







Evaluación de la citotoxicidad de fosfatos de calcio sintetizados a diferentes relaciones molares de ca/p por la vía hidrotermal Cytotoxicity evaluation of calcium phosphates synthesized at different molar ratios of ca/p by the hydrothermal route

G. García Domínguez ^a, J. Reyes Miranda ^b, M. A. Camacho-González ^a, L. E. Chávez-Güitrón ^a, J. M. Castillo-Minjarez ^a, A. Garrido Hernández ^{a*}

^a Universidad Tecnológica de Tecámac. Carretera Federal México-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

En el presente estudio, se sintetizaron polvos de fosfato de calcio vía hidrotermal con relaciones molares Ca/P de 1.5, 1.67 y 2.0. La cristalinidad y fase se determinaron mediante análisis de difracción de rayos X, la formación de los fosfatos de calcio se evidenció mediante la espectrofotometría de infrarrojo. La estabilidad térmica medida por análisis termogravimétrico demostró que la muestra con relación molar Ca/P: 1.67 (hidroxiapatita) es más estable. La morfología de los polvos se observó mediante microscopía electrónica de barrido. Los estudios de citotoxicidad con la línea celular NIH-3T3 de fibroblastos de ratón en concentraciones de 10 mg/ml, indicaron que los polvos obtenidos con diferentes relaciones Ca/P son citocompatibles.

Palabras Clave: hidroxiapatita, hidrotermal, citotoxicidad

Abstract

In the present study, calcium phosphate powders were synthesized hydrothermally with Ca/P molar ratios of 1.5, 1.67, and 2.0. The crystallinity and phase were determined by X-ray diffraction analysis, and the formation of calcium phosphates was evidenced by infrared spectrophotometry. Thermal stability measured by thermogravimetric analysis showed that the sample with Ca/P molar ratio: 1.67 (hydroxyapatite) is more stable. The morphology of the powders was observed by scanning electron microscopy. Cytotoxicity studies with the NIH-3T3 cell line of mouse fibroblasts at concentrations of 10 mg/ml indicated that the powders obtained with different Ca/P ratios are cytocompatible.

Keywords: hydroxyapatite, hydrothermal, cytotoxicity.

1. Introducción

Las partículas cerámicas de fosfato de calcio (CaP) han demostrado tener interesantes propiedades para su aplicación en distintas áreas, especialmente en la ingeniería de tejidos (Prakash *et al.*, 2009) debido a la similitud de su composición con el hueso natural y alta biocompatibilidad con los tejidos vivos, además de presentar bioafinidad y osteoconducción. (Mobasherpour., *et.al.* 2007) La aplicación de CaP como

material poroso o granular es útil en la cirugía ósea o en el recubrimiento de implantes metálicos. (Prakasam *et al.*, 2017). Dentro de los cerámicos de CaP, la hidroxiapatita es uno de los materiales más utilizados en diversas aplicaciones biomédicas, incluida la reconstrucción ósea. (Malhotra & Habibovic, 2016), (Liu *et al.*, 2008).

Se ha demostrado los materiales de CaP tienen el potencial de reparar defectos postquirúrgicos de tamaño crítico al

*Autor para la correspondencia: agarridoh@uttecamac.edu.mx; ari_teogh@hotmail.com

Correo electrónico: garciajiovanni1311@gmail.com (Giovanni García Domínguez), joremi@azc.uam.mx (Joan Reyes Miranda), ibqmony@gmail.com (Mónica Aracely Camacho González), Ichavezg@uttecamac.edu.mx (Lorena Elizabeth Chávez Güitrón), jcastillom@uttecamac.edu.mx (José Miguel Castillo Minjarez), ari_teogh@hotmail.com (Aristeo Garrido Hernández)

Historial del manuscrito: recibido el 05/10/2022, última versión-revisada recibida el 26/11/2022, aceptado el 28/11/2022, publicado el 12/12/2022. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v10iEspecial7.9957>

proporcionar un entorno físico y químico para la formación de hueso nuevo. (Roy *et al.*, 2012), (Boanini, *et al.* 2006).

