes jovens, possuíam a superfície do esmalte livre de lesões cariosas e o ápice fechado.

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para análise com microscopia eletrônica de varredura foram utilizados 6 incisivos de boi e 6 incisivos de búfalo. O terço médio da coroa dos dentes foi seccionado transversalmente e longitudinalmente com disco de carborundum montando em peça de mão reta (Dabiatlante®, Ribeirão Preto, Brasil) e sob irrigação, formando blocos com dimensões de 5mm x 5mm.

As amostras foram lixadas sob irrigação com folhas de lixa d'água (3M, Sumaré, Brasil) de granulação #2000 e #2500 e polidas com disco de feltro montado em peça de mão reta e pasta para polimento (DiamondR; FGM, Joinville, Brasil). Parte das amostras tiveram a face vestibular lixada até o esmalte atingir a espessura de 1mm. Nas amostras restantes, foi lixada a face em que se podia observar, sequencialmente, esmalte vestibular, dentina vestibular, espaço que acomodava a polpa, dentina lingual e esmalte lingual.

Posteriormente, todas foram lavadas com água destilada em banheira ultrassônica (TD30 Plus; Bio-Art, São Carlos, Brasil) por 1 minuto. Após secarem, foram imersas em hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e novamente lavadas na banheira ultrassônica com água destilada por 30 segundos. Foram imersas em uma solução de EDTA a 17% por 10s e mais uma vez lavadas em banheira ultrassônica por 1 minuto.

Cada espécime foi imerso, por 5 minutos, em bateria ascendente de álcool (70%, 90% e álcool absoluto), secando posteriormente à temperatura ambiente. As amostras foram montadas, metalizadas e observadas em um microscópio eletrônico de varredura (LEO-1430; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). As micrografias foram feitas em várias regiões do esmalte e em diferentes ampliações (Santana et al. 2013).

Composição mineral. A microanálise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS, do inglês *Energy-Disperse X-Ray Spectroscopy*) foi feita por meio do microscópio eletrônico de varredura (LEO-1430; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Utilizou-se 5 dentes de boi e 5 dentes de búfalo.

Os dentes foram lavados em banheira ultrassônica por 2 minutos e secos à temperatura ambiente. Foram retirados pequenos fragmentos do esmalte de cada um dos espécimes. A avaliação da composição mineral foi feita em dois pontos de cada amostra, sendo realizada ao final a média e o desvio-padrão dos minerais registrados.

Avaliação da microdureza superficial do esmalte. Utilizaram-se 20 corpos de prova para cada grupo. Os dentes foram seccionados no terço médio da coroa, obtendo-se amostras com dimensões de 10mmx4mm e incluídas em resina (Endurecedor RQ-0164RF PLUS e Resina RQ-0100RF; Zona Sul de São Paulo, São Paulo, Brasil).

As amostras foram lixadas (#600, #800 e #1200) em uma politriz (Arpol E; Arotec, Rio de Janeiro, Brasil), com 500 rotações por minuto. A lixa d'água de grana 600 (3M, Sumaré, Brasil) foi utilizada até o momento em que já se podia notar a exposição de uma área suficiente no esmalte para serem realizadas as endentações. As lixas de grana 800 e 1200 (3M, Sumaré, Brasil) foram utilizadas por 1 minuto cada uma e, em seguida, os corpos de prova foram lavados em banheira ultrassônica com água destilada por 1 minuto.

A microdureza Knoop (KHN) foi determinada por um microdurômetro (Future Tech FM 700, Tokyo, Japão) onde foram realizadas 5 endentações por espécime, espaçadas por 5µm, com uma

carga de 100g e durante 15 segundos. As endentações foram realizadas paralelas à direção dos prismas do esmalte (Fonseca et al. 2008).

Avaliação da rugosidade. A avaliação da rugosidade foi realizada por um rugosímetro (S)-301; Mitutoyo, Califórnia, Estados Unidos da América).

O parâmetro adotado para a consecução da rugosidade superficial foi a rugosidade aritmética (Ra) determinado pela média (μm) de 3 leituras, com um limite de tracejamento (Lt) de 5mm e com comprimento de amostragem ou "cutt-off" (La) de 0,25mm.

Foram utilizados 10 incisivos de cada grupo – bovino, búfalo e humano. O apalpador foi posicionado no terço médio da face vestibular de cada dente e realizou a sua movimentação no sentido méso-distal. Todas as etapas metodológicas estão descritas na Figura 1.

