

BIOMINERALIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOCOMPÓSITOS DE NANOHIĐROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO UTILIZANDO FLUIDO CORPORAL SIMULADO**Tayra Rodrigues Brazil¹, Marcele Florêncio Neves¹, Luís Eduardo Silva Soares², João Paulo Barros Machado³, Fernanda Roberta Marciano¹ e Anderson de Oliveira Lobo¹**

¹Laboratório de Nanotecnologia Biomédica/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos, SP, Brasil. Email: tayra_rb@hotmail.com, mneves@univap.br, frmanciano@univap.br e aolobo@univap.br

²Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos, SP, Brasil. Email: lesouares@univap.br.

³Laboratório Associado de Sensores e Materiais/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Av. dos Astronautas 1758, São José dos Campos, 12227-010, SP, Brazil, email: joaopaulo@las.inpe.br

Resumo- Nanobiomaterias à base de nanotubos de carbono de múltiplas paredes verticalmente alinhados superhidrofílicos (VAMWCNT-O₂) são promissores pelas suas similaridades e biocompatibilidade com o tecido ósseo. Busca-se a obtenção do processo de biomineralização de nanobiomateriais visando acelerar o processo de osseointegração. A biomineralização desse nanobiomaterial viabiliza sua aplicabilidade como arcabouço para sustentação celular e consequente formação de tecido ósseo. O recobrimento de VAMWCNT-O₂ com nanohidroxiapatita (nHAp) visa aprimorar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade, devido a sua semelhança com a matriz estrutural óssea. Este trabalho tem como objetivo a biomineralização *in vitro* de nanocompósitos à base de nHAp/VAMWCNT-O₂ utilizando fluido corpóreo simulado (SBF). Conseguiu-se obter densificação devido ao depósito de nanoapatitas policristalinas nas superfícies e entre os nanocompósitos de nHAp/VACNT-O₂ de forma rápida, sem a necessidade de tratamento térmico. Devido às características e propriedades dos nanocompósitos torna-se extremamente viável suas aplicações para aceleração de processos regenerativos *in vivo*.

Palavras-chave: Biomineralização, Nanotubos de carbono, Nanohidroxiapatita, SBF e Técnicas de caracterização.

Área do Conhecimento: Nanociência e Nanotecnologia Aplicada

Introdução

Na natureza, os organismos controlam a nucleação e o crescimento de cristais usando interfaces orgânicas como modelos (HEUER *et al*, 1992). Nas últimas décadas, cientistas vêm tentando aprender com a natureza como projetar biomateriais biomiméticos, inspirados pela estrutura hierárquica complexa de osso e outros tecidos naturais mineralizados, e para controlar o processo de biomineralização em substratos de biomateriais, a fim de promover as propriedades osteocondutoras dos dispositivos implantáveis (WEINER; ADDADI, 1997).

Aspectos fundamentais da biomineralização também podem ser importantes a fim de propor novas metodologias para melhorar a calcificação sobre a superfície dos biomateriais ou para desenvolver modelos bioativos tridimensionais que podem ser utilizados na medicina regenerativa (HEUER *et al*, 1992). Em particular, a literatura relata que alguns grupos químicos e protéicos, bem como a matriz tridimensional, na qual poderia ocorrer a calcificação, desempenham um papel fundamental na nucleação e crescimento de nanohidroxiapatita (nHAp) (ADDADI; WEINER;

GEVA, 2001). A análise da bioatividade de materiais artificiais, quando implantados *in vivo*, pode ser reproduzida *in vitro* por ensaios de imersão utilizando uma solução fisiológica simulada que imita as concentrações de íons típicos nos fluidos corporais simulados (SBF) (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Nanotubos de carbono verticalmente alinhados superhidrofílicos (VAMWCNT-O₂) são de particular interesse na medicina regenerativa, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e características biomiméticas (LOBO *et al*, 2010). O modelo induzido de nHAp tem amplas perspectivas em campos aplicados da medicina ósseo-regenerativa (BRUNSKI; PULEO; NANJI, 2000). Assim, uma combinação desses dois excelentes materiais pode ser utilizada em aplicações de engenharia de tecido ósseo. Sabe-se que ocorre a formação de nanoapatitas policristalinas sobre os VAMWCNT-O₂, através da biomineralização em SBF e outras soluções contendo íons de cálcio e fosfato, onde os grupos funcionais presentes nos VAMWCNT-O₂, como a carboxila (-COOH), atuam como locais de nucleação e deposição de apatitas (MARSÍ *et al*, 2012).

Várias metodologias têm sido aplicadas no preparo da solução SBF para obter nanobiomateriais mineralizados para o desenvolvimento de enxertos ósseos, são mostrados na literatura (HABIBOVIC et al, 2002). No entanto, os seus cristais de apatita relatados eram diferentes na morfologia, e os processos de deposição de apatita não são suficientemente claros. Neste estudo, mostra-se, pela primeira vez, o processo de biomineralização de nanocompósitos à base de nHAp/VAMWCNT-O₂ utilizando diferentes metodologias de solução de SBF viabilizando seu uso como enxertos ósseos *in vivo*.

Metodologia

Todo o processo de produção dos VAMWCNTs foi realizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Para o crescimento do filme de VACNT utilizou-se um reator de plasma de microondas. Utilizaram-se ligas de titânio com pureza biomédica como substrato. Como catalisadores metálicos, para conseqüente nucleação dos VACNTs, utilizou-se o depósito de uma camada de 10 nm de níquel obtidas em uma evaporadora de feixe de elétrons (*Auto 306 –EB3 Multihearh Electron Beam Source*). Os VAMWCNT foram crescidos em duas etapas, denominadas de pré-tratamento e deposição, respectivamente. Na etapa de pré-tratamento, o objetivo foi criar nanoilhas do material catalisador, a partir das quais os nanotubos puderam ser nucleados. Antes de iniciar esse processo, foram inseridos 90 sccm de H₂ + 10 sccm de N₂ a uma pressão de 4x10³ Pa, aquecendo o porta-amostras com uma resistência elétrica até atingir uma temperatura aproximada de 300°C. Na fase de pré-tratamento, com duração de 5 minutos, a potência do gerador de microondas foi mantida em 800 W e a temperatura atingiu cerca de 760°C. Na etapa de deposição, foram adicionados 14 sccm de CH₄ como fonte de carbono por 1 minuto (LOBO, 2011).

Para obtenção da superhidrofilicidade, ocorreu a funcionalização dos VAMWCNT (VAMWCNT-O₂), utilizando o sistema de plasma de O₂ DC-pulsado, nos parâmetros experimentais desenvolvido por Lobo et al (2011): Tempo de tratamento a plasma: 2 minutos, Tensão aplicada: - 400V e Pressão de trabalho: 80 mTorr.

Utilizou-se a técnica desenvolvida por Lobo et al (2010), onde a nHAp é eletrodepositada sobre os VAMWCNT-O₂, e desta forma, obtiveram-se os nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂. O processo de eletrodeposição foi realizado em um potenciostato/galvanostato (AUTOLAB, PGSTAT

128N, HOLANDA), operando em modo potenciostático.

A biomineralização dos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂ foi realizada pela imersão do material em solução de SBF. A solução foi preparada pela dissolução de íons em água destilada, em chapa de agitação. O pH da solução foi ajustado com o peagâmetro (METROHM), sendo obtidos valores de 6,10 (HCl) e 7,40 (NaOH). As composições das SBFs utilizadas neste trabalho são propostas por Barrère et al (2002), cuja concentração dos componentes é cinco vezes maior do que a solução original proposta por Kokubo (1998). Na Tabela 1 são apresentados os componentes e as composições empregados.

Tabela 1- Composição SBF 5x.

Componente	Quantidade (g/L)
NaCl	40,00
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,52
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,84
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0,89
NaHCO ₃	1,76

Os nanocompósitos de nHAp/VAMWCNTs foram colocados em tubo de ensaio com 15 mL de SBF, com uma amostra em cada frasco, e acondicionados em incubadora refrigerada de bancada, equipamento da marca Cientec, modelo CT-712-R. As amostras foram agitadas a 75 RPM, em temperatura em torno de 36,5°C pelos períodos de 7, 14 e 21 dias. Após o período de imersão as amostras foram retiradas da solução de SBF, lavadas em água destilada e secas em estufa por 24 horas a 50°C.

Resultados

Na figura 1 é possível observar as micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies dos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNTs antes (Figura 1A) e após imersões nas respectivas soluções SBF com diferentes pHs, sendo eles: 6,10 (Figura 1.1a-c) e 7,40 (Figura 1.2a-c). Os tempos de incubação seguem a sequência de 7 dias (a), 14 dias (b) e 21 dias (c). Na Figura 1A é possível verificar os cristais de nHAp eletrodepositados sobre os VAMWCNT-O₂ como crescidos, ou seja, sem a respectiva imersão em SBF(controle).

Observa-se que em ambos os pHs os nanocompósitos se mostram bioativos pois ocorrem precipitações de apatitas policristalinas. Contudo, na amostra imersa em pH ácido por 7 dias (Figura 1.1a) não se observa a uma camada densa, apenas cristais de nHAp. Em 14 dias (Figura 1.1b), já possível observar a densificação da camada seguida da formação de uma segunda camada sobre a superfície, sendo que as

nanoapatitas apresentam uma morfologia *plate-like* (em forma de placas), mantida na amostra de 21 dias (Figura 1.1c). Quanto aos nanocompósitos imersos em pH básico (Figuras 1.2a-c), é possível observar ques na amostra imersa por 7 dias (Figura 1.2a) já ocorre a densificação completa da camada com a deposição de nanoapatitas globulares. Após 14 dias (Figura 1.2b) verifica-se uma maior ampliação dos detalhes da densificação, bem como um aumento da espessura em relação ao mesmo período observado pH ácido. Detalhes desse aumento de espessura são mostrados nas amostras de 21 dias (Figura 1.2c), onde é possível observar o depósito de nanoapatitas, não somente na superfície, como também entre os VAMWCNT-O₂.

A Figura 2 mostra a rugosidade dos compósitos antes e após a biomineralização, utilizando o perfilômetro óptico. Para o cálculo da rugosidade média (Ra), foram feitas três medidas em cada amostras (Tabela 2). Essas análises foram feitas porque se observou uma variação nas dimensões das microestruturas das amostras (formação de nanoapatitas policristalinas) devido ao tempo de imersão em SBF nos diferentes pHs estudados. É possível observar que, quando comparadas à amostra controle (Figura 2a), todas as demais amostras apresentam rugosidade elevada (Tabela 2).

Tabela 2- Rugosidade média (Ra).

Dias	pH- 6,10	pH- 7,40
7	6,63 ± 1,26	14,74 ± 0,51
14	19,11 ± 2,43	6,74 ± 1,02
21	20,63 ± 6,26	16,41 ± 2,71

É possível verificar uma diminuição na rugosidade, com a mudança no pH, devido à formação de uma camada de nanoapatitas policristalinas (Tabela 2), embora as amostras submersas em pH 7,4 por 7 dias terem apresentado uma rugosidade muito elevada se comparadas às amostras imersas no pH 6,1 (Figuras 2e e 2b, respectivamente). Essa rugosidade não é mantida (Figura 2f), diminuindo conforme pode ser constatado na Tabela 2, enquanto que a rugosidade das amostras submersas em pH 6,1 aumentam progressivamente (Figura 2c e 2d), mantendo-se superior às demais amostras (Figura 2f e 2g).

Verifica-se que há deposição de forma homogênea de cálcio e de fósforo sobre os nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂ antes e após o processo de biomineralização (dados de distribuição não mostrados). No entanto, opta-se em utilizar para comparações somente a razão Ca/P quantificadas pela técnica de EDX apresentados na Figura 3. Análises semi-

quantitativas elementares de cálcio (Ca) e fósforo (P) foram realizadas por um espectrômetro de microfluorescência de raios-X por energia dispersiva (μ -EDX 1300, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com um ródio de tubo de Raio-X e um detector de Si (Li) resfriado por nitrogênio líquido (N₂). O equipamento foi acoplado a um sistema de computador para processamento de dados. A faixa de energia de exames foi de 0,0 a 40,0 eV. A tensão no tubo foi fixada em 15 kV, com ajuste de corrente automático. As análises de emissões características de Ca e P foram tomadas longitudinalmente na superfície das amostras, com diâmetro de feixe incidente de 50 μ m. O mapeamento foi tomado com base em 40 x 30 pontos com uma etapa de 20 microns ao longo das apatitas biológicas formadas nos filmes de VACNT superhidrofílicos. A análise foi realizada em uma linha de 100 mm de comprimento e 50 mm de espessura. Os exames foram realizados com uma taxa de contagem de 10 s por ponto (tempo vivo) e um tempo morto de 25%. O equipamento foi ajustado com uso de um reagente de certificado comercial de hidroxiapatita estequiométrica (Sigma-Aldrich sintético Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, grau 99,999%, lote 10818HA) como referência. As medições foram coletadas usando os parâmetros fundamentais da emissão de raios-X característico dos elementos Ca e do P. Os elementos O e H foram utilizados como equilíbrio químico. A referência também foi utilizada como um ponto na curva de calibração de intensidade. A calibração de energia foi realizada utilizando padrões internos para os elementos de luz (SOARES et al, 2009). As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Univap.

Utilizaram-se-se nHAp eletrodepositadas sobre os VAMWCNT-O₂ como controle para as análises.

Discussão

A literatura identifica diferentes metodologias para a preparação de solução biomimética de SBF (BARRERE et al, 2002). Inicialmente, é proposta por Kokubo e Takadama (2006), porém com o intuito de minimizar os reagentes para a confecção, tornando-a de baixo custo, pequenas alterações foram realizadas (HABIBOVIC et al, 2002). Além dos diferentes tipos de reagentes, também são propostos diferentes pHs, identificando melhorias no processo de precipitação de íons Ca e P. Vale a ressalva que todos os processos foram realizados em superfícies bidimensionais, onde, na maioria das vezes, utilizam-se ligas de titânio (ESCADA, 2009). VAMWCNT-O₂ são considerados

candidatos ao processo de biomineralização em SBF (MARSÍ et al, 2012) devido à presença de carbonato de cálcio, porém procura-se para o desenvolvimento de nanobiomateriais mimetizar cada vez mais o tecido humano. Neste trabalho, procura-se mimetizar o tecido ósseo associando aos VAMWCNT-O₂ a nHAp para que com isso melhore as condições de deposição de cálcio e fósforo *in vitro* e *in vivo*.

Após a imersão em SBF verifica-se que a superfície do nanocompósito à base de nHAp/VAMWCNT-O₂ é carregada negativamente e, em consequência, combinada de maneira seletiva com os íons de cálcio carregados positivamente (nHAp), formando assim nanoapatitas policristalinas (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003), sendo estas identificadas como as nanopatitas depositadas observadas nas Figuras 1, 2 e 3. Como os íons de cálcio acumulam-se na superfície, esta torna-se carregada positivamente e, como resultado, esses íons combinam-se com os íons fosfatos carregados negativamente, formando assim, fosfatos de cálcio (TUNG, 1998). O fosfato de cálcio se transforma espontaneamente em apatita, simulando as muitas fases químicas do fosfato de cálcio presentes nos tecidos biológicos, como nos ossos, o que justifica sua aplicação como nanobiomaterial (ESCADA, 2009).

Observa-se que na Figura 1A ocorre a formação de cristais de nHAp de forma homogênea sobre os VAMWCNT-O₂. As Figuras 1.1a e 1.2a referem-se aos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂ que ficaram imersos em SBF por 7 dias. Verifica-se que em pH mais básico (Figura 1.2a) as nanoapatitas policristalinas depositadas ficaram mais homogêneas, apresentando-se mais esferulíticas, ocorrendo a completa densificação da camada de nanoapatita.

A comprovação de tal fenômeno de bioatividade pode ser observada na Figura 3, com um aumento na razão Ca/P, se comparada às amostras submersas em solução com pH ácido (Figura 1.1a), que por sua vez apresentam superfícies recobertas por formações de nanocristais de apatita similares, porém com diversos tamanhos, o que pode ser visualizado por meio da MEV. Também é possível verificar que quanto maior o tempo de incubação dos nHAp/VAMWCNT-O₂, mais espessa fica a camada de nanoapatitas policristalinas, porém não ocorre a densificação da camada. Entretanto, as amostras submetidas ao pH 7,4 apresentam-se mais homogêneas, com as nanoapatitas policristalinas formadas apresentando razões molares de Ca/P médias de 2,442; 2,021; 2,430, para 7, 14 e 21 dias, respectivamente.

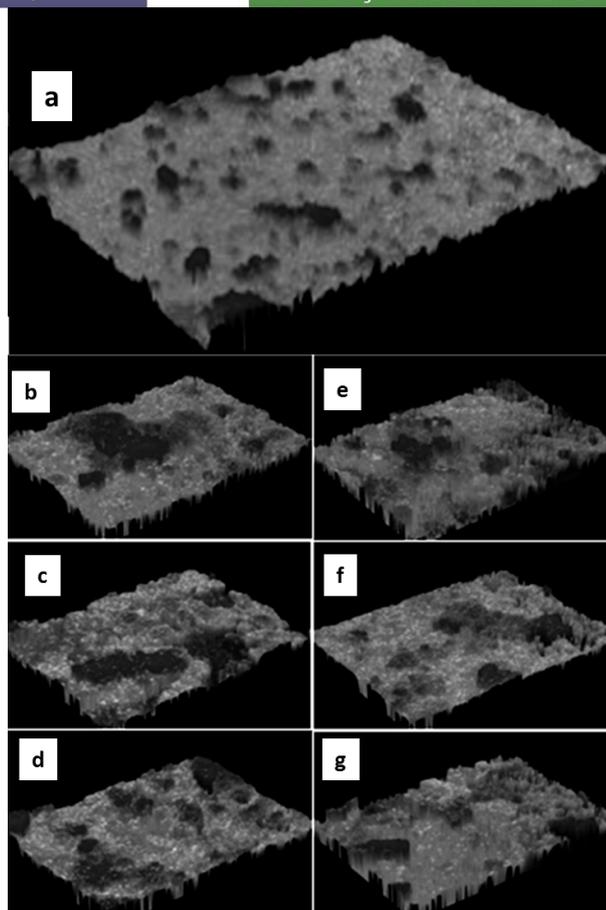


Figura 2- Perfilômetro Ótico dos compostos de HA/VACNT-O₂ (a), imersas por 7 (b,e), 14(c,f) e 21 (d,g) dias em SBF. As imagens foram obtidas na escala de 300 μm².

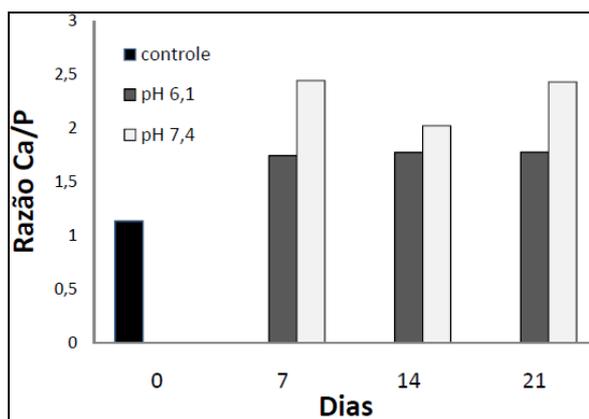


Figura 3- Gráfico baseado nos dados fornecidos pelo EDX.

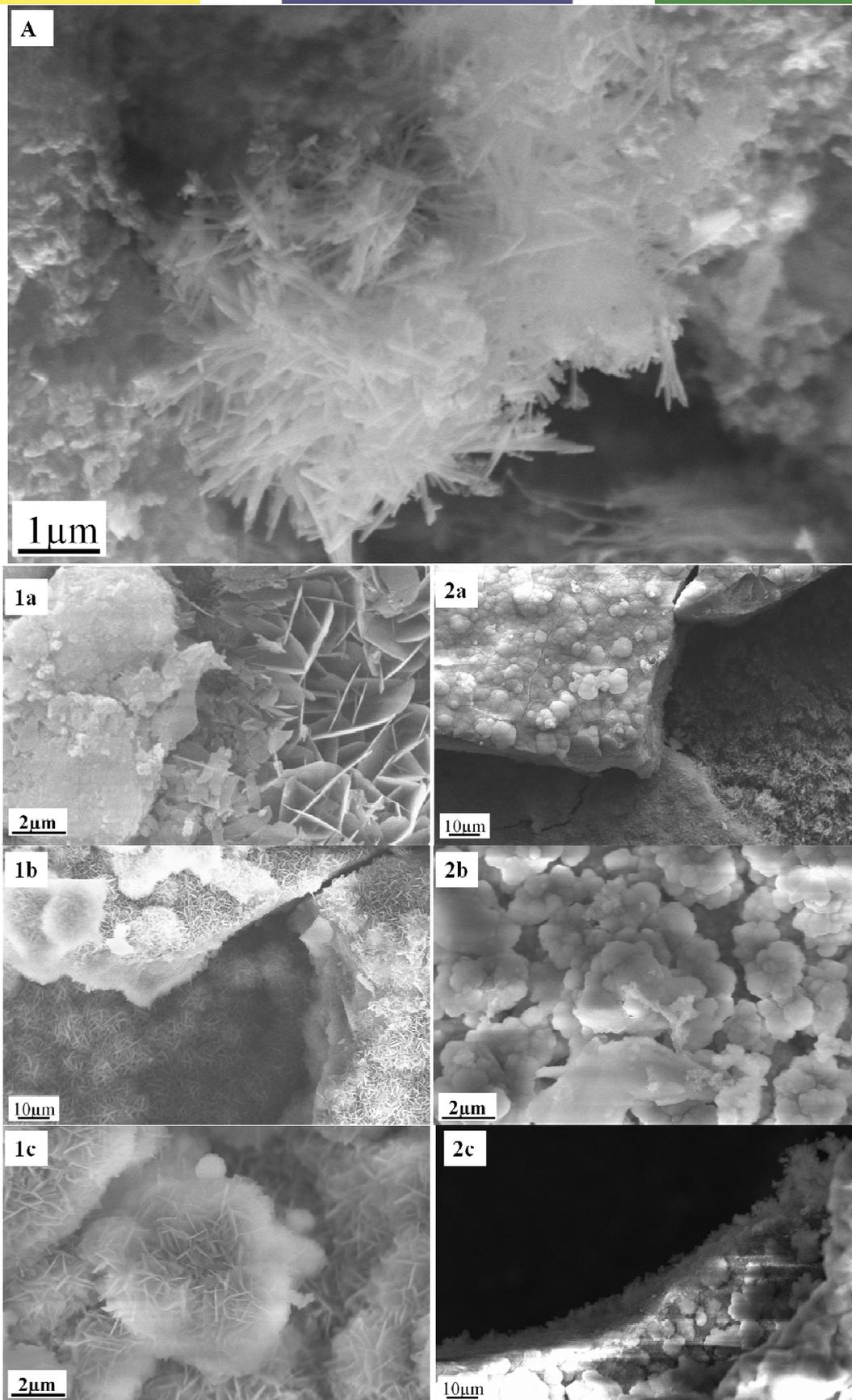


Figura 1- Imagem do MEV dos compósitos de HA/VACNT-O₂ (A), imersas por 7 dias (1a, 2a), 14 dias (1b, 2b) e 21 dias (1c, 2c) em SBF.

Tal processo de densificação, observado na Figura 1 (análise por MEV), de perfilometria (Figura 2) e na razão Ca/P calculada a partir do EDX (Figura 3) deve-se à saturação da densidade da camada inicialmente formada nos diferentes pHs. Com pH ácido tal saturação ocorre após 7 dias (Figura 1.1a), mantendo-se a deposição de nanoapatitas policristalinas idênticas durante todo o intervalo de tempo estudado (14 dias-Figura 1.1b e 21 dias-Figura 1.1c). Um resultado totalmente inverso é observado com o SBF ajustado para pH básico, onde durante todo o processo estudado não ocorre tal saturação, o que é favorável, tendo em vista que o plasma humano possui pH igual a 7,38, sendo considerado o processo de biomineralização *in vitro* aqui proposto similar ao que possivelmente ocorrerá *in vivo*.

Essas alterações morfológicas nas superfícies das amostras culminam nas diferenças encontradas nas análises de rugosidade (Figura 2, Tabela 2). Observa-se que não há o crescimento de uma camada uniforme na superfície das amostras, sendo observados tanto glóbulos quanto nanocristais de apatitas. Nas amostras submersas em pH 6,1, com morfologia cristalina, a rugosidade encontrada é superior à das amostras sob pH 7,4, de formação globular, devido à altura elevada dos cristais, quando comparadas à homogeneidade e densificação das nanoapatitas esferulíticas.

Nos resultados obtidos pela técnica de EDX (Figura 3) é possível verificar o perfil de distribuição dos elementos químicos cálcio e fósforo antes e após o processo de biomineralização em SBF. Observa-se que ocorrem alterações nas respectivas porcentagens em peso dos elementos químicos quando imersos nos diferentes pHs e tempos de incubação estudados (os dados não mostrados). Para as amostras imersas em SBF por 7, 14 e 21 dias, em ambos os pHs estudados, as análises por EDX confirmam (Figura 3) a bioatividade dos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂. Nota-se que as amostras de nHAp/VAMWCNT-O₂ que ficaram imersas em SBF com pH 7,40 e maiores tempos de imersão obteve a razão maior que as imersas em SBF com pH 6,10 e que ficaram imersas por períodos menores. A razão Ca/P em torno de 1,77 para as amostras imersas em SBF com pH 6,10, apresenta-se muito próxima à composição da camada correspondente à hidroxiapatita, com uma razão molar Ca/P igual a 1,67.

Conclusão

Mostra-se, pela primeira vez, o processo de biomineralização de nanocompósitos à base de nHAp/VAMWCNT-O₂ utilizando diferentes

metodologias de solução de SBF viabilizando seu uso como enxertos ósseos *in vivo*. Obtém-se a biomineralização dos nanocompósitos de nHAp/VAMWCNT-O₂ pela imersão em soluções de SBF em ambos os pHs estudados. Utilizando-se o pH 7,40 consegue-se uma maior densificação da camada de nanoapatita formada, sendo também possível observar um aumento gradativo da razão Ca/P no intervalo de 21 dias e por ser este pH próximo ao encontrado no plasma humano (pH 7,38), considera-se este nanocompósito como sendo bioativo.

Estes resultados são motivadores no aspecto científico, pois indicam a aplicabilidade desse novo biomaterial à base de nHAp/VAMWCNT-O₂ na medicina ósseo-regenerativa. Portanto, pretende-se, em trabalhos futuros, confirmar quais grupos deverão ser mais adequados ao reparo do tecido ósseo, através de ensaios *in vitro* com cultura de osteoblastos humanos, seguidos por ensaios *in vivo*, no que se refere ao pH (6,1 ou 7,4) e ao tempo de imersão (7, 14 ou 21 dias),.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2011/17877-7 e 2012/02159-4) e à Fundação Valeparaibana de Ensino - FVE pelo suporte financeiro e à técnica Priscila Leite pelas análises por MEV utilizadas neste trabalho.

Referências

- ADDADI, L.; WEINER, S.; GEVA, M. Z. On how proteins interact with crystals and their effect on crystal formation. *Kardiol.*, v. 90, suppl. 3, 2001.
- BARRERE, F. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. *Biomaterials*, v. 23, 2002.
- BARRERE, F. et al. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBFx5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials*, v. 23, 2002.
- BRUNSKI, J. B.; PULEO, D. A.; NANJI, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 1, 2000.
- ESCADA, A. L. Preparação de superfície bioativa na liga Ti-7,5Mo para uso em odontologia. Guaratinguetá/SP, 2009. 103f. Dissertação de Mestrado (Curso de Engenharia Mecânica - Área de Materiais) – Faculdade de Engenharia/ Universidade Estadual Paulista, 2009.

-HABIBOVIC, P. et al. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 85, n. 3, 2002.

-HEUER, H. et al. Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science*, v. 255, 1992.

-KOKUBO, T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Biomaterialis*, v. 46, n. 7, 1998.

-KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, v. 24, n. 13, 2003.

-KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, 2006.

-LOBO, A. O. et al. Cytocompatibility studies of vertically-aligned multi-walled carbon nanotubes: Raw material and functionalized by oxygen plasma. *Mater. Sci. Eng.*, 2010.

-LOBO, A. O. et al. Fast Preparation of Hydroxyapatite/Superhydrophilic Vertically Aligned Multiwalled Carbon Nanotube Composites for Bioactive Application. *Langmuir*, v. 26, 2010.

-MARSI, T. C. et al. Biomineralization of superhydrophilic vertically aligned carbon nanotubes. *Langmuir*, v. 28, n. 9, 2012.

-SOARES, L. E. S. et al. Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 2: energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Journal of Biomedical Optics*, v. 14, n. 2, 2009.

-TUNG, M. S. Calcium phosphate in biological and industrial system. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, MA, 1998.

-WEINER, S.; ADDADI, L. Design strategies in mineralized biological materials. *Mater. Chem.*, v. 7, 1997.