Teniendo en cuenta las amplias propiedades de estos compuestos, varias investigaciones han centrado su atención en el desarrollo de diferentes métodos para su síntesis que controlen la relación molar calcio/fósforo con el propósito de satisfacer necesidades biológicas específicas. Por ejemplo, la hidroxiapatita (HAP) con una relación de Ca/P de 1.67, fórmula química $(Ca_5(PO_4)_3OH)$ se utiliza ampliamente como material de injerto óseo o como revestimientos sobre metales, aleaciones metálicas o polímeros para mejorar el crecimiento del hueso en implantes ortopédicos. (Auclair-Daigle *et al.*, 2005), (Habibovic, P. *et al.* 2002). La hidroxiapatita cristaliza en la fase hexagonal y monoclinica siendo la más estable la primera estructura. El fosfato tricálcico (TCP) con una relación Ca/P de 1.5, fórmula química $(Ca_3(PO_4)_2)$ se ha estudiado como agente de administración de fármacos (Wei, *et al.*, 2018), (Kundu *et al.*, 2010) o cementos inyectables. (Sariabrahmoglu *et al.*, 2014). El fosfato tetracálcico (TTCP) con una relación Ca/P= 2 es el más básico de los fosfatos de calcio, con fórmula química $(Ca_4(PO_4)_2O)$ se utiliza como un componente de algunos cementos de fosfato cálcico que tienen aplicaciones médicas, tiene una estructura cristalina monoclinica y presenta estrechas similitudes con la hidroxiapatita.

El poder controlar la relación molar Ca/P de los fosfatos cálcicos permite favorecer su biodegradabilidad, y modificar su estabilidad; como resultado, se incrementa el número de aplicaciones. Si se requiere su empleo en aplicaciones clínicas (Motskin *et al.*, 2009) es necesario realizar una evaluación de su citotoxicidad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la citotoxicidad de polvos de fosfatos de calcio con relaciones molares de Ca/P =1.5, 1.67 y 2.0 sintetizados por el método hidrotermal.

2. Metodología experimental

2.1. Síntesis de partículas

La síntesis de los polvos de CaP con diferentes relaciones molares (Ca/P= 1.5, 1.67 y 2.0) se realizó por el método hidrotermal. Primero, se disolvieron por separado el nitrato de calcio tetra-hidratado $(Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O)$, Mallinckrodt 99%) y el hidrógenofosfato de amonio $((NH_4)_2HPO_4)$, Baker Analyzed 98.7%) en agua destilada. La solución de nitrato de calcio se añadió gota a gota (~1 ml/min) en la solución de fosfato de amonio que fue agitada continuamente a 700 rpm, produciendo un precipitado blanco.

La relación molar de la mezcla de $Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ y $(NH_4)_2HPO_4$ se ajustó de acuerdo con las relaciones Ca/P deseadas (1.5, 1.67 y 2.0) en la solución de fosfatos de calcio, manteniendo constante la molaridad de la solución de fósforo. El valor del pH se ajustó a 11 añadiendo gotas de una solución de NaOH al 1.5 M. La mezcla de los precursores se agitó a 700 rpm, se calentó a 60 °C durante 30 min. La suspensión se introdujo en un recipiente de teflón herméticamente cerrado y se calentó a 200 °C en una estufa durante 15 h. El precipitado obtenido se lavó tres veces con agua desionizada utilizando una centrifuga

a 8000 rpm por 15 min, finalmente los polvos lavados se secaron a 120 °C durante 8 h.