Análise qualitativa e quantitativa. As fotomicrografias foram avaliadas qualitativamente. A composição mineral foi tabulada e calculada as médias \pm desvios-padrão para os dentes bovinos e bubalinos. Para a análise da microdureza e da rugosidade foi realizada a comparação entre diferentes grupos por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para, com $p < 0,05$, com os valores representados textualmente e graficamente com médias \pm erro-padrão. Em todas as análises, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.01.

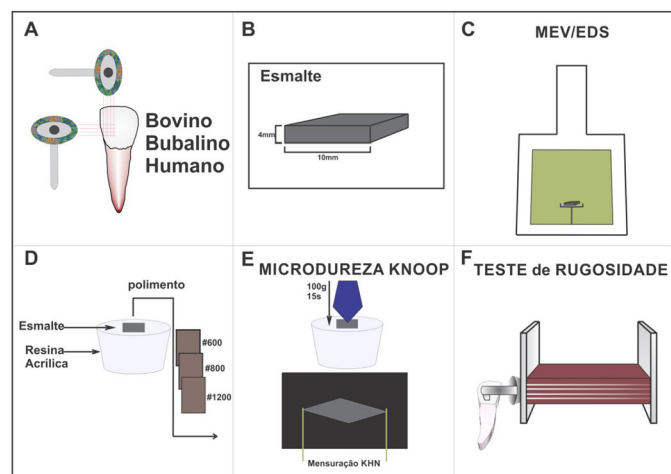


Fig.1. (A-F) Fluxograma da metodologia.

RESULTADOS

MEV

A arquitetura ultraestrutural nas amostras dos espécimes animais estudados revela significativa similaridade com a encontrada em amostras humanas, quando analisadas sob microscopia eletrônica de varredura.

Avaliando a estrutura de superfície, os prismas apresentam uma variabilidade morfológica – hexagonal, circular, ovalada e retangular – nas amostras de dentes bovinos (Fig.2A) e bubalinos (Fig.2B), não havendo, aparentemente, a predominância de um formato em relação ao outro, além de serem rodeados por esmalte interprismático.

Em cortes longitudinais, os prismas tomam as mais diversas orientações de maneira gradual. Eles se distribuem paralelos entre si e perpendicular com o esmalte interprismático, tal característica foi encontrada de maneira muito similar nos dois espécimes animais (Fig.2C,D). Sob uma

magnificação menor, os prismas cruzam-se, tomando diferentes direções (Fig.2E,F).

EDS

Os valores médios dos elementos químicos presentes no esmalte bovino, bubalinos e humanos encontram-se no Quadro 1.

Os elementos que apresentam maior concentração no esmalte bovino e bubalino são: O, Ca e P. Justamente os que formam os cristais de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Quadro 1. Média e Desvio padrão dos elementos químicos relevados no esmalte bovino, bubalino e humano

Elemento Químico	Esmalte Bovino (M% \pm DP%)	Esmalte Bubalino (M% \pm DP%)
O	41,93 \pm 0,29	37,58 \pm 2,07
Mg	0,22 \pm 0,01	0,92 \pm 0,02
P	17,23 \pm 0,16	19,17 \pm 0,33
Cl	0,27 \pm 0,07	0,31 \pm 0,04
K	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,03
Ca	33,68 \pm 0,18	35,10 \pm 1,26
Ti	0,08 \pm 0,02	0,10 \pm 0,0005
V	0,14 \pm 0,04	0,13 \pm 0,05
Fe	0,16 \pm 0,06	0,20 \pm 0,01
Cu	0,18 \pm 0,01	0,21 \pm 0,05
Zn	0,16 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03
Sr	0,15 \pm 0,04	0,19 \pm 0,06
Zr	5,75 \pm 0,57	5,67 \pm 0,39

Microdureza

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,5083$) na microdureza Knoop do esmalte bovino ($302,6\text{kg}/\text{mm}^2 \pm 6,89$) e bubalino ($300,5\text{kg}/\text{mm}^2 \pm 2,72$) e humano ($309,7\text{kg}/\text{mm}^2 \pm 6,83$). A relação entre os grupos encontra-se expressa na Figura 3A.

Rugosidade

A rugosidade superficial do esmalte bubalino ($2,16\mu\text{m} \pm 0,23$) foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparada aos dentes humano ($0,36\mu\text{m} \pm 0,05$) e bovino ($0,41\mu\text{m} \pm 0,07$), não havendo diferença estatística entre os resultados do esmalte bovino e humano. A relação entre os grupos é apresentada na Figura 3B.

DISCUSSÃO

Os resultados apontam similaridade entre as propriedades observadas nos espécimes de dentes humanos, bubalinos e bovinos, com exceção da rugosidade, na qual se observou diferença entre o grupo de amostras bubalinas e demais animais, apresentando valores médios superiores aos grupos restantes. A ultraestrutura, composição mineral e microdureza demonstraram semelhança entre os grupos de dentes dos animais estudados.

O esmalte dental é um tecido altamente mineralizado constituído por cristais de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - e por estruturas básicas (esmalte prismático, interprismático e aprismático) que assumem uma arquitetura capaz de conferir resistência ao dente durante a mastigação. Os prismas são estruturas em formas de bastões que se orientam ao longo de toda a espessura do esmalte e são rodeados pelo esmalte interprismático. O esmalte aprismático

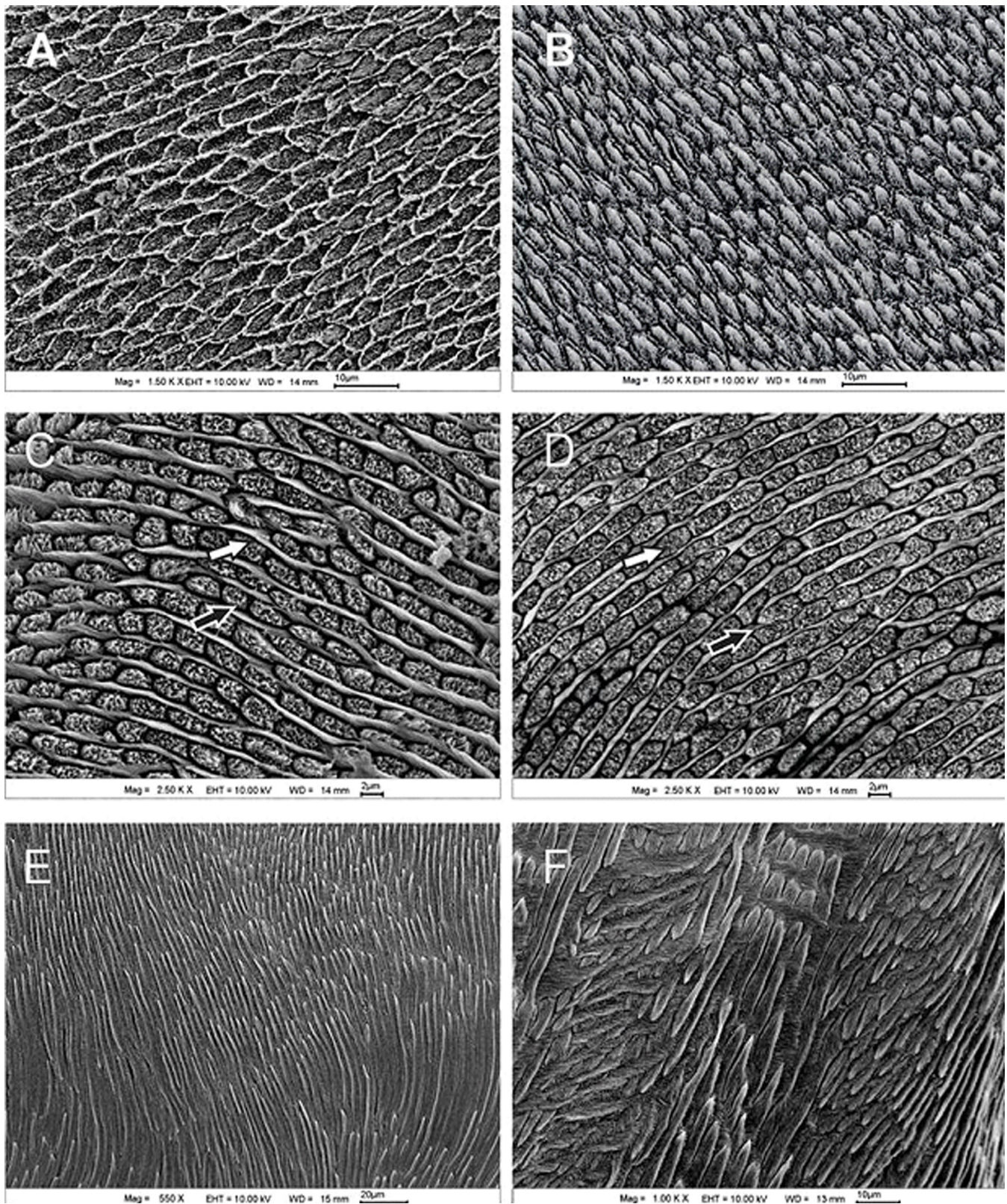


Fig.2. (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando os diferentes formatos dos prismas do esmalte de dentes bovinos e (B) bubalinos. 1500x. Barra: 10 micrômetros. (C,D) Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos espécimes. Os prismas do esmalte (setas brancas) encontram-se paralelos entre si e em 90 graus com o esmalte interprismático (setas pretas), essa arquitetura foi encontrada nas amostras de dentes bovinos (C) e bubalinos (D). 2500x. Barra: 2 micrômetros. (E,F) Microscopia eletrônica de varredura mostrando as diferentes direções realizadas pelos prismas do esmalte em diferentes magnificações no esmalte bovino e no esmalte bubalino (E). Zone mag: 550x. Barra de escala: 20 micrômetros (F). 1000x. Barra: 10 micrômetros. Essa disposição dos prismas confere ao esmalte dental maior resistência.

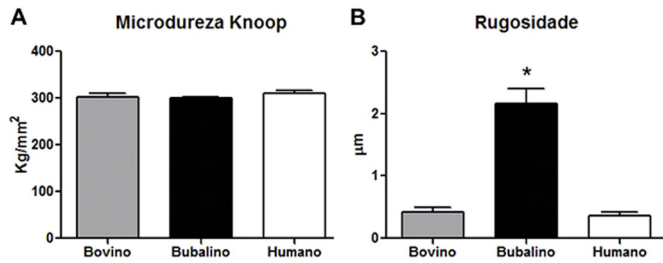


Fig. 3. (A) Valores médios e erro-padrão da microdureza (kg/mm²) e (B) rugosidade (µm) para os diferentes grupos. * Indica diferença estatística em relação aos demais grupos.

localiza-se contíguo à junção amelo-dentinária e na superfície de tal tecido (Santana et al. 2011).

Em espécimes bovinos, a análise da arquitetura ultraestrutural, feita por meio de MEV, já havia sido descrita anteriormente (Anderson et al. 1998, Camargo et al. 2008, Wang et al. 2012). Com resultados semelhantes aos apresentados, Wang et al. (2012) destacou a presença de uma disposição paralela entre os prismas de esmalte em cortes longitudinais e disposição perpendicular com o esmalte interprismático foram observados a partir de cortes transversais nestes espécimes, onde esse mesmo padrão foi observado em amostras do esmalte de bovinos e bubalinos.

A disposição paralela entre os prismas do esmalte de búfalos e bovinos proporciona uma eficiente vantagem para o corte de alimentos duros ou difíceis, como plantas ou raízes (Macho et al. 1993). Tal disposição dos prismas permite com que a borda incisal dos dentes torne-se afiada, uma vez que são menos resistentes à abrasão.

A mudança gradual na orientação dos prismas percebida nas micrografias faz com que o esmalte de bovinos e bubalinos seja mais propenso à fratura. Isto ocorreria provavelmente devido a menor dissipação da energia entre os prismas, formando fendas ao longo da trajetória do prisma (Wang et al. 2012). Além de serem mais frágeis e mais permeáveis, refletindo em um desgaste excessivo que pode levar a redução no consumo e no trituramento do alimento (Santos et al. 2008).

A maior concentração dos elementos Ca, P e O em ambos os animais, verificados por meio da análise de EDS, destaca conformidade aos principais componentes do esmalte humano, os cristais de hidroxiapatita. Neste contexto, Falla-Sotelo et al. (2005) e Oliveira et al. (2010) apontam achados próximos entre a concentração de Ca e P presentes em bovinos, suínos e dentes humanos, o que confere essa caracterização nestes mamíferos. As características físico-químicas e estruturais, bem como seu padrão de mineralização, figuram como características primárias para comparação entre animais. Entretanto, no caso do esmalte humano, frente aos numerosos "crossing of enamel rods", apontam a necessidade de comparações criteriosas (Fejerskov et al. 1979, Warshawsky et al. 1981, Lopes et al. 2006).

A maior robustez observada em espécimes bubalinos associada à composição química destes espécimes aponta que este tecido apresenta grau de mineralização diferente dos espécimes bovinos. A microdureza de dentes bovinos já foi descrita em várias ocasiões anteriores (Lopes et al. 2006), entretanto são novos os dados referentes ao esmal-

te bubalino e sua comparação com o esmalte bovino e humano.

No que se refere à dureza do esmalte humano, Meredith et al. (1996) apontou valores variando de 272 a 440 KHN e Maia et al. (2008) relatou valores entre 342 a 348 KNH. Fonseca et al. (2008) e Donassolo et al. (2007) apontam que dentes bovinos mais jovens podem apresentar menor grau de semelhança, quando comparados a espécimes humanos. Os resultados desta pesquisa verificou valores semelhantes para todas as espécies estudadas.

Além da rugosidade primária dos espécimes, a realização do teste também permitiu a verificação do perfil de textura secundária ou ondulação apresentados. O mesmo padrão foi observado entre dentes bovinos e humanos, embora diferenças estatísticas significantes tenham sido encontradas quando ambos os animais foram comparados aos espécimes bubalinos.

Com relação à rugosidade, Donassolo et al. (2007), Braly et al. (2007), e Xavier (2008) já haviam descrito a similaridade do esmalte bovino, quando comparado a espécimes humanos. Todavia, no que se refere ao padrão de rugosidade do esmalte dentário bubalino, constata-se escassez de dados bibliográficos para comparações, embora o padrão ultraestrutural deste animal já tenha sido relatado anteriormente (Santana et al. 2013), apontando semelhanças com o esmalte dentário humano e suíno (Lopes et al. 2006).

Os resultados da pesquisa mostram-se consonantes com os da literatura no que tange a comparações feitas entre o esmalte bovino e humano. Observou-se também que a rugosidade do esmalte bubalino não apresentou semelhança quando comparado ao bovino e humano, não havendo outras pesquisas na literatura científica que sirvam de subsídio para comparação.

CONCLUSÕES

Este estudo avaliou de modo minucioso as características morfológicas e propriedades físicas do esmalte bovino e bubalino, inserindo dados importantes destas espécies para o embasamento de futuras pesquisas científicas.

Observou-se que a arquitetura ultraestrutural do esmalte bovino e bubalino possui similaridades com a do esmalte humano, no que concerne a observações realizadas na porção média e superficial do esmalte. Sendo necessários novos estudos que busquem investigar a presença de esmalte aprismático na primeira e na última camada de tal tecido.

As concentrações dos elementos Ca, P e O foram próximas. Não foram observadas diferenças estatísticas das amostras nos testes de microdureza e rugosidade, à exceção da rugosidade do esmalte bubalino que apresentou um valor superior em relação aos demais grupos.

REFERÊNCIAS

- Anderson P, Levinkind M. & Elliott J.C. 1998. Scanning microradiographic studies of rates of in vitro demineralization in human and bovine dental enamel. Arch. Oral Biol. 43:649-656.
- Braly A., Darnell L.A., Mann A.B., Teaford M.F. & Weihs T.P. 2007. The effect of prism orientation of the indentation testing of human molar enamel. Arch. Oral Biol. 52:856-860.

- Calonius P.E.B. & Visapaa A. 1965. The inorganic constituents of human teeth and bone examined by x-ray emission spectrography. *Arch. Oral Biol.* 10:9-13.
- Camargo M.A., Marques M.M. & Cara A.A. 2008. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Arch. Oral Biol.* 53:105-108.
- Donassolo T.A., Romano A.R., Demarco F.F. & Della-Bona A. 2007. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). *Revta Odonto Ciênc.* 22:311-316.
- Falla-Sotelo F.O., Rizzutto M.A., Tabacniks M.H., Added N. & Barbosa M.D.L. 2005. Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. *Braz. J. Physiol.* 35:761-762.
- Fejerskov O. 1979. Human dentition and experimental animals. *J. Dent. Res.* 58:725-731.
- Fincham A.G., Moradian-Oldak J. & Simmer J.P. 1999. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.* 126:270-299.
- Fonseca R.B., Haiter-Neto F., Carlo H.L., Soares C.J., Sinhoreti M.A.C., Puppin-Rontani R.M. & Correr-Sobrinho L. 2008. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch. Oral Biol.* 53:1023-1029.
- Lopes F.M., Markarian R.A., Sendyk C.L., Duarte C.P. & Arana-Chavez V.E. 2006. Swine teeth as potential substitutes for in vitro studies in tooth Adhesion: a SEM observation. *Arch. Oral Biol.* 51:548-551.
- Macho G.A. & Berner M.E. 1993. Enamel thickness of human maxillary molars reconsidered. *Am. J. Physiol. Anthropol.* 92:189-200.
- Maia E., Baratieri L.N., Andrada M.A.C., Monteiro Junior S. & Vieira L.C. 2008. The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in situ study. *J. Dent.* 36:2-7.
- Maas M.C. & Dumont E.R. 1999. Built to last: the structure, function, and evolution of primate dental enamel. *Evol. Anthro.* 8:132-152.
- Matos I.C., Sab T.B.B., Juliboni N.C., Guerra R.F. & Miranda M.S. 2008. Utilização de dentes bovinos como possível substituto aos dentes humanos nos testes in vitro: revisão de literatura. *UFES, Rev. Odontol.* 10:58-63.
- Melberg J.R. 1992. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J. Dent. Res.* 71:913-919.
- Meredith N., Sherriff M., Setchell D.J. & Swanson S.A.V. 1996. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch. Oral Biol.* 41:539-545.
- Naujoks R. 1967. Chemical composition of different areas of the enamel of deciduous and permanent teeth. *Caries Res.* 1:137-143.
- Oliveira M.A.H.M., Torres C.P., Gomes-Silva J.M., Chinelatti M.A., Menezes F.C.H., Palma-Dibb R.G. & Borsatto M.C. 2010. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc. Res. Tech.* 73:572-577.
- Remizov S.M., Prujansky L.Y. & Matveevsky R.M. 1991. Wear resistance and microhardness of human teeth. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 205:201-202.
- Sabatowski M.A., Maruo I.T., Camargo E.S., Guariza Filho O., Tanaka O.M. & Maruo H. 2010. Influence of natural bovine enamel roughness on bond strength after etching. *Angle Orthod.* 80:562-569.
- Santana L.N.S., Barbosa L.V.M., Teixeira F.B., Costa A.M.P., Fernandes L.M.P. & Lima R.R. 2013. Morphology of the dentin structure of sloths *Bradypus tridactylus*: a light and scanning electron microscopy investigation. *Anat. Histol. Embryol.* 46:410-414.
- Santana L.N.S., Luz M.S., Carneiro N.C.M., Dias A.M., Guerra M.C.S. & Lima R.R. 2011. Ultrastructure of buffalo tooth enamel: a possible replacement for human teeth in laboratory research. *Braz. J. Oral Sci.* 10:163-166.
- Santos F.C.F., Sousa A.L., Machado Junior A.A.N., Lima F.C. & Ribeiro F. 2008. Análise morfológica dos dentes incisivos em búfalos e sua relação com a idade de abate. *Ciênc. Anim. Bras.* 9:506-511.
- Seixas V.N.C., Cardoso E.C., Araújo C.V., Pereira W.L.A. & Viana R.B. 2007. Determinação da cronologia dentária de machos bubalinos (*Bubalus bubalis*) criados no estado do Pará. *Ciênc. Animal Bras.* 8:529-35.
- Skene L. 2002. Ownership of human tissue and the law. *Natl Rev. Genet.* 3:145-148.
- Tanaka J.L.O., Medice Filho E., Salgado J.A.P., Salgado M.A.C., Moraes L.C., Moraes M.E.L. & Castilho J.C.M. 2008. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz. Oral Res.* 22:346-351.
- Wang C., Li Y., Wang X., Zhang L., Tiantang & Fu B. 2012. The enamel microstructures of bovine mandibular incisors. *Anat. Rec.* 295:1698-1706.
- Warshawsky H., Josephsen K., Thylstrup A. & Fejerskov O. 1981. The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man. *Anat. Rec.* 200:371-399.
- Xavier R.C.A.P., Miranda R.M.P., Gonzaga C.C. & Lopes M.G.K. 2009. Avaliação da rugosidade do esmalte de dentes bovinos clareados com e sem a ativação por laser. *Revta Sul-Bras. Odontol.* 6:29-33.
- Yassen G.H., Platt J.A. & Hara A.T. 2011. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J. Oral Sci.* 53:273-282.