

Acta Orthop Traumatol Turc 2013;47(5):359-365 kiinyeli yazının Türkçe çevirisi

Kemik grefti biyomalzeme uygulamaları için toz balık başlarının nitelendirilmesi

Mustafa Özgür ÖTEYAKA¹, Hasan Hüseyin ÜNAL², Namık BİLİCİ³, Eda TAŞÇI⁴

¹Dumlupmar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Kütabya; ²Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İstanbul; ³Bahçelievler Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü, İstanbul; ⁴Dumlupmar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Seramik Mühendisliği Bölümü, Kütabya

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kemik grefti biyomalzeme uygulamalarında kullanılan ve *Argyrosomus regius* türünden elde edilen toz balık kafasının kimyasal bileşimi, morfolojisi ve kristalografisini tanımlamaktı.

Çalışma Planı: İki değişik boyda toz farklı öğütme yöntemleriyle hazırlandı; A tozu (kaba, d₅₀=68.5 µm) ve B tozu (ince, d₅₀ = 19.1 µm). Elde edilen bu iki toz numunesi, X-ışını kırınımı (XRD), X-ışını floresansı (XRF), taramalı elektron mikroskobu (SEM), termogravimetri (TG) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) gibi farklı teknikler kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Sonuçlar tozun ağırlıklı olarak aragonit (CaCO₃) ve kalsitten (CaCO₃) oluştuğunu göstermekteydi. A ve B tozlarının XRD uygulaması sonrası paternleri standart aragonit paterni ile uyuşmaktaydı. Buna ek olarak, kalsiyum oksit (CaO) fazı A tozunun kalsinasyonu sonucu bulundu. TG analizinde, toplam kütle kaybı, sırasıyla, A tozu için %43.6, B tozu için %47.3 olarak kaydedildi.

Çıkarımlar: A tozunun mikroyapısının farklı boylarda ve başlıca çubuk şeklindeki yapılardan, B tozunun mikroyapısının ise aglomere partiküllerden oluştuğu gözlemlendi. Yüksek miktardaki CaO ve diğer oksitler kemiğin kimyasal bileşimine benzemekteydi. Genel olarak hidroksiapatit faz dönüşümü sonrası oluşan toz özelliklerinin kemik grefti olarak kabul edilebilir olduğu görülmektedir.

Anahtar sözcükler: Biyomalzemeler; kalsiyum karbonat; kemik grefti; nitelendirilme.

Deniz kaynaklı doğal biyomalzemeler kolay temin edilebilmeleri (düşük maliyet) ve biyoseramiklerin temelini oluşturan kalsiyum karbonat içermeleri nedeniyle kemik ve diş implant uygulamaları için ümit vadeden seçeneklerdir.^[1,2] Kalsiyum karbonat, CaCO₃, biyoseramik malzeme oluşumunun indüklenmesinde potansiyel bir inorganik çekirdek oluşturucu olarak kabul edilir.^[3,4] Hidroksiapatit Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, trikalsiyum fosfat (TCP) ve koralin yapı iskeleti gibi biyoseramikler kemiğin yapısında bulunan mineral bileşenlere benzer özellik göstermelerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.^[5,6]

LeGeros ve ark., köpekbalığı diş minesini (saf olmayan kalsiyum florapatit içermektedir, ~ $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ olarak idealize edilir) insan diş minesi (saf olmayan kalsiyum OH apatit içermektedir, ~ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olarak idealize edilir) ile karşılaştırmış; apatit içinde aynı anda flor ve karbonat mevcut olduğunda florun kat-

Yazışma adresi: Dr. Mustafa Özgür Öteyaka. Dumlupınar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Evliya Çelebi Fakültesi, Kütahya.

Tel: 0274 - 265 20 31 e-posta: mozgur.oteyaka@dpu.edu.tr

Başvuru tarihi: 09.06.2011 **Kabul tarihi:** 30.05.2012 ©2013 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu www.aott.org.tr adresinde doi:10.3944/AOTT.2013.2688 Karekod (*Quick Response Code*):



kısının karbonata göre daha önemli olduğunu vurgulamışlardır.^[7] Manoli ve Dalas ise kemik büyümesini onarmak için implant çevresinde biyomineralizasyon mekanizması kullanmışlardır.^[8] Ca²⁺, PO₄-³ iyonları ve OH- hidroksiapatit bölgeleri ile çeşitli eser elementler fizyolojik işleyiş ve osseointegrasyon sürecinde önemli rol oynamaktadırlar. Son zamanlarda, mürekkepbalığı *Sepia officinalis*, Çin tatlı su inci tozu, Pasifik Kumamoto istiridyesi *Crassostrea sikamea* ve çift kabuklu yumuşakça *Venus verrucosa* gibi deniz kökenli birkaç tür potansiyel biyoseramik malzemeleri olarak karakterize edilmiştir.^[9] Bunlar arasında sedef, en yoğun olarak çalışılan malzemelerden birisidir.^[10,11]

Bu hayvanların kabukları kalsit (%90) ve aragonit (%10) fazlarından oluşmaktadır. CaCO3 minerali, kararlılık sırasıyla, üç anhidröz polimorftan oluşmaktadır; kalsit, aragonit ve vaterit. Bunlar, sırasıyla, rombohedrik, ortorombik ve altıgen yapılara sahiptir. Normal koşullar altında termodinamik olarak kararlı polimorf kalsittir. Aragonit yarı kararlı bir yapıdadır ancak jeolojik oluşumun gerçekleşmesi sırasında kalsite dönüşümü yavaştır. CaCO3 yığını içinde vateritin kalsite faz geçişinin ~560°C sıcaklıkta olduğu belirtilmektedir.^[12] Lemos, saf aragonit sedefli (CaCO₃ polimorfik fazı) malzemeden hidroksiapatit nano tozu üretmiştir.^[13] Diğer yarı kararlı polimorf vaterit, yüksek doygunlukta çekirdek oluşturucu olarak hareket eder ve birkaç saat ya da gün içerisinde kararlı faza dönüşür. Bununla birlikte, bu faz dönüşümünün nasıl gerçekleştiği, malzeme içerisindeki tekrar oluşum ve çözünme/çökelme mekanizmaları hala tartışılmaktadır.^[12,14,15] Bu çalışmalarda çoğunlukla morfolojik analizler yapılmıştır. Örneğin, Muricopsis türü kabuklu ve Helix türü kara salyangozunda kesitli lamel yapı gözlenirken, sedefin mikromimarisinin 'tuğla ve harç' düzeninde olduğu saptanmıştır.^[15,16]

Biyomalzeme uygulamaları için, CaCO₃'ün kimyasal bileşimi, kristal şekli ve morfolojisinin bilinmesi önemlidir. CaCO₃'ün amorf fazı biyomineralizasyon sürecinin başlatılmasında CaCO₃'ün kristalin fazına kıyasla daha önemli bir rol oynar; amorf CaCO₃'ün çözünürlüğü kristalin CaCO₃'ün yaklaşık on katı daha fazladır.^[17]

Bu çalışmada, Türk denizlerinden toplanan *Argyrosomus regius* türü balığın kafasından elde edilen yeni bir biyomalzeme tozunun hazırlanması ve nitelendirilmesinin bildirimi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan Argyrosomus regius türünden elde edilen toz balık kafaları, İstanbul'daki Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından sağlandı. İlk olarak, balık kafası parçaları, sertleştirilmiş çelik üniversal öğütme makinesinde (Desktop Swing Mill HK40) 1 dakika süre ile öğütülüp, daha sonra plastik bir numune kabında toplandı. Elde edilen toz A tozu olarak kodlandı. İkinci adımda, üretilen A tozu Protherm PLF 120/5 elektrikli fırında 1000°C'ye kadar, 10°C/dk hızla ısıtıldı ve fırın içerisinde kalsinasyon süresini tamamlamak için 1 saat boyunca 1000°C sıcaklıkta tutuldu. Kalsine edilmiş toz C tozu olarak kodlandı. Ayrıca, A tozu için ateş zayiatı (*loss of ignition*, LOI), kalsinasyon öncesi ve 1000°C'de kalsinasyon sonrası toz ağırlıkları arasındaki fark ölçülerek hesaplandı.

Üçüncü adımda, Planetary Pulverisette 7 serisi mikro değirmen ile farklı öğütme sürelerinde A tozu kuru olarak öğütüldü. Bunun için, tozlar paslanmaz çelik bir kap içerisine ZrO₂ topları ile beraber yerleştirildi. Öğütme dakikada 600 devir hızında 30 dakika süre ile gerçekleştirildi. Elde edilen öğütülmüş toz B tozu olarak kodlandı.

Tozların kimyasal bileşimleri belirlendi. Bunun için, A ve C tozundan 4 g numune tartıldı ve 0.9 g bağlayıcı madde ile karıştırılarak, PE-EL pres cihazı (Breitländer GmbH, Wesel, Almanya) ile preslendi. Elde edilen vuvarlak tablet şeklinde numuneler X-ışını floresansı (Xray fluorescence, XRF) cihazında test edildi. A, B ve C tozlarının kristal yapılarını belirlemek amacıyla X-ışını difraktometresi (XRD, MiniFlex; Rigaku Corp., Tokyo, Japonya) ile Ni filtreli Cu K(a) radyasyon kullanılarak her birinin 10°-70° aralığındaki kristal yapısı incelendi. Tarama hızı dakikada 2° olup, tarama 0.01° aralıklarla gerçekleştirildi. Fazların tanımlanması, aragonit ve kalsit için 71-2396 ve 4-777 no'lu Foint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) kartları kullanılarak deneysel XRD paternlerinin karşılaştırılmasıyla yapıldı. Tozların zamana bağlı olarak ağırlık kaybı Diamond TG/DTA (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, ABD) termal analiz cihazı kullanılarak belirlendi. Diferansiyel termal analiz (DTA) statik azot atmosferi altında 20°-1100°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızında, platin potalar kullanılarak gerçekleştirildi. Tozların mikroyapısı JEOL JSM 5600LV taramalı elektron mikroskobunda (scanning electron microscope, SEM) ×500 ve ×1500 büyütme kullanılarak incelendi. A ve B tozlarının ortalama partikül boyunun dağılımı Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Birleşik Krallık) partikül boy analiz cihazı ile ölçüldü.

Bulgular ve Tartışma

A ve C tozlarının kimyasal analizleri Tablo 1'de verilmiştir. A tozu başlıca CaO (%61.27) bileşeninden oluşmaktaydı. A tozu içerisinde geri kalan kısım ise dü-

Elementler ve oksitler									
	AI_2O_2	SiO ₂	P_2O_5	SO₃	K ₂ O	CaO	Fe_2O_3	Eser	Ateş zaiyatı
A tozu	0.26	0.41	0.04	0.17	0.16	61.27	0.04	*<0.02	44.3
C tozu	0.26	0.45	0.04	0.06	0.20	80.44	0.01	[†] <0.01	

Tablo 1. A ve C tozlarının kimyasal bileşimi (ağırlıklı %).

* Na₂O, MgO, TiO₂, V₂O₅, Cr₂O₃, MnO, Co₃O₄, CuO, ZnO, Ga, SrO, NiO, Ge, As₂O₃, Se, Br, Rb₂O, Y, ZrO₂, Nb₂O₅, Mo, Ag, CdO, In, SnO₂, Sb, Te, I, Ce, Ba, La, Wo₃, Hg, PbO, Th, U, Bi, Tl. [†]Na₂O, MgO, TiO₂, V₂O₅, Co₃O₄, MnO, Cr₂O₂

şük oranlarda SiO₂ (%0.41), Al₂O₃ (%0.26), SO₃ (%0.17), K₂O (%0.16), P₂O₅ (%0.04), Fe₂O₃ (%0.04) ve organik maddeler gibi farklı oksitlerden meydana gelmekteydi. Bunun dışında, %0.02'den az bir bölümü eser element ve oksitlerden ibaretti. Balık kafasının kimyasal bileşimi istiridye kabuklarının bileşimine benzemekte; temelde, ağırlıklı yüzdelerine göre CaO (%54.31), SiO₂ (%1.25), Al₂O₃ (%0.64), Fe₂O₃ (%0.11), MgO (% 0.01), K₂O (% 0.01), Na₂O (%0.93) ve TiO₂ (% 0.11)'den oluşmaktaydı.^[2] Bununla birlikte, Tablo 1'deki sonuçlara göre, yüksek miktarda CaO ve P₂O₅ gibi kabukta mevcut olmayan diğer elementlere de rastlandı. Özellikle, P₂O₅ ve Tablo 1'de belirtilen Ca²⁺, PO₄³⁻ ve osseointegrasyon işleminde rol oynayan birkaç eser element kemik onarımında yararlı olabilir.^[2]

A tozunun kimyasal bileşiminin 1000°C'de kalsinasyon işleminden sonra değiştiği görüldü (Tablo 1). Bu değişiklik başlıca uçucu organik maddelerden kaynaklanmaktaydı. İlk çarpıcı gözlem, Tablo 1'de CaO, K₂O ve SiO₂'in miktarlarındaki belirgin artıştır. CaO miktarının %80.44'ten, ağırlıklı yüzde ile %61.27'ye gelişimi, CaCO₃'ün CaO ve CO₂'ye ayrışması ile açıklanabilir ki burada CO₂ uçucu özelliktedir:

$$CaCO_3 \rightarrow CaO+CO_2$$

Bununla birlikte, A tozu için SO₃ ve Fe₂O₃'te az miktarda bir düşüş mevcuttu. Buna ek olarak, Al₂O₃ veya P₂O₅ miktarlarında herhangi bir farklılık görülmezken, bazı eser elementlere kalsinasyon sonrası rastlanmadı (Tablo 1). Kalsinasyon sonucu fazların dönüşümü ve uçucu madde içeriğinin varlığı net bir şekilde kaydedildi. Buna yönelik, A tozuna ateş zayiatı testi uygulandı.

Ateş zayiati testi, bir mineral veya tozun element veya oksit analizinin bir parçasıdır. Uçucu maddeler genellikle karbonatlardan elde edilen hidrat ve karbondioksit ile organik maddelerden oluşan kayıplardır. Uçucu organik madde miktarı, 1000°C'ye ısıtma öncesinde ve sonrasında meydana gelen toz ağırlık farkından hesaplanır. Burada, LOI1000 testlerinin sonuçlarında organik maddelerin A tozunun ~%44.3'üne karşılık geldiği doğrulanmıştır.

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (energy dispersive spectroscopy, EDS) A tozu için gerçekleştirildi (Şekil 1). Başlıca üç temel pik görüldü. En yoğun piki kalsiyum (Ca) yaparken, bunu oksijen (O) ve karbon (C) takip etti. Kantitatif konsantrasyon ağırlıkları, aynı sırayla, %58.4, %39.9 ve %1.5 idi. Bu sonuçlar, özellikle kalsiyum için, yukarıda elde edilen XRF sonuçları



Şekil 1. A tozunun EDS analizi.



Şekil 2. A ve B tozunun XRD analiz sonuçları.

ile uyumluydu. C ve O elementleri yüksek ihtimalle kimyasal bileşik CaCO₃ kaynaklı idi. Ayrıca, EDS analizi kalsinasyon işleminden sonra gerçekleştirilmişti. Ca (ağırlıklı %66.9) ve C elementi (ağırlıklı %2.2) konsantrasyonlarında artış gözlemlenirken, O elementinde (ağırlıklı %30.4) hafif bir azalma söz konusu idi. Yukarıda da belirtildiği gibi, CaCO₃ ve organik maddelerin bozunumu element miktarının değişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzden, kalsinasyon sonrası Ca ve C miktarındaki artış şaşırtıcı değildir. Oksijen elementindeki azalma uçucu organik maddelerin yanması ile açıklanabilir.



Şekil 3. A ve C tozunun XRD analiz sonuçları.

İncelenen tozların kimyasal bileşimi Ca, P ve birçok eser element gibi insan kemiği bileşiminde bulunan elementleri içermekteydi. Kemiğin inorganik bileşimi ise (kemik mineral) düşük kristalli hidroksiapatit $CA_{10}(PO_4)_6OH_2$ 'den oluşmaktadır.

A ve B tozunun XRD paternleri Şekil 2'de verilmektedir. İlk bakışta, her iki malzeme içerisinde de kristalin bir fazın mevcudiyetine işaret eden bazı pikler görülmektedir. A ve B tozlarının difraktogramları standart aragonit (JCPDS: 41-1475) ve kalsit (JCPDS: 47-1743) paternleri ile uyum göstermektedir. CaCO₃'ın üçüncü fazı olan vaterit fazı bir pik noktası oluşturmamıştı. Bu nedenle, B tozunun göreceli yoğunluğunun A tozuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Her iki toz için $2\emptyset$ =29° pikleri karşılaştırıldığında, pik genişliği ve uzunluğunda ciddi bir fark görülmektedir. Bu farklılıkların, B tozunun partikül boyu dağılımının daha ince olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Buna ek olarak, A tozunun faz dönüşümünü ortaya çıkarmak için toz kalsinasyonu araştırıldı. A ve C tozlarının XRD paternleri Şekil 3'te görülmektedir. C tozunun XRD paterni ise 2Ø=34.05, 2Ø=40.82, 2Ø=56.74 açılarında 3 yoğun pik yapmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi, A tozunun difraktogramı standart aragonit ve kalsit fazlarının paternleri ile uyum sağlamaktayken, C tozunun difraktogramı standart kalsiyum oksit (JCPDS: 37-1497) ile eşleşiyordu. Böylece, kalsinasyon işleminin aragonit ve kalsit fazlarını termodinamik olarak kararlı olan kalsiyum oksite (C tozu) dönüştürdüğü sonucuna varılabilir.

A ve B tozlarının DTA ve termogravimetri (TG) grafikleri Şekil 4'te verilmektedir. Her iki malzemede de iki kademeli bir kütle kaybı görülmektedir. İlk kademe, 20°-580°C sıcaklık aralığında su moleküllerinin uzaklaştığı (adsorbe suyun uzaklaştığı) kademedir. A ve B tozları için, sırasıyla, 580°C'de %1.8'lik ve 570°C'de %2.8'lik bir ağırlık kaybı söz konusuydu. A tozu ve B tozunun endotermik pikleri, sırasıyla, DTA_{max} = 246°C (-7.9 μ V) ve DTA_{max} = 369°C (8.7 μ V) noktalarında bulundu. İkinci kademenin endotermik piki 570°-816°C arasında, her iki toz için de (A tozu için DTA_{max} = 790°C ve B tozu için DTA_{max} = 758°C) CaCO₃'ün bozunması sonucunda oluşmuştu. Bununla birlikte, hangi uçucu ve/veya organik maddenin uzaklaştığını tahmin etmek zordu. A ve B tozları için, sırasıyla, malzeme kaybının miktarı 41.8% (816°C) ve 44.5% (778°C) olarak kaydedildi. Termal bozunmanın son katı ürünü kalsiyum oksittir. Bu maddenin, sırasıyla A ve B tozları içinde toplam kütle kaybı 43.6% ve 47.3% idi. Bu sonuçlar kimyasal kompozisyon analizleri için yapılan ateş zayiatı testleri ile paralellik göstermektedir (Tablo 1). Burada, tozların iki farklı boyutu arasında gözlemlenmiş olan önemli bir kütle kaybına dikkat etmek gerekir; B tozu A tozundan %3.7 daha fazla kütle kaybına uğramıştır. Aynı zamanda, sırasıyla A ve B tozu için 790°C (637 μV s/mg) ve 758°C (708 μV s/mg)'de ver alan endotermik piklerin analizi B tozunun daha yüksek bir endotermik reaksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Bu, daha düşük sıcaklıkta, CaO ile karşılaştırıldığında CaCO3'ün B tozunda daha fazla bozunduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 4. A ve B tozunun DTA ve TG analiz sonuçları.



Şekil 5. (a-c) A tozunun farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü.



Şekil 6. (a-c) B tozunun farklı büyütmelerdeki SEM görüntüsü.

Şekil 5 ve 6, A ve B tozlarının farklı büyütmelerdeki SEM görüntülerini göstermektedir. Katı balık başları öğütüldükten sonra, A tozunun morfolojisinde farklı boyutlardaki partiküllerin karışık bir iri taneli çubuğa benzediği görülmektedir (Şekil 5). Çubukların yüzeyi boyuna lameller şeklindedir ki, bu yapının şekli muhtemelen öğütme sırasında değişmiş olabilir (Şekil 5b). B tozunun morfolojisi ise küçük ağ yapılı partiküllerden oluşmaktadır (Şekil 6). B tozunun yapısında aglomerasyonun oluştuğuna dair şüphe yoktur. Öğütmeden sonra iri taneli çubuk yapıların ortadan kaybolduğu görülmüştür.

A ve B tozlarının partikül boy dağılımları Şekil 7'de karşılaştırılmaktadır. Bu tozların partikül boy dağılımları lazer difraksiyon tekniği kullanılarak kuru tozlar için belirlenmişti. Mekanik karışım yapılan B tozu, A tozuna göre daha küçük partikül boyutuna sahipti. A tozu için ortalama partikül boyu dağılımı $d_{50} = 68.5$



Fig. 7. A ve B tozlarını partikül boyut dağılımı.

μm; d(0.1) = 2.1 μm ve d(0.9) = 418.6 μm idi. B tozu ise d₅₀ = 19.0 μm; d(0.1) = 0.9 μm ve d(0.9) = 96.90 μm ile daha küçük bir ortalama partikül boyu dağılımına sahipti. Bu sonuç Şekil 5 ve 6'daki SEM görüntüleri ile desteklenmektedir.

Sonuç olarak, toz balık kafalarının kimyasal bileşimi kemik greftlerinin hazırlanmasında, özellikle kemiğin kompozisyonunda da bulunan CaO, P₂O₅ ve K₂O ile yararlı olabilir. Analizler tozun başlıca aragonit ve kalsitten oluştuğunu göstermektedir. 1000°C'deki kalsinasyon, aragoniti yüksek konsantrasyonlu CaO ile kalsiyum oksit fazına dönüştürmektedir. Planetary öğütme A tozunun boyutunu d₅₀ = 68.5 µm'den d₅₀ = 19.0 µm'ye azaltmıştır. Bununla birlikte, B tozunda partiküllerin aglomere olduğu gözlenmiştir. Gelecek bir çalışma olarak, B tozu, mevcut metotlar ile hidroksiapatite dönüştürülmeli ve diğer kemik greftleri ile karşılaştırılmalıdır.

Teşekkür

Yazar M. Ö. ÖTEYAKA balık kafalarını tedarik eden Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne ve teknik destek için Dumlupınar Üniversitesi'ne teşekkürlerini sunar.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- 1. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem Rev 2008;108:4742-53.
- Rocha JH, Lemos AF, Agathopoulos S, Valério P, Kannan S, Oktar FN, et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. Bone 2005;37:850-7.
- 3. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. Injury 2005;36 Suppl 3:S20-7.
- 4. Ben-Nissan B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. Curr Opin Solid State Mater Sci 2003;7:283-8.

- Begley CT, Doherty MJ, Mollan RA, Wilson DJ. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. Biomaterials 1995;16:1181-5.
- Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. Int J Oral Maxillofac Surg 1994;23:395-8.
- LeGeros RZ, Silverstone LM, Daculsi G, Kerebel LM. In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel. J Dent Res 1983;62:138-44.
- 8. Manoli F, Dalas E. Calcium carbonate crystallization on xiphoid of the cuttlefish. J Cryst Growth 2000;217:422-8.
- Tüyel U, Öner ET, Özyegin S, Oktar FN. Production and characterization of bioceramic nanopowders of natural-biological origin. J Biotechnol 2007;131:S65-6.
- Cartwright JH, Checa AG. The dynamics of nacre selfassembly. J Royal Soc Interface 2007;4:491-504.
- 11. Lopez E. Mother-of-pearl and the bone, the results show a promising alternative. Biofutur 2005;253:30-2.
- Barriga C, Morales J, Tirado JL. Changes in crystallinity and thermal effects in ground vaterite. J Mater Sci 1985;20:941-6.
- Lemos AF, Rocha JH, Quaresma SS, Kannana S, Oktar FN, Agathopoulos S, et al. Hydroxyapatite nanopowders produced hydrothermally from nacreous material. J Eur Ceram Soc 2006;26:3639-46.
- Damien E, Revell PA. Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: a review of experimental studies and biomedical applications. J Appl Biomater Biomech 2004;2:65-73.
- Luz GM, Mano JF. Mineralized structures in nature: Examples and inspirations for the design of new composite materials and biomaterials. Compos Sci Technol 2010;70: 1777-88.
- Bertazzo S, Bertran CA. Morphological and dimensional characteristics of bone mineral crystals. Key Eng Mat 2006;309-311:3-6.
- Becker A, Bismayer U, Epple M, Fabritius H, Hasse B, Shi J, et al. Structural characterisation of X-ray amorphous calcium carbonate (ACC) in sternal deposits of the crustacea *Porcellio scaber*. Dalton Trans 2003;4:551-5.