2.2. Técnicas de caracterización

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) se realizó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum Two. El espectro se registró en 32 barridos en el rango de 4000-500 cm^{-1} . La identificación de las fases cristalinas de los polvos se llevó a cabo mediante difracción de rayos X (DRX) a temperatura ambiente utilizando un difractómetro BRUKER D8 ADVANCE ECO con radiación $Cu K\alpha$ incidente ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$), en el rango 2θ de 10 a 60°. Las características morfológicas de los polvos se investigaron con un microscopio electrónico de barrido JOEL modelo JSM-6000 en alto vacío y con una tensión de aceleración de 5 kV. Las pruebas de estabilidad térmica se realizaron mediante análisis termogravimétrico utilizando un kit TA instruments modelo SDT Q600 de 25 a 1000°C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min.

2.3. Pruebas de citocompatibilidad *in vitro*

Se preparó una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio, un tetrazol) dispersando 10 mg de la muestra en 10 ml de solución equilibrada de Hank. La línea celular utilizada (1×10^5 células/ml de fibroblastos de ratón NIH-3T3) se mantuvo en una placa de 96 pocillos que contenía MEM (medio esencial mínimo) complementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS), que contenía 5% de mezcla de gentamicina, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 g/ml) en presencia de 5% de CO_2 , a 37 °C, durante 3-4 días. El efecto de inhibición del crecimiento *in vitro* del compuesto de prueba se evaluó mediante la determinación espectrofotométrica de la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-definitetrazolio (MTT) a "azul de formazan" por las células vivas. Se retiró el líquido sobrenadante de la placa y se añadió solución salina equilibrada de Hank fresca y se trató con diferentes concentraciones de extracto, debidamente diluidas con DMSO (dimetilsulfóxido) que se utilizó como control en este ensayo. Tras 24 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 , el medio se sustituyó por la solución de fosfato de calcio a una concentración de 10 mg/ml para otras 96 horas de incubación. Se formó un precipitado, entonces el líquido sobrenadante se aspiró cuidadosamente, los cristales precipitados se solubilizaron añadiendo 20 μL de DMSO y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm a las 12, 24, 48, 72, 84 y 96 horas de incubación. La tasa relativa de células (RGR %) se estimó mediante (1).

$$RGR (\%) = \frac{DO \text{ media del compuesto}}{DO \text{ media del control}} \times 100 \quad (1)$$

Los valores de RGR% se clasificaron a partir de los valores de densidad óptica (DO) o absorbancia de acuerdo con la norma china GB/T 16886.5-2003, 0 y 1 representan la ausencia de citotoxicidad, mientras que 2, 3, 4 y 5 representan diferentes niveles de citotoxicidad. Se ha reportado que para $RGR\% \geq 100$ el nivel de citotoxicidad es 0, para $99 \geq RGR\% \geq 75$ es 1; $74 \geq$

RGR% ≥ 50 es 2, $49 \geq$ RGR% ≥ 25 es 3, $24 \geq$ RGR% ≥ 1 es 4, y RGR% = 0 es 5 (Wei et al., 2019).

3. Resultados y discusión

El análisis de la fase cristalina de los polvos sintetizados se realizó mediante estudios de difracción de rayos X. La Figura 1 muestra el patrón de difracción de los polvos de CaP, se observa que las relaciones molares de la síntesis forman tres compuestos; fosfato tricálcico, hidroxiapatita y fosfato tetracálcico los cuales fueron totalmente identificadas con las cartas ICDD (Centro Internacional de Datos de Difracción) 029-0359, 009-0432 y 025-1137 respectivamente.

