

MÉTODOS DE ESTUDO DOS TECIDOS CALCIFICADOS. SUAS LIMITAÇÕES *

Hardy Ebling
Catedrático de Histologia

SINOPSE

O trabalho é a reprodução da aula inaugural do curso de Odontologia, pronunciada no dia 2 de março de 1963. O autor faz uma análise dos métodos empregados para o estudo de tecidos calcificados e suas limitações.

Inicia com as observações sobre ossos de animais alimentados com rúbia, terminando com microscopia eletrônica.

Conclui mostrando que a palestra foi uma exposição cronológica de fatos, cada um trazendo uma contribuição, que por ser limitada e incapaz de resolver todos os problemas, impõe sempre novas contribuições. E assim até o infinito, como uma conseqüência de uma característica única do homem: o desejo de aprender, de progredir, de superar, de realizar-se.

A organização dos cursos superiores em Cadeiras, tem como finalidade proporcionar facilidades didáticas, e é também uma conseqüência das limitações dos Professores. Assim, muitas vezes, esta divisão é artificial e para entendermos um fenômeno único temos que, em nosso raciocínio, servir-nos de ensinamentos de várias Cadeiras.

A técnica de investigação do tecido ósseo teve seus fundamentos, antes da descoberta do microscópio em 1590.

Tudo indica ter começado com a publicação do médico Antonius Mizaldus (31) em 1567, de suas observações sobre a coloração vermelha de parte de ossos de animais que se alimentavam com a raiz da planta Rúbia tinctorum. Na realidade Mizaldus estudou e descreveu o que era conhecido dos camponeses que tinham sua atenção despertada pe-

* Methods of reserch into calcifies tissuesand their limitations.

lo mesmo fato, e ainda mais, pela tonalidade avermelhada do leite dêsses animais.

Hales (19), em 1727, fez dois orifícios no osso da perna de uma franga e dois meses depois, verificou que a distância entre os orifícios continuava a mesma, embora o tamanho do osso tivesse aumentado de muito, mostrando que o osso cresce por adição de novo tecido nos seus extremos.

John Belchier, (3), em 1736, administrou a animais, rúbia como alimento, confirmando o trabalho de Mizaldus.

De 1741 a 1743, Louis Duhamel (10), fisiologista e botânico, estudou os ossos de aves alimentadas com a mesma planta, concluindo que o cálcio fixava a substância corante da planta. Duhamel demonstrou que a planta colore aquelas partes do esqueleto que estão em formação ao tempo de sua administração.

Mas foi John Hunter (21), quem verificou, de 1760 a 1770, em sua fazenda experimental que se dão simultaneamente dois fenômenos: absorção e reabsorção de osso.

O transporte dêstes estudos para a Histologia com o advento de microscópios aperfeiçoados, descoberta de corantes derivados de alcatrão e microtomos de bom rendimento, foi feito por Goodsir, (18) em 1845 e Koelliker, (23) em 1852, que verificaram que a formação e destruição do osso era função de duas células: osteoblastos e osteoclastos, respectivamente.

Em 1931, (7) Broadbent introdu-

ziu uma nova técnica que consistia em radiografias seriadas, técnica esta destinada a ter grandes aplicações em Ortodontia. E em 1941 Brodie (6) estudou o crescimento do crâneo humano do terceiro mês ao oitavo ano de vida, por êste mesmo método.

Robinson e Sarnat (36) em 1955, estudaram o desenvolvimento da mandíbula, em leitões, nos quais, previamente, haviam feito 4 orifícios e introduzido amálgama, de modo a ter marcas permanentes. Isto é: aplicaram simultaneamente dois métodos de estudo já conhecidos.

Dirsa Nogueira, (33) desta Faculdade, realizou um estudo, em 1961, fazendo diversas medidas em 100 indivíduos possuidores dos dentes anteriores naturais, tentando contribuir para a solução de um difícil problema em prótese dentária, qual seja a escolha do tipo de dentes artificiais para um desdentado. Sua conclusão terceira:

«Há correlação entre a distância interpupilar tanto com a largura como com o comprimento dos incisivos centrais superiores naturais». Indica claramente como uma experiência pode contribuir para resolver problemas importantes de ordem prática.

Se analisarmos êstes experimentos verificaremos que todos os autores buscaram explicações usando métodos que consistiam em última análise, em observar a forma e medi-la. E que êstes métodos foram paulatinamente se enriquecendo com ensinamentos anteriores.

Darcy Thompson (44) analisou esta evolução muito bem. São dêle estas palavras:

«Começamos por descrever a forma de um objeto com palavras simples da linguagem comum: terminamos por definir na linguagem precisa da matemática; e um método tende a seguir o outro em ordem estritamente científica e continuidade histórica».

DESGASTE

Para observar-se um tecido calcificado ao microscópio é necessário uma série de procedimentos cujo conjunto denomina-se Técnica Histológica. De tóda a técnica um passo é indispensável: reduzir os tecidos a serem examinados a uma secção muito fina. Mas em geral também é necessário colorir esta secção.

Para os tecidos calcificados devemos considerar dois métodos:

Desgaste que consiste em obter secções de tecidos calcificados com pouca espessura serrando ou cortando com discos de carborundum ou diamante e posteriormente reduzindo ainda mais a espessura destas secções, pelo polimento sôbre pedras especiais.

Como a parte calcificada tem um índice de refração muito diferente dos restos de matéria orgânica e do ar que passou a ocupar as cavidades superficiais, podemos mesmo sem colorir, ou após coloração, observar ao microscópio.

Com êste método foi realizado um trabalho de tese (14) e noutra

tese entrou como um dos métodos usados (22), nesta Faculdade.

DESCALCIFICAÇÃO

Neste método é necessário tornar o tecido ósseo apto a ser cortado em fatias de poucos micra. Um dos primeiros passos para conseguir-se isto é a descalcificação.

Em resumo: fazendo agir uma solução de um ácido forte sôbre um tecido ósseo, êste perde seus sais de calcio. Isto é, perde sua dureza, sendo possível cortá-lo ao microtomo, como tecido mole. Este é o método clássico e o mais usado. Em nossa Faculdade êste método tem sido usado para muitos trabalhos de investigação: teses dos professores Luiz Carlos Guimarães (16), Nicolau Fonseca Milano (28), Paulo Louro Filho (26), Aron Kac (22), João Jorge Diniz Barbachan (2), Leopoldo Louro (25), Enno Dagoberto Liedke (24) e Hardy Ebling (12), para citar apenas os trabalhos de tese.

Entretanto pode-se usar com vantagem, em certos casos, ao invés de uma substância ácida, um agente quelante que descalcifica o tecido ósseo numa solução neutra ou mesmo alcalina. Este método foi introduzido por Sreebny e Nikiforouk (42), em 1951, sendo a substância mais usada a tetraacetatoetilenodiamina, conhecida pela sigla EDTA.

O método clássico para o preparo de lâminas para o estudo de tecido ósseo tem inconvenientes, pois o uso de alcoois faz com que se perca a relação exata entre te-

cido duro e mole, por retração do tecido mole. Este inconveniente pode ser evitado usando polietilenglicol que é um meio de inclusão solúvel em água, proposto por Miles e Linder (29), em 1953.

Como a descalcificação do tecido faz com que o índice de refração de células, fibras e coloide torne-se praticamente igual, perde-se a oportunidade de distingui-las, ao microscópio, por diferença de índice de refração, sendo necessário colorir o tecidos. O número de combinações de corantes é grande. Na prática fica restrito a uma dúzia, sendo o mais usado, a hematoxilina-eosina.

CULTURA DE TECIDOS

«Como material experimental, a cultura de tecidos tem muitas vantagens. Em primeiro lugar as alterações no tecido vivo podem ser observadas e fotografadas sob o microscópio». (13)

«Um dos mais importantes usos para o futuro pode ser no campo da pesquisa em hormônios e vitaminas, onde o método pode fornecer informações que não podem ser obtidas de nenhum outro modo». (14)

A cultura de tecidos tem resolvido problemas e dúvidas antigas. Exemplo:

Godhaber (17) observou a participação ativa dos osteoclastos e macrofagos no processo de reabsorção óssea, documentando pela microcinematografia.

A limitação deste método surge

no fato de que o crescimento e o metabolismo celular se dão em meios diferentes do normal. Daí a necessidade de cuidado ao interpretar os resultados obtidos.

HISTOQUÍMICA

As dificuldades na solução de certos problemas uniu histologistas e bioquímicos, nascendo daí a histoquímica.

Os procedimentos na histoquímica permitem, em resumo, o mapeamento da distribuição de vários compostos, estudo de enzimas e problemas metabólicos. Isto é conseguido tratando uma secção de tecido com uma solução contendo um reagente específico para a substância cuja distribuição ou presença se quer estudar.

Em princípio, a presença da substância é demonstrada pelo aparecimento ou mudança de coloração da zona em que exista esta substância.

Como limite para este método, podemos citar a dificuldade de uma localização precisa e falta de especificidade, em alguns casos.

Como exemplos podemos citar os trabalhos de Castro e Sasso (8), Sasso, Paraventi e Mastroianni (37) da Universidade de São Paulo, de Coutinho (9) da Universidade de Recife, com um estudo das fosfatas alcalinas na odontogênese, de Miraglia (30), da Universidade da Bahia, com estudo sobre a histoquímica do dente de sagüi, e Amaral (1), da Universidade do Rio Grande do Sul, com um estudo sô-

bre a distribuição dos fosfolípidios na submandibular.

ESPECTROGRAFIA E FOTOMETRIA

Para estudar a composição química dos tecidos calcificados, existem uma série de métodos, aos quais não faremos referências. Por sua simplicidade, rapidez, possibilidade de documentar e sobretudo extrema sensibilidade, nos detemos em considerações a respeito da espectrografia e fotometria de chama, método este proposto por Jorge Honório Mittelstaedt Brito, professor desta Faculdade, como método de análise quantitativa dos elementos existentes no esmalte e dentina.

Este método repousa em que «a análise espectrográfica qualitativa está baseada no fato de que um elemento determinado, levado a luminescência, emite sempre as mesmas raias, que constituem seu característico; estas raias são específicas do átomo e refletem sua constituição íntima. Para pesquisar espectroscopicamente se um elemento E está presente numa substância S determinada, basta, pois, em princípio, obter o espectro da substância S e examinar se as raias de E ali se encontram». (43)

Sobre o trabalho de tese do professor Brito, (5) quero deter-me na conclusão número cinco:

«O esmalte e dentina apresentam uma composição química qualitativa praticamente igual». Esta conclusão, enunciada em 1958, foi confirmada em 1962, por diversos autores.

DIFRAÇÃO POR RAIO X

Quando se faz passar um feixe de raio-x monocromático através de uma estrutura com arranjo regular de átomos, se produz uma difração relacionada com o tipo e o arranjo espacial de átomos no material em estudo. Esta difração pode ser gravado num filme de modo a comparar.

O aparelho permite que o material a ser estudado seja orientado e sofra rotação perpendicular ao feixe de raio-x.

A difração obtida permite conhecer o arranjo atômico no material.

Este método foi aplicado em 1930 por Mehemel (27) e Naray-Szobo (34) simultânea e independentemente para calcular o arranjo dos átomos constituintes da estrutura da apatita dos minerais.

Em 1958 Posner e colaboradores (35) repetiram este estudo, agora, com cristais de apatita preparada sinteticamente, obtendo a seguinte disposição que se ve projetada no plano basal.

MICRORADIOGRAFIA

E' de rotina a fotografia e a radiografia de peças que devam ser examinadas histologicamente. Isto facilita a observação microscópica de zonas que realmente interessa ao caso.

Mas em 1955 Nixon e Cosslett (32) propuseram o uso de um aparelho de microrradiografia para projeção que encontra aplicação na solução de alguns problemas, pois

projeta a imagem radiográfica aumentada, permitindo ver pormenores impossíveis a olho desarmado. Este método permite localizar ainda melhor o campo a ser estudado.

ISÓTOPOS

Quando se observa uma lâmina, vemos apenas duas dimensões. Com cortes seriados é possível reconstituir a terceira dimensão. Quando se observa material semelhante, em idades diferentes, é possível perceber o desenvolvimento, o que nos daria a quarta dimensão, como por exemplo no estudo de embriões de idades diferentes. Neste caso podemos seguir a formação de determinado osso ou órgão.

Em resumo: procuramos meios de transformar um estudo estático em dinâmico. Desde muito se procurou conhecer as transformações, localizações e destino de substâncias introduzidas no organismo. Recordemos as experiências com rubia tinctorum para marcar o osso formado durante sua administração.

Hoje isto é possível, marcando um átomo, isto é, substituindo num composto, um átomo por um átomo correspondente marcado.

«O primeiro estudo bioquímico foi feito por Hevesi (20) que empregou chumbo radiativo natural, em 1924».

«Entretanto foi com a descoberta dos isótopos dos elementos comuns orgânicos, hidrogênio, nitrogênio, carbono, fósforo, oxigênio, que a técnica dos isótopos recebeu seu maior estímulo».

A técnica do precursor-produto permite desvendar conhecimentos. «De estudos deste tipo, o conceito de «turnover» (síntese, degradação e substituição) de certos constituintes do corpo, mesmo de composição constante, tem evoluído». (45) Exemplos:

O desenvolvimento e atividade metabólica da matriz orgânica do osso, tem sido estudado com C14 administrado com bicarbonato ou com S35 administrado com sulfato. Neste terreno as investigações iniciais foram de Bloom, Curtis e McLean (4), Armstrong (Schubert e Lindenbom, e Skipper, Nolan e Simpson (41).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A observação das superfícies por intermédio de microscópios estereoscópicos é realizada freqüentemente. Entretanto só se obtém bons resultados com aumentos pequenos, que não podem passar de 150 diâmetros.

Para vencer esse limite têm sido usado intensivamente réplicas de tecidos calcificados para observação ao microscópio eletrônico. E é este o melhor meio para o estudo topográfico da superfície do esmalte dentário. Como exemplo de uma aplicação típica, podemos citar: investigação na superfície de esmalte sob ação de floureto para controle da cárie dentária.

Também a estrutura interna de esmalte, dentina, cimento e osso, tem sido estudada por este método, pois não se consegue secções sufi-

cientemente finas dêstes tecidos, sem primeiro descalcificá-los. Para isso, faz-se uma superfície artificial, nestes tecidos, por desgaste e polimento, e posteriormente faz-se atuar um ácido fraco que corroe esta superfície de acôrdo com diversos fatôres, resultando em última análise, numa figura que pode ser interpretada. Esta técnica foi aperfeiçoada por Scott (39), em 1956, ao qual pertence a seguinte fotografia.

Para observar os estádios iniciais do desenvolvimento de dente, bem como a estrutura dos tecidos usa-se o método das secções. Estas secções de tecidos têm menos de 500 A de espessura e só podem ser manobradas por estarem incluídas em metacrilato que lhes dá resistência. Recordemos que o A é igual a 10^{-7} mm. Para obter-se êstes cortes usa-se navalhas de vidro adaptadas a microtomos. Um grande aperfeiçoamento na obtenção dêstes cortes foi obtido com a introdução da navalha de diamantes por Fernandez-Moran (15), em 1953, possibilitando o estudo de dentina e mesmo esmalte perfeitamente calcificado, sendo possível sistematizar os estudos sôbre mineralização.

Em 1956, Scott e Wyckoff (40) propuseram uma nova técnica que permite preparar pseudo-réplicas que podem ser empregadas para o microscópio eletrônico, difração eletrônica e ainda realizar análises ao raio-X fluorescente. No Brasil a ultraestrutura do dente tem sido estudada por Sasso e Santos (38), da Universidade de São Paulo.

PARA CONCLUIR:

Se examinarmos esta palestra, veremos que ela nada mais é do que uma exposição cronológica de fatos com um denominador comum: cada um traz uma contribuição, mas como ela é limitada e incapaz de solucionar todos os problemas, sempre impõe-se nova contribuição. E assim será até o infinito, como uma consequência de uma característica único do homem: o desejo de aprender, de progredir, de superar, de realizar-se enfim. Esta característica é o que diferencia uma sociedade humana de uma sociedade de insetos que constitue um exemplo de organização social de nível puramente instintivo, que não muda, que não evolue.

E no momento em que, por razões reais ou imaginárias, o homem sente-se incapaz de realizar-se, nasce o conflito.

A prova viva desta necessidade de progredir, através da busca de novos conhecimentos, nos é dada pelos senhores que se submeteram a um vestibular. E esta busca continuará durante o curso e durante tôda a vida.

E muitas vêzes o homem é levado a desejar fórmulas mágicas para aprender, para satisfazer suas aspirações. Desde logo devemos dizer que elas não existem: só o estudo e o trabalho levam à realização.

Portanto bem mais difícil do que ensinar apenas num plano puramente intelectual, é o trabalho do professor. Deve se estabelecer en-

tre professor e aluno um vínculo de entendimento mútuo.

Através deste processo de natureza afetiva se tornará mais fácil a superação das dificuldades e precalços dos quais está pontilhado o caminho do progresso.

Agradeço a congregação a que tenho a honra de pertencer, a escolha para pronunciar a aula inaugural e a todos os senhores, o fato de ouvi-la. Muito obrigado.

SYNOPSIS

The paper gives the text of the inaugural lecture, held at the Faculty of Odontology on March 2nd 1963.

The author analyses the methods of research into calcified tissues and their limitations. Starting from observation of the bones of rubified animals he proceeds as far as investigation by means of electronic microscopy.

He concludes pointing out, that his lecture furnished an exposition of facts in chronological order, each of the findings signifying a contribution, which however limited and unable to solve all existing problems, adds to our knowledge.

There are no limits to further developments, as it is a particular feature of man, that he wants to learn, to progress, to surpass and to realize himself.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, M. M. — **Demonstração dos fosfolípidios na glândula submandibular.** Pelotas, 1960. Tese.
2. BARBACHAN, J. J. D. — **Cicatrização pulpar; fenômenos iniciais observados com vasodilatador e vasoconstritor** Pôrto Alegre, 1958. Tese.
3. BELCHIER, J. B. — Apud: Sissons, H.A. — «The growth of bone». In: Bourne, G. H., ed. — **The biochemistry and physiology of bone.** New York, Academic Press, 1956, p. 448.
4. BLOOM, CURTIS & MCLEAN — Apud: Leblond, C.P. & Graulich, R.C. — «Autoradiographic studies of bone formation and growth». In: Bourne, G.H., ed. — **The biochemistry and physiology of bone.** New York, Academic Press, 1956, p. 327.
5. BRITO, J.H.M. — **Contribuição ao estudo da composição química dos dentes; análise espectrográfica qualitativa do esmalte e dentina em primeiros molares superiores humanos e fotometria de chama como método de análise quantitativa dos componentes inorgânicos dos dentes.** Pôrto Alegre, 1958. Tese.
6. BRODIE, A.P. — On the growth pattern of the human head from the third month to the eighth year of life. **Am. J. Anat.**, 63: 209-262, 1941.

7. BROADBENT, B.H. — A new X-ray technique and its application to orthodontia. *Angle Orthodont.*, Wisconsin, 1: 45-66, 1931.
8. CASTRO, N.M. & SASSO, W. da S. — Histochemical detection of mucopolysaccharides in mucous, mucoid and transitional cells of *Cepus* sp. (Macaco prego). *Riv. di Istochimica Normale e Pat.* Milano, 5: 211-220, 1959.
9. COUTINHO, H.B. — Contribuição ao estudo das fosfatases alcalinas na odontogênese. Recife, 1956. Tese.
10. DUHAMEL, H.B. — Apud: Sissons, H.A. — «The growth of bone». In: Bourne, G.H., ed. — *The biochemistry and physiology of bone*. New York, Academic Press, 1956, p. 447.
11. EBLING, H. — Contribuição ao estudo da histofisio-patologia da dentina. Pôrto Alegre, 1948. Tese.
12. ————. — Inervação do periodonto do incisivo inferior do rato. — Pôrto Alegre, 1959. Tese.
13. FELL, HONOR B. — «Skeletal development in tissue culture». In: Bourne, G.H., ed. — *The biochemistry and physiology of bone*. New York, Academic Press, 1956, p. 401.
14. FELL, Honor B. — op. cit. p. 439.
15. FERNANDEZ-MORAN, H. — A Diamond knife for ultra-thin sectioning. *Exp. Cell Research*, 5: 255, 1953.
16. GUIMARÃES, L.C. — Contribuição ao estudo da conservação do órgão pulpar. Pôrto Alegre, 1957. Tese.
17. GOLDHABER, PAUL — «Behavior of bone in tissue culture». In: Sognnaes, Reidar F., ed. *Calcification in biological systems*. Washington, American Association for the Advancement of Science, 1960, p. 349.
18. GOODSIR, J. — *Anatomical and Pathological Observations*. McPhail, Edinburgh. 1845.
19. HALES, S. — Apud: Hintzsche, E. — «O desenvolvimento da técnica histológica de coloração a partir de métodos macroscópicos de investigação». In: *Actas Ciba*, Rio de Janeiro, 11: 191-227, 1944.
20. HAVESI, — «Introduction to intermediary metabolism». In: White, A. et alii. — *Principles of biochemistry*. New York, McGraw-Hill book Co., p. 282.
21. HUNTER, J. — *The Natural history of human teeth*. 2.ed. London, J. Johnson, 1778.
22. KAC, A.L. — *Histopatologia pulpar frente às caries do esmalte*. Pôrto Alegre, 1955. Tese.
23. KOELLIKER, A. — *Handbuch der Gewebelehre des menchen*. Leipzig, Engelmann, 1852.

24. LIEDKE, E.D. — Polpa dentária em paradontopatias: relação entre aspectos clínicos das polpopatias nas paradontopatias. Pôrto Alegre, 1958. Tese.
25. LOURO, L.M. — Inervação da polpa dentária e da dentina: contribuição ao seu estudo pelo método de Ungewitter, modificado por Powers. Pôrto Alegre, 1958. Tese.
26. LOURO Fº, P.P. — Histologia da polpa-polipopulpar; contribuição ao seu estudo. Pôrto Alegre, 1948. Tese.
27. MEHEMEL, M. — The Structure of apatite. *Z. Krist.* 75: 323, 1930.
28. MILANO, N.F. — Semiologia pulpar: estudo da correlação entre os diagnósticos clínicos e histopatológicos. Pôrto Alegre, 1957. Tese.
29. MILES & LINDER — Apud: Hancox, N. — «The Osteoclast». In: Bourne, G. H., ed. — *The biochemistry and physiology of bone*. New York, Academic Press, 1956, p. 221.
30. MIRAGLIA, T. — Contribuição ao estudo histológico e histoquímico dos dentes do sagüi, *Callitrix jacchus* (Linnaeus 1866). Salvador, 1962. Tese.
31. MIZALDUS, E. — Apud: Hintzsche, E. — «O desenvolvimento da técnica histológica de coloração a partir de métodos macroscópicos de investigação». In: *Actas Ciba*, Rio de Janeiro, 11: 191-227, 1944.
32. NIXON, W.C. & COSSLETT, V.E. — Advances in radiographic technique II. Projection microradiography. *Brit. J. Radiol.*, Londres, 28: 532, 1955.
33. NOGUEIRA, D. — Seleção de forma e tamanho dos incisivos centrais superiores: contribuição a seu estudo para desdentados totais sem registros pré-extração. Pôrto Alegre, 1961. Tese.
34. NARAY-SOBO, S. — Structure of fluorapatite. *Z. Krist.*, 75: 387, 1930.
35. POSNER, A.S. et alii — Refinement of the hidroxyapatite structure. *Acta Cryst.*, 11: 308, 1958.
36. ROBINSON, I.B. & SARNAT, B.G. — Growth pattern of the pig mandible. A serial roentgenographic study using metallic implants. *Am. J. Anat.*, 96: 37-64, 1955.
37. SASSO, W. da S. et alii — Estudo histoquímico do útero da rata branca (*Rattus nervegicus albinus*) no ciclo gravídico e puerpural. *Rev. paul. Med.*, São Paulo, 57: 73-90, 1960.
38. SASSO, W. da S. & SANTOS, H. de S. — Estudo comparativo da ultraestrutura do dente humano e do cação (*odontaspis* sp.) ao microscópio eletrônico. *Anais Fac. Farmácia Odont. Univ. São Paulo*, São Paulo, 16: 197-211, 1959.

39. SCOTT, D.B. — Microscopic topography by means of surface replicas. *Photogrammetrics Enginaering*,
40. SCOTT, D.B. & WYCKOFF, R.W.G. — Carbon surface replicas for electron microscopy and electron diffraction. *J. Royal Microscopical Soc.*, 85: 217-222, 1956.
41. SKIPER, H.E. et alii — Studies on the hazard involved in use of C. III. Long term retention in bone. *J. Biol. Chem.* 189: 159-166, 1951.
42. SREEBNY, L.M. & NIKIFORUK, G. — Demineralization of hard tissues by organic chelating agents. *Science*, Washington, 113: 560, 1951.
43. SWING — Apud: Brito, J.H.M. — *Composição ao estudo da composição química dos dentes*. Pôrto Alegre, 1958, p. 11. Tese.
44. THOMPSON, D'Arcy, W. — *On the growth and form*. London, 1942.
45. WHITE, A. et alii — *Principles of biochemistry*. New York, McGraw-Hill book Co., 1959, p. 291.