

Estabilidad de dispersiones de nanopartículas de hidroxiapatita en solución acuosa mediante tratamiento ultrasónico

Stability of hydroxyapatite nanoparticle dispersions in aqueous solution by ultrasonic treatment

A. J. Esteban-Gatica ^a, L. E. Chávez-Güitrón ^a, Joan Reyes-Miranda ^b, A. Garrido-Hernández ^b, G. García-Domínguez ^a

^a Universidad Tecnológica de Tecámac. Carretera Federal México0-Pachuca Km. 37.5 Predio Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. C.P. 55740.

México.

^b Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, Departamento de Materiales, Av. San Pablo 180, Col Reynosa - Tamaulipas Azcapotzalco, CP 02200, CDMX, México.

Resumen

La hidroxiapatita (HA) es un material biocerámico con propiedades destacadas de bioactividad y biocompatibilidad, lo que lo convierte en un candidato ideal para aplicaciones ortopédicas, como implantes y regeneración ósea. En este estudio, se investigaron las dispersiones de nanopartículas de HA en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL en agua. Los análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) confirmaron que no hubo cambios significativos en la estructura química de las nanopartículas antes y después de la dispersión. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron que las partículas mantuvieron su morfología y distribución homogénea tras el proceso de dispersión. Adicionalmente, el análisis por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) demostró que la concentración de 5 mg/mL presentó la mayor estabilidad coloidal, con una mínima tendencia a la formación de agregados. Estos resultados subrayan la importancia de seleccionar adecuadamente la concentración para optimizar la estabilidad y funcionalidad de las dispersiones de HA.

Palabras Clave: nanopartículas de hidroxiapatita, estabilidad coloidal; aplicaciones biomédicas; espectroscopia UV-Vis.

Abstract

Hydroxyapatite (HA) is a bioceramic material with outstanding bioactivity and biocompatibility, making it an ideal candidate for orthopedic applications such as implants and bone regeneration. In this study, dispersions of HA nanoparticles were investigated at concentrations of 0.5, 1.0, and 1.5 mg/mL in water. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis confirmed that there were no significant changes in the chemical structure of the nanoparticles before and after dispersion. Scanning electron microscopy (SEM) images showed that the particles maintained their morphology and homogeneous distribution after the dispersion process. Additionally, ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy analysis demonstrated that the 5 mg/mL concentration exhibited the greatest colloidal stability, with minimal aggregation tendency. These results underscore the importance of appropriately selecting the concentration to optimize the stability and functionality of HA dispersions in biomedical applications.

Keywords: hydroxyapatite nanoparticles, colloidal stability, biomedical applications, UV-Vis spectroscopy.

1. Introducción

La hidroxiapatita (HA) es un material biomimético que ha despertado un gran interés en el campo de la ciencia de materiales y la ingeniería biomédica debido a su excelente

biocompatibilidad y similitud estructural con la fase mineral del hueso (Martínez-Valencia *et al.*, 2008). Su fórmula química, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, similar a la composición del hueso le confiere una alta biocompatibilidad, esto ha permitido su uso en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas,

*Autor para la correspondencia: ggarcia@uttecamac.edu.mx

Correo electrónico: alondraesteban2003@gmail.com (Alondra Jacqueline Esteban-Gatica), lchavezg@uttecamac.edu.mx (Lorena Elizabeth Chávez-Güitrón), joremi@azc.uam.mx (Joan Reyes-Miranda), agh@azc.uam.mx (Aristeo Garrido-Hernández), ggarcia@uttecamac.edu.mx (Giovanni García Domínguez).

Historial del manuscrito: recibido el 09/09/2024, última versión-revisada recibida el 18/10/2024, aceptado el 07/11/2024, publicado el 12/12/2024. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v12iEspecial5.13686>

incluyendo la fabricación de cementos óseos (Dai *et al.*, 2021), recubrimientos para implantes ortopédicos (Arcos *et al.*, 2020), y vehículos de liberación de fármacos (Safi *et al.*, 2018). Estas aplicaciones son posibles gracias a su capacidad para integrarse de manera efectiva con los tejidos biológicos, favoreciendo la osteointegración y minimizando las respuestas adversas (Kavasi *et al.*, 2021).

Las nanopartículas de HA presentan características únicas, como un tamaño de partícula reducido y una alta relación superficie-volumen, lo que les confiere una mayor reactividad superficial y mejores propiedades bioactivas en comparación con las partículas de mayor tamaño (Balasooriya *et al.*, 2021). Sin embargo, uno de los desafíos más importantes en el uso de HA es lograr una dispersión estable en medios acuosos. La estabilidad de las dispersiones de HA es crucial para su eficacia en aplicaciones biomédicas, ya que las nanopartículas tienden a aglomerarse debido a las interacciones de Van der Waals y la reducción de la energía superficial libre (Munarin *et al.*, 2021). La aglomeración no solo disminuye la biodisponibilidad de las nanopartículas, sino que también puede afectar negativamente su funcionalidad. La alta reactividad superficial de las nanopartículas se traduce en una mayor bioactividad, lo que significa que las partículas pueden interactuar más eficazmente con el entorno biológico, facilitando procesos como la adsorción de proteínas, la adhesión celular y la proliferación de células osteogénicas. Esta característica es esencial para mejorar la eficiencia de las nanopartículas en aplicaciones como la liberación de fármacos o la ingeniería de tejido (Ardani *et al.*, 2022).

Se han explorado diversos métodos para mejorar la dispersión de las HA en solución acuosa, incluyendo la modificación de la superficie de las partículas mediante agentes estabilizantes y el control de las condiciones de síntesis, como el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Abidi *et al.*, 2014). En particular, el tratamiento ultrasónico ha demostrado ser una técnica efectiva para promover la desaglomeración de partículas y mejorar la estabilidad coloidal (Han *et al.*, 2009). El ultrasonido genera cavitación, lo que produce fuerzas de corte intensas que pueden romper los aglomerados de partículas y favorecer la dispersión homogénea de las HA en la solución.

Estudios previos han mostrado que la aplicación de ultrasonido no solo afecta la estabilidad de las dispersiones, sino que también influye en la morfología y la cristalinidad de las nanopartículas. Puede modificar las propiedades físico-químicas de las HA, reduciendo el tamaño de los cristalitos y disminuyendo su cristalinidad, lo cual es deseable para ciertas aplicaciones biomédicas donde se requiere un alto grado de biocompatibilidad y funcionalidad (Syazwan *et al.*, 2018).

El objetivo del presente estudio es evaluar la estabilidad de dispersiones acuosas de HA preparadas mediante tratamiento ultrasónico, a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL). Se busca establecer la relación entre los parámetros de ultrasonido y la estabilidad coloidal de las dispersiones, contribuyendo al desarrollo de metodologías optimizadas para la preparación de soluciones de HA con alta estabilidad y homogeneidad.

2. Metodología experimental

2.1. Tratamiento ultrasónico

Las partículas de HA usadas en esta investigación fueron obtenidas vía hidrotérmica bajo la metodología reportada por (Chávez Güitron *et al.*, 2022). El método de síntesis puede afectar significativamente el proceso de dispersión. Diferentes métodos de síntesis pueden dar lugar a variaciones en el tamaño, forma y propiedades superficiales de las partículas, lo que influye en su capacidad para dispersarse de manera uniforme en un medio. Factores como la aglomeración de partículas, la estabilidad de la dispersión y la interacción con el solvente también pueden depender del método utilizado para su síntesis.

Utilizando una pipeta estéril de 10 ml, se transfirieron 6 ml de agua estéril a cada uno de los tubos rotulados. A continuación, se pesaron los mg de polvo de HA correspondiente a cada muestra en una balanza analítica y se añadieron al tubo correspondiente. Después de agregar los polvos, las soluciones se homogeneizaron manualmente para asegurar una mezcla adecuada. Finalmente, los tubos se colocaron en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 25°C para facilitar la dispersión uniforme de las partículas de HA. El análisis del tiempo de ultrasonido se estudió por (Garrido Hernández *et al.*, 2022).

Se rotularon tres tubos con taparroscas para cada uno de los polvos de HA mencionados anteriormente, asignándoles las siguientes etiquetas; HA05 (concentración de 0.5 mg/mL), HA10 (concentración de 1 mg/mL) y HA15 (concentración de 1.5 mg/mL). Las concentraciones fueron seleccionadas en función de los valores reportados por (García *et al.*, 2022).

2.2. Técnicas de caracterización

Las muestras de HA se identificaron por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) en el modo de reflectancia total atenuada en un espectrofotómetro Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), para identificar los enlaces característicos del material. Los espectros se obtuvieron realizando un barrido en la región de 4000 a 500 cm^{-1} . La Difracción de Rayos X (DRX) para identificación de las fases cristalinas se registró a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker D8 Advance Eco (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) utilizando una radiación Cu K α de $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ en un intervalo de 2θ de 20° a 60° y un paso de 0.02°; la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se realizó con un equipo JOEL modelo JCM-6000 (Jeol Ltd Akishima, Tokio, Japón) operando bajo alto vacío y una baja tensión de aceleración de 10 kV para evidenciar la morfología de las partículas y para detectar aglomerados. El análisis UV-Vis se realizó en un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35.

2.3. Determinación de concentración por UV-vis

La concentración de la solución se calculó usando la absorbancia medida a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 minutos, a partir de la ecuación de Lambert-Beer;

Ecuación 1 Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Donde; C es la concentración, A es la absorbancia medida de la solución, ϵ es el coeficiente de absorción molar (también llamado coeficiente de extinción molar), que es una constante que depende de la sustancia y la longitud de onda de luz utilizada y b es la longitud de la celda a través de la cual pasa la luz (generalmente 1 cm).

3. Resultados y discusión

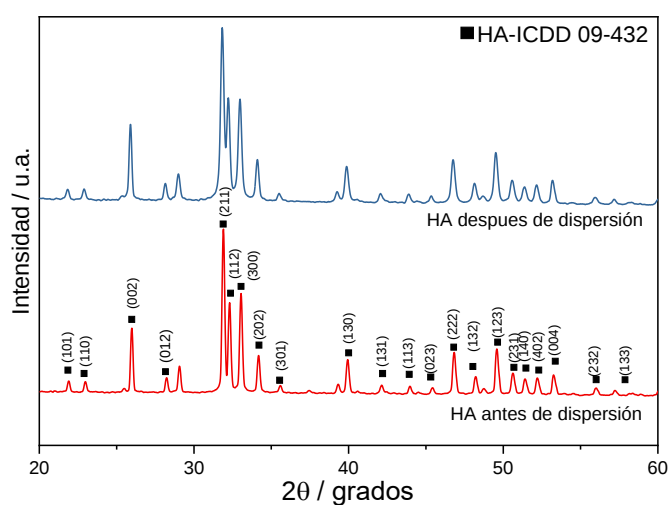


Figura 1. Difractograma de los polvos de HA antes y después de su dispersión.

En la figura 1, se observa el difractograma de los polvos de HA en fase hexagonal. Los picos más intensos se observan en posiciones $2\theta = 25.8^\circ, 31.8^\circ, 32.2^\circ, 34.1^\circ, 39.8^\circ$ y 46.7° , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (202), (130) y (222), respectivamente, según la referencia carta de difracción ICDD 09-432. La presencia de estos picos, junto con su intensidad y nitidez, confirma una alta cristalinidad de las muestras de HA tanto antes como después del proceso de dispersión. La ausencia de picos adicionales sugiere que no hay fases secundarias presentes, lo cual indica una pureza significativa del material. Esto es crucial para aplicaciones biomédicas, donde la pureza y la estabilidad cristalina de la hidroxiapatita son esenciales para garantizar su biocompatibilidad y funcionalidad.

La comparativa entre los patrones de difracción antes y después de la dispersión no muestra diferencias significativas. Este resultado es consistente con lo observado en otros estudios, como el de (Sadat-Shojai *et al.*, 2013), donde se destaca que el ultrasonido, cuando se aplica bajo condiciones controladas, no altera la estructura cristalina de nanopartículas de hidroxiapatita, preservando así sus propiedades intrínsecas. Este comportamiento de la estructura cristalina, incluso después de la dispersión, sugiere que el proceso utilizado en este estudio es eficaz para preparar dispersiones estables de

HA sin comprometer la calidad cristalina del material, lo que es clave para su uso en aplicaciones biomédicas avanzadas, como la regeneración ósea.

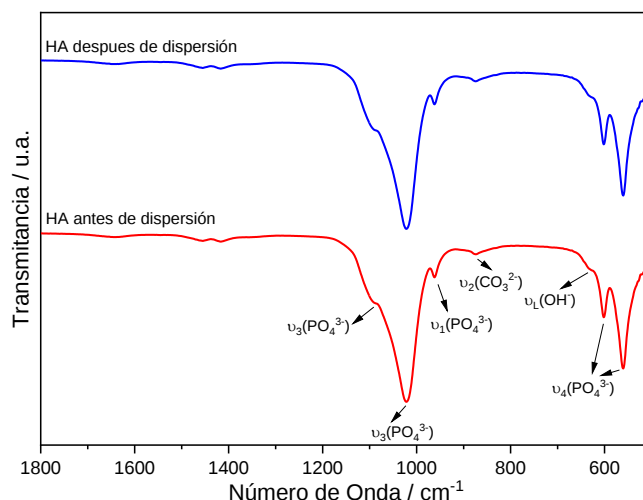


Figura 2. Espectros FT-IR de las muestras de HA antes y después de su dispersión.

La figura 2 muestra los espectros FT-IR de los polvos de hidroxiapatita antes y después de la dispersión en el rango de 1800 a 600 cm^{-1} . Los espectros revelan una alta similitud en la distribución de las bandas de absorción, sin cambios significativos en la posición o intensidad de las bandas características. Las bandas correspondientes a los grupos fosfato PO_4^{3-} (ubicadas en 1100, 650 y 570 cm^{-1}), carbonato CO_3^{2-} (en 870 cm^{-1}) e hidroxilo OH^- (en 660 cm^{-1}) se mantuvieron estables tanto en posición como en forma. Las bandas de transmitancia corresponden al comportamiento de un fosfato de calcio con relación Ca/P: 1.67, es decir hidroxiapatita. El valor de la relación calcio/fósforo es un factor clave en materiales como la hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio. Esta relación puede influir en varias propiedades del material, incluida su solubilidad. Al tratarse de partículas estequiométricas de HA la relación Ca/P es de 1.67. En cuanto a la solubilidad, sí, la relación Ca/P es un indicador importante.

Si el valor Ca/P es igual a 1.67, es indicativo de hidroxiapatita estequiométrica, que tiene una solubilidad relativamente baja y es similar al mineral del hueso. Un valor Ca/P menor a 1.67 puede sugerir una mayor solubilidad, lo que podría ser beneficioso en aplicaciones donde se busca una mayor biodisponibilidad o degradabilidad. Valores más altos de Ca/P (>1.67) pueden resultar en compuestos de fosfato de calcio menos solubles o más estables. Esta estabilidad en las bandas de absorción indica que la estructura molecular de los polvos de HA no fue alterada significativamente durante el proceso de dispersión por tratamiento ultrasónico. La ausencia de cambios notables en la posición y la intensidad de estas bandas sugiere que los polvos mantuvieron su integridad química y estructural, lo cual es fundamental para asegurar que las propiedades biológicas de la hidroxiapatita no se vean comprometidas durante su procesamiento. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos, como el de (Mondal *et al.* 2012), quienes reportaron que el tratamiento ultrasónico no afecta la estructura química de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) y mejora su dispersión, lo que es crucial para evitar la

aglomeración y preservar sus propiedades bioactivas. En su estudio, Mondal et al. verificaron este efecto mediante técnicas de caracterización como FTIR y DRX. De manera similar, en el presente trabajo hemos evaluado y demostrado que el tratamiento ultrasónico no altera la estructura química de nuestras nanopartículas. Al comparar nuestros resultados con los de (Mondal *et al.* 2012), observamos un comportamiento equivalente en cuanto al efecto del ultrasonido sobre la estructura química de las nanopartículas. Ambas investigaciones coinciden en que el ultrasonido es una técnica efectiva para mejorar la dispersión sin comprometer la composición química, lo cual es esencial para mantener las propiedades funcionales del material. De manera similar, (Sadat-Shojai *et al.*, 2013) también observaron que la estabilidad estructural de las HA es mantenida incluso tras la aplicación de métodos de síntesis y procesamiento intensivos, como el ultrasonido, lo que confirma la robustez de estas nanopartículas frente a tratamientos físicos.

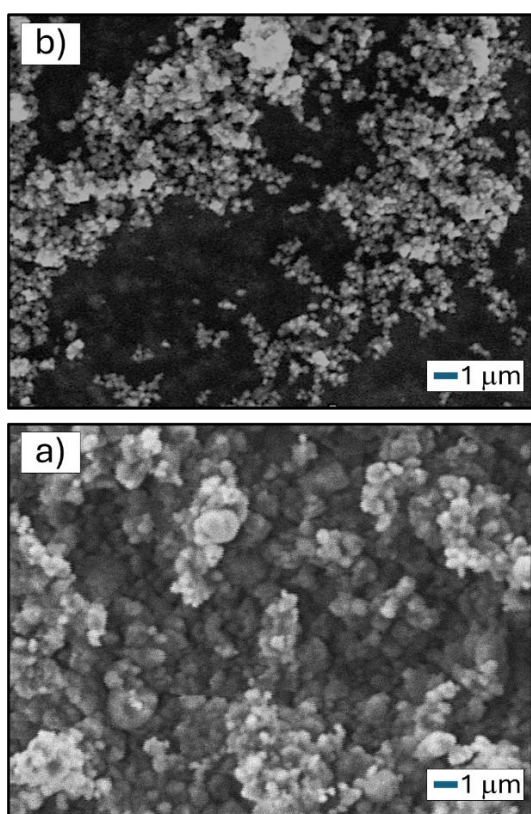


Figura 3. Micrografías por MEB de partículas de HA a) Antes de dispersión, b) después de dispersión.

La figura 3 muestra imágenes obtenidas mediante MEB de las nanopartículas de HA antes y después de la dispersión. El tamaño promedio de las partículas en las muestras, tanto tratadas como no tratadas, fue de $0.5803 \mu\text{m}$, con una desviación estándar de $\pm 0.133 \mu\text{m}$, lo que demuestra que no existió un cambio en el tamaño de partícula. Las micrografías revelan que las partículas se mantuvieron bien dispersas en el medio acuoso, sin evidenciar alteraciones significativas en su morfología ni en su tamaño tras el proceso de dispersión. Las partículas conservan su morfología y la distribución homogénea observada antes de la dispersión se mantiene en la muestra dispersa, lo cual es indicativo de una alta estabilidad

en el medio acuoso. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los análisis anteriores (DRX y FT-IR), donde se confirmó que la estructura cristalina y la composición química de la HA no se vieron afectadas por el tratamiento ultrasónico.

La estabilidad morfológica y estructural de las nanopartículas observada en este estudio está en concordancia con trabajos previos, como el de (Janković *et al.*, 2015), donde se demostró que las nanopartículas de hidroxiapatita mantuvieron su integridad estructural tras diversos tratamientos físicos, incluyendo la dispersión ultrasónica. La conservación de la morfología esférica y la distribución uniforme de las partículas son características deseables para aplicaciones en ingeniería de tejidos y en la administración de fármacos, donde la estabilidad y la uniformidad de las partículas juegan un papel crucial en su efectividad.

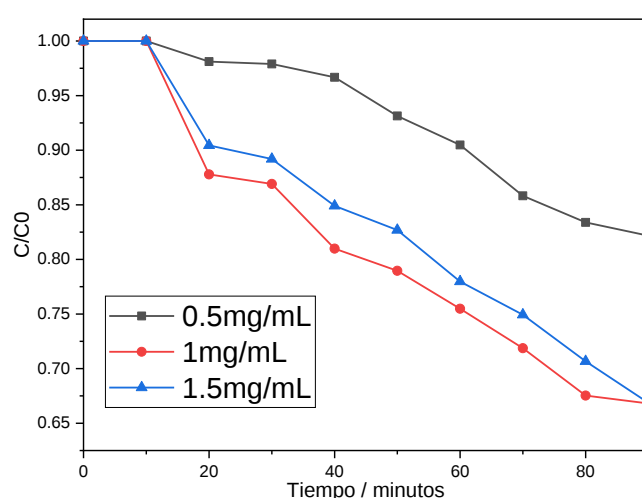


Figura 4. Concentración de los 3 diferentes experimentos de los polvos de HA con respecto al tiempo.

La figura 4 muestra la variación de la relación de concentración C/C_0 en función del tiempo para tres dispersiones acuosas de nanopartículas de HA a concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL. Los resultados evidencian que la dispersión con una concentración de 0.5 mg/mL presenta la mayor estabilidad a lo largo del tiempo, con una menor tasa de sedimentación en comparación con las otras dos concentraciones. Esto sugiere que, a concentraciones más bajas, las nanopartículas de hidroxiapatita tienden a permanecer mejor dispersas en el medio acuoso, lo que reduce la tendencia a la aglomeración y sedimentación. Este comportamiento puede atribuirse a la menor interacción entre las partículas en dispersiones más diluidas, lo que minimiza las fuerzas atractivas de Van der Waals y permite que las nanopartículas se mantengan en suspensión por más tiempo. En contraste, a concentraciones más altas (1.0 y 1.5 mg/mL), se observa un aumento en la tasa de sedimentación, probablemente debido a la mayor probabilidad de colisiones y aglomeración entre las partículas, lo que resulta en una menor estabilidad coloidal.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que indican que la estabilidad de las dispersiones de nanopartículas está fuertemente influenciada por la concentración de las partículas en el medio. (Liu *et al.*, 2018) demostraron que la estabilidad de las dispersiones de nanopartículas de hidroxiapatita disminuye con el aumento de la concentración

debido al incremento en la interacción entre partículas y la formación de agregados más grandes, lo que acelera la sedimentación. Además, trabajos realizados por (Kim *et al.*, 2020) también confirmaron que las concentraciones más bajas de nanopartículas resultan en una dispersión más homogénea y estable en medios acuosos, lo que coincide con los hallazgos de este estudio.

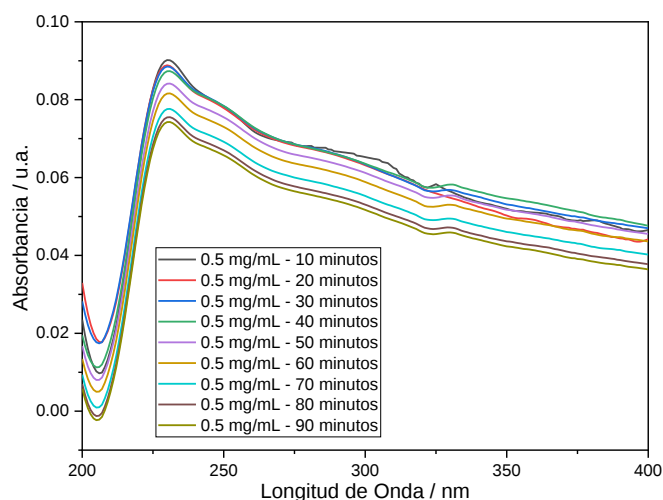


Figura 5. Espectros UV-Vis del polvo HA05 de concentración 0.5 mg/mL hasta los 90 minutos.

El análisis del espectro UV-Vis de la solución con una concentración de 0.5 mg/mL, que se presenta en la figura 5, revela una estabilidad coloidal excepcional en el rango de 200 a 400 nm. A lo largo de los 90 minutos de observación, la absorbancia se mantuvo constante, sin cambios significativos en la forma del espectro. Este comportamiento indica que las nanopartículas de HA en esta concentración permanecieron bien dispersas y no experimentaron aglomeración ni sedimentación durante el periodo de estudio.

La estabilidad observada en el espectro UV-Vis sugiere que las partículas de HA en la solución mantuvieron su tamaño y distribución de manera consistente, lo que es fundamental para aplicaciones biomédicas donde la homogeneidad y la estabilidad coloidal son críticas. Comparando estos resultados con estudios previos, (Kim *et al.*, 2020) indicaron que la estabilidad de las nanopartículas en suspensión es esencial para mantener su funcionalidad en aplicaciones de remineralización del esmalte dental, lo que concuerda con la alta estabilidad coloidal observada a 0.5 mg/mL.

4. Conclusiones

El presente estudio ha demostrado que las nanopartículas de HA mantienen su integridad estructural, química y morfológica tras ser sometidas a un tratamiento de dispersión ultrasónica en medio acuoso. Los análisis de difracción de rayos X confirmaron que la estructura cristalina de la HA se mantuvo estable, sin la aparición de fases secundarias, lo cual indica una alta pureza y cristalinidad de las muestras. De manera similar, los espectros FT-IR mostraron que no hubo cambios significativos en la posición o intensidad de las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales principales, lo que sugiere que la composición química de las

nanopartículas no se vio alterada. El análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido reveló que las nanopartículas conservaron su morfología esférica y una distribución homogénea tanto antes como después de la dispersión, lo cual es crucial para asegurar su efectividad en aplicaciones biomédicas. La estabilidad coloidal observada en los estudios UV-Vis respaldó estos hallazgos, indicando que las partículas de HA a una concentración de 0.5 mg/mL presentan una estabilidad óptima en suspensión, con una mínima sedimentación y aglomeración. Estos hallazgos confirman que el tratamiento ultrasónico es una técnica efectiva para preparar dispersiones estables de HA sin comprometer sus propiedades intrínsecas, lo que es esencial para su uso en aplicaciones avanzadas de regeneración ósea y otros campos biomédicos.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por la Universidad Tecnológica de Tecámac. Los autores agradecen al CCAI-UTTEC el uso de las instalaciones y los análisis de caracterización.

Referencias

- Abidi, S. S. A., & Murtaza, Q. (2014). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science & Technology*, 30(4), 307-310. doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011
- Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2020). Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(9), 1781-1800. doi.org/10.1039/C9TB02710F
- Ardani, I. G. A. W., Nugraha, A. P., Suryani, M. N., Pamungkas, R. H., Vitamamy, D. G., Susanto, R. A., ... & Putera, A. (2022). Molecular docking of polyether ether ketone and nano-hydroxyapatite as biomaterial candidates for orthodontic mini-implant fabrication. *J Pharm Pharmacogn Res*, 10(4), 676-686. doi.org/10.56499/jppres22.1371.10.4.676
- Balasoorya, I. L., Chen, J., Korale Gedara, S. M., Han, Y., & Wickramaratne, M. N. (2022). Applications of nano hydroxyapatite as adsorbents: A review. *Nanomaterials*, 12(14), 2324. doi.org/10.3390/nano12142324
- Chávez-Güitrón, L. E., Garrido-Hernández, A., del Carmen Salinas-Pérez, F., & García-Domínguez, G. (2022). Evaluación in vitro de hemocompatibilidad en HA sintetizada hidrotermalmente. *Pădi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(Especial7), 139-144. doi.org/10.29057/icbi.v10iEspecial7.9964
- Dai, J., Fu, Y., Chen, D., & Sun, Z. (2021). A novel and injectable strontium-containing hydroxyapatite bone cement for bone substitution: A systematic evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 124, 112052. doi.org/10.1016/j.msec.2021.112052
- García Domínguez, G., Diaz De La Torre, S., Chávez Güitrón, L., Vergara Hernández, E., Reyes Miranda, J., Quezada Cruz, M., & Garrido Hernández, A. (2021). Effect of the Structural and Morphological Properties of Surfactant-Assisted Hydroxyapatite on Dermal Irritation and Antibacterial Activity. *Materials*, 14(21), 6522. doi.org/10.3390/ma14216522
- Garrido-Hernández, A., García-Domínguez, G., Reyes-Miranda, J., Camacho-González, M. A., Chávez-Güitrón, L., & Castillo-Minjárez, J. M. (2022). Evaluación de la citotoxicidad de fosfatos de calcio sintetizados a diferentes relaciones molares de ca/p por la vía hidrotermal. *Pădi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(Especial7), 183-188. doi.org/10.29057/icbi.v10iEspecial7.9957
- Han, Y., Wang, X., & Li, S. (2009). A simple route to prepare stable hydroxyapatite nanoparticles suspension. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1235-1240. doi.org/10.1007/s11051-008-9507-8
- Janković, A., Eraković, S., Mitrić, M., Matic, I.Z., Juranic, Z.D., Tsui, G.C.P., Tang, C.Y., Mišković-Stanković, V., & Rhee, K.Y. (2015). Bioactive hydroxyapatite/graphene composite coating and its corrosion

- stability in simulated body fluid. *Journal of Alloys and Compounds*, 624, 148-157. doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.11.078
- Kavasi, R. M., Coelho, C. C., Platania, V., Quadros, P. A., & Chatzinikolaïdou, M. (2021). In vitro biocompatibility assessment of nano-hydroxyapatite. *Nanomaterials*, 11(5), 1152. doi.org/10.3390/nano11051152
- Kim, et al. (2020). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and their effects on remineralization of demineralized enamel in the presence of Er,Cr laser irradiation. *BMC Oral Health*, 20(1), 104. doi.org/10.1186/s12903-023-03549-z
- Liu, Y., Zhang, Y.Y., Li, S., et al. (2018). Development of novel biocomposite scaffold of chitosan-gelatin/nano hydroxyapatite for potential bone tissue engineering applications. *Nanoscale Research Letters*, 11(11), 487-493. doi.org/10.1186/s11671-016-1669-1
- Martínez-Valencia, A.B., Esparza-Ponce, H.E., Carbajal-De la Torre, G., & Ortiz-Landeros, J. (2008). Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y vacío*, 21(4), 18-21. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-35212008000400004&lng=es&tlng=es.
- Mondal, S., Bardhan, R., Mondal, B., Dey, A., Mukhopadhyay, S.S., Roy, S., Guha, R., & Roy, K. (2012). Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity assessment of hydroxyapatite from different bioresources for tissue engineering application. *Bulletin of Materials Science*, 35(5), 683-691. doi.org/10.1007/s12034-012-0346-y
- Munarin, F., Petrini, P., Gentilini, R., Pillai, R. S., Dirè, S., Tanzi, M. C., & Sglavo, V. M. (2015). Micro-and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. *International journal of biological macromolecules*, 72, 199-209. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.050
- Safi, S., Karimzadeh, F., & Labbaf, S. (2018). Mesoporous and hollow hydroxyapatite nanostructured particles as a drug delivery vehicle for the local release of ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 712-719. doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.004
- Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591-7621. doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012
- Syazwan, M. M., Ahmad-Fauzi, M. N., & Marlina, B. Y. (2018, August). Co-Sr doped carbonated hydroxyapatite: A biomaterial with enhanced mechanical and bioactivity properties. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1082, No. 1, p. 012076). IOP Publishing. doi.org/10.1088/1742-6596/1082/1/012076