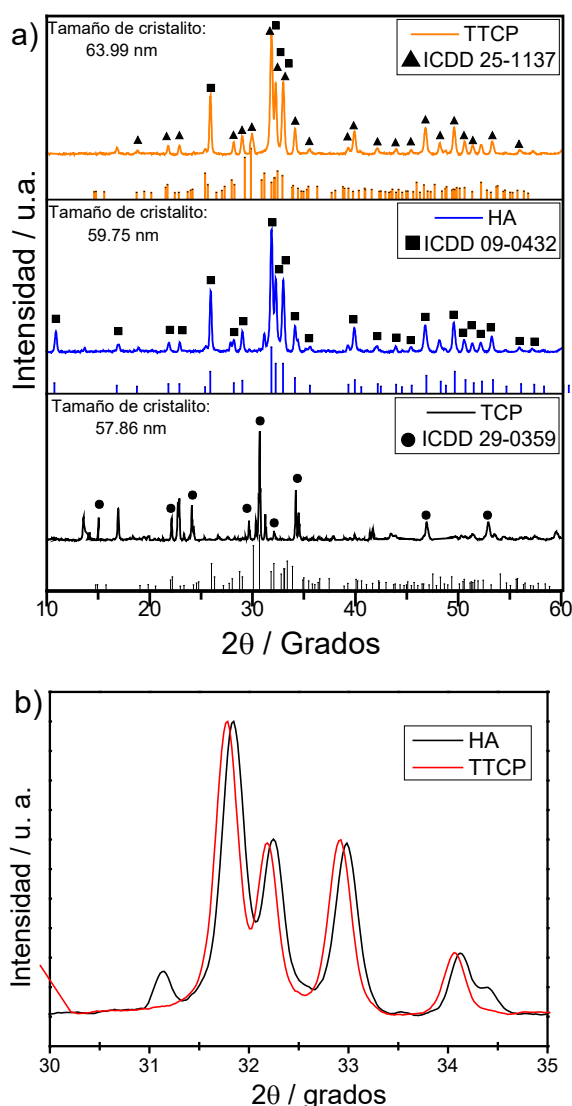


Figura 1: Patrón de DRX de los polvos de TCP, HA y TTCP b) desplazamiento de los picos de difracción.

Todos los picos de difracción para los polvos sintetizados usando la relación Ca/P = 1.5, 1.67 y 2 mostraron picos definidos lo cual sugiere una buena cristalización.

El tamaño de cristalito de la red se calculó con el programa HighScore Plus. Este programa se basa en el método Warren-Averbach, que se establece mediante la ecuación de Scherrer:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos\theta} \quad (2)$$

donde L es el tamaño medio de los cristalitos, β_m la anchura total del pico a la mitad del máximo de la intensidad, λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X (1.54178 Å), K es la constante relacionada con la forma del cristalito (0.9). los valores del tamaño de cristalita mayores de 57 nm confirma esta observación, ya que polvos mejor cristalizados están asociados a un gran tamaño de cristalito.

El patrón de difracción del TTCP, muestra la presencia de la triada de picos característicos de la HA (211), (112) y (300) entre $2\theta = 30-35^\circ$. Estos picos se traslapan con la fase monoclinica (simetría P21/b grupo espacial 14) del TTCP localizados a 31.8° , 32.37° y 32.8° que corresponden a los planos (221), ($\bar{2}$ 12) y (212), respectivamente. La figura 1b muestra un corrimiento en las posiciones 2θ esto confirma la presencia de las fase monoclinica y hexagonal de HA. Los picos localizados a $2\theta = 28.3$, 29.3 , 29.8° , correspondientes a los planos (211), (032), (040) se asocian a la fase monoclinica del TTCP (Mondal et al., 2012).

El patrón de difracción de la muestra de HA, revela una única fase correspondiente a una estructura hexagonal cristalina. Se observa una diferencia en intensidades de los picos principales, especialmente para los planos (002) y (211) en comparativa con la muestra TTCP que demostró tener picos de difracción similares a la HA. Para la síntesis con relación Ca/P = 1.5 se observan los picos de difracción asociados al TCP, existen impurezas asociados a las condiciones de síntesis. Para aislar las estructuras cristalinas de TCP y TTCP se debe realizar cambios en temperatura y tiempo de reacción.

La Figura 2 revela las bandas de absorción características de los compuestos de CaP siendo evidente la banda situada alrededor de $1000-1100 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al modo de vibración de estiramiento asimétrico para el grupo PO_4^{3-} (Rocha et al., 2005).

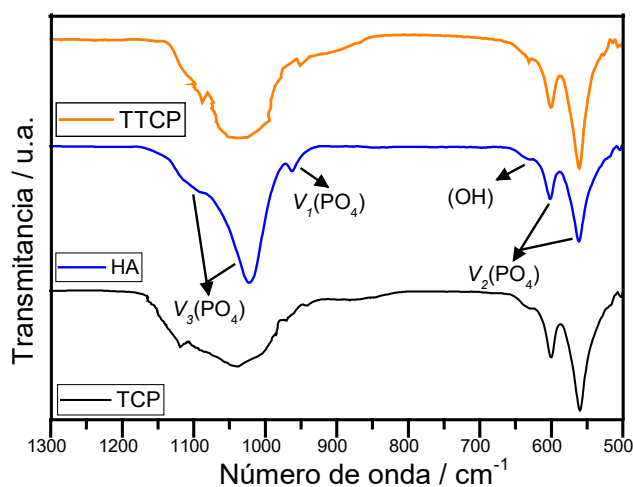


Figura 2: Espectro FTIR de los polvos de TCP, HA y TTCP sintetizados vía hidrotermal

La banda a 565 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento P-O simétrica del grupo PO_4^{3-} . Todos los espectros mostrados dan lugar a las bandas de absorción características de las apatitas. La banda localizada alrededor de 630 cm^{-1} , que es

atribuido al modo vibracional de los grupos OH de la hidroxiapatita. Por lo cual, todos los CaP contiene una pequeña presencia de HA tal como se mostró en los resultados de DRX.

Los análisis termogravimétricos de los polvos de CaP se muestran en la Figura 3. Cuando se emplean métodos de síntesis por vía húmedo suelen estar presentes especies relacionadas a los precursores y las soluciones ajustadoras de pH por lo cual un análisis termogravimétrico es una técnica que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias sometiendo a una temperatura elevada, evaluando los cambios en la masa con respecto al cambio de temperatura. Las pérdidas de peso que se muestran principalmente ocurren en tres pasos, la primera pérdida se debe al agua débilmente atrapada en el material de la muestra, la segunda y tercera pérdida se deben a la descomposición y la liberación de los componentes contaminantes. En los termogramas se aprecia una disminución de peso con una pendiente característica hasta 300 °C; se observa una pérdida de peso de 2.24, 2.40 y 3.10% para los polvos de TCP, HA y TTCP, respectivamente, debido a la eliminación del agua adsorbida, débilmente ligada. En el intervalo de 300–700 °C, se lleva a cabo la descomposición del HPO_2^{4-} , las pérdidas fueron del 3.55% para las muestras TCP y HA, y del 5.26% para la muestra TTCP. En el rango de 700–1100 °C, la pérdida de peso se debió a la descomposición del $\text{P}_2\text{O}_4^{4-}$.

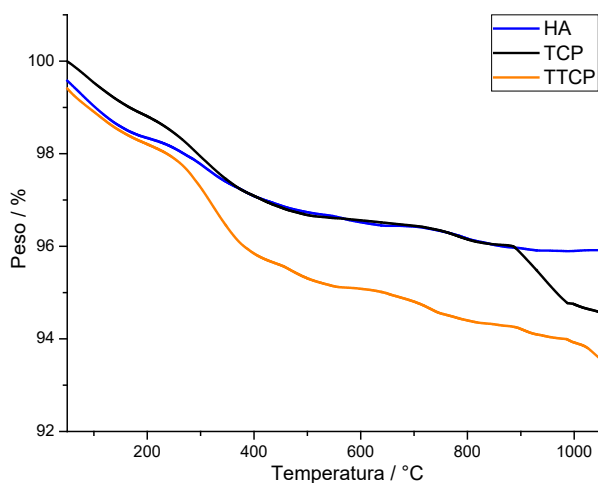


Figura 3 Análisis termogravimétrico de los polvos de TCP, HA y TTCP sintetizados vía hidrotermal

La muestra TCP tiene una marcada pérdida de peso a 900 °C, para TTCP a 1000 °C, mientras que los polvos de HA mostraron un peso constante después los 900 °C (Ozawa, M., & Suzuki, S. 2002). Con esta técnica se demostró que los tres polvos tienen un comportamiento muy similar en la pérdida de peso hasta 300 °C, derivados a el agua adsorbida; las diferencias entre estas se derivan a la naturaleza de las condiciones de síntesis. Por lo cual, se espera que se mantengan las propiedades de los polvos ya que está pérdida de masa solo se le asocia a un proceso físico.

La Figura 4 muestra las micrografías de electrónica de barrido de los compuestos de CaP. Se observan partículas con morfología no homogénea aglomerados. La micrografía revela que la HA tiene menor aglomeración en comparación del TTCP y TCP.

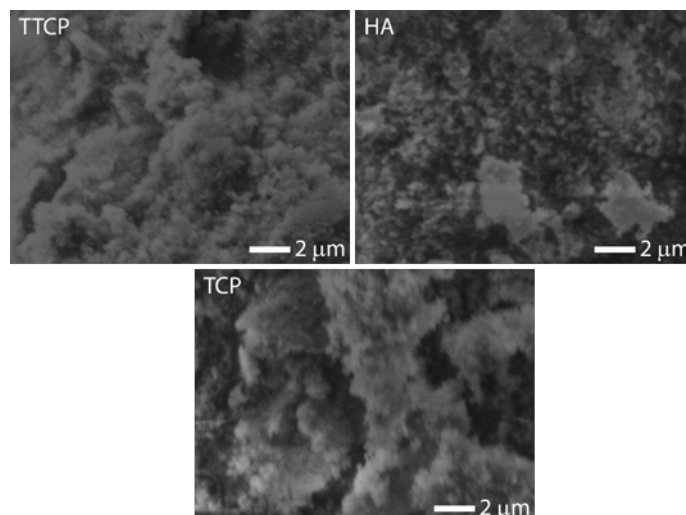


Figura 4: Micrografías por MEB de los polvos de TCP, HA y TTCP sintetizados vía hidrotermal

Para realizar el estudio de citotoxicidad se prepararon suspensiones a concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg/ml de polvos de los polvos de CaP. La solubilidad de los cerámicos en agua es muy baja por lo cual se obtienen suspensiones que tienden a precipitar con el tiempo. Por lo cual fue importante determinar la concentración de los polvos en un cierto tiempo; en la Figura 5 se describe el comportamiento de la sedimentación a través del tiempo se aprecia que la suspensión de los polvos a 10 mg/ml presentó una curva de sedimentación más lenta, es decir, la suspensión es más estable comparada con las otras concentraciones. Por lo tanto, para el análisis de citotoxicidad, se eligió una concentración de 10 mg/ml. Esta concentración se puede comprar con otras concentraciones reportadas por Mondal *et al.*, 2016 quienes evaluó la viabilidad celular utilizando una concentración de 0.1 mg/ml, obteniendo una alta bioactividad y no toxicidad de las nanopartículas. Por otra parte, Shitara *et al.*, 2014 utilizaron una concentración de 1 mg/ml en las dispersiones de polvo de HA. Demostró un RGR de hasta el 98% atribuyendo la alta viabilidad a la estabilidad de la dispersión a diferentes concentraciones y al tratamiento térmico que tenía cada muestra, al dar tratamiento térmico las partículas se volvían más cristalinas y estables químicamente, permitiendo una mejor dispersión.

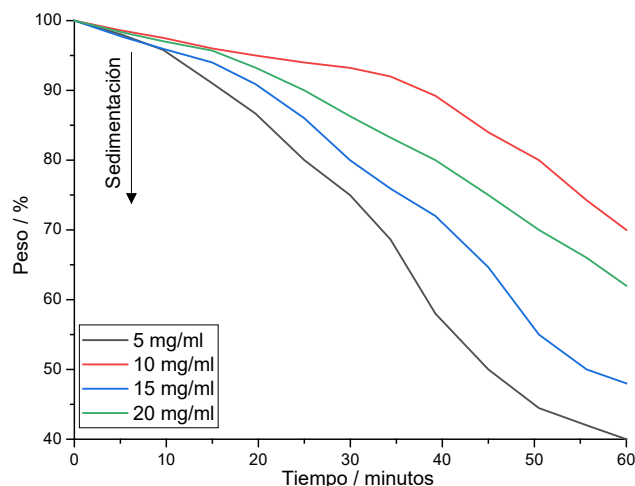


Figura 5: Sedimentación de partículas de HA

Una forma directa de relacionar la citotoxicidad en compuestos de fosfatos de calcio es la viabilidad de los osteoblastos al respecto Liu *et al.* (2008), en pruebas *in vitro*, demostraron que la relación Ca/P influye en la viabilidad de los osteoblastos de hecho también demostraron que las fases secundarias como el CaO promueven la variación de osteoblastos. Por lo tanto, en este trabajo se observa que los valores de la citotoxicidad están directamente relacionada la relación Ca/P, se observaron valores más a los RGR% a mayor relación Ca/P, este valor puede ser influenciado también por las mezclas de fases que se evidenciaron en los resultados de difracción de rayos X (figura 1). De forma similar, en los resultados obtenidos durante este trabajo, la relación molar 1.5 (TCP), presentó una tasa relativa de células más alta en comparación con la muestra de la relación molar Ca/P igual a 2. Asimismo, el porcentaje de células viables que se determinó a partir del valor de absorbancia (DO) de los ensayos con MTT (Tabla 1), indicó que el rango de citotoxicidad de 1 para todas las muestras, ya que se obtuvo un rango de citotoxicidad de 1 para todas las muestras por lo cual no existió daño celular

Tabla 1: Absorbancia promedio, tasa relativa celular y rango de citotoxicidad de las muestras de CaP de concentración 10 mg/ml.

Muestra	Promedio de densidad óptica / DE	RGR / %	Rango de citotoxicidad
TCP	1.951 ± .003	90.7442	1 (non-cytotoxic)
HA	1.773 ± .061	82.4651	1 (non-cytotoxic)
TTCP	1.632 ± .108	75.907	1 (non-cytotoxic)

*RGR% tasa relativa de células, DE desviación estándar

De manera congruente con lo reportado previamente por Liu *et al.* (2008), todas las muestras estudiadas tuvieron el valor de densidad óptica estable hasta las 96 h (Figura 6), es decir, no perdieron su propiedad de no toxicidad durante ese tiempo.

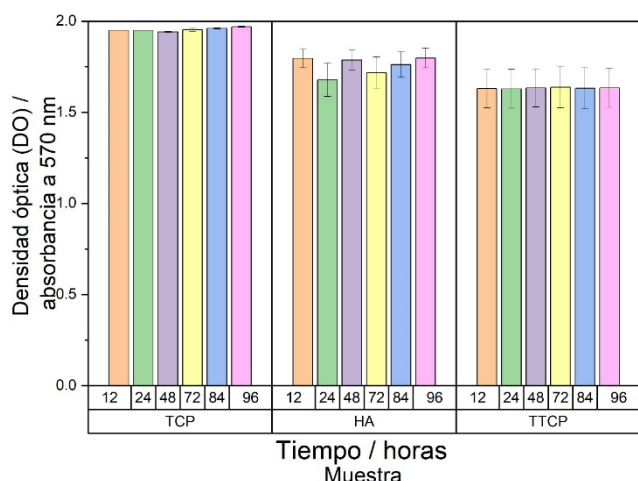


Figura 6: Viabilidad celular de las muestras

4. Conclusión

Los análisis XRD y FTIR de los polvos de CP confirmaron la formación de las fases TCP y HA, la muestra TTCP presentó una mezcla con la fase HA. El estudio de citotoxicidad demostró la no citotoxicidad de las muestras con la línea celular de fibroblastos NIH-3T3. En conclusión, las muestras

de fosfatos de calcio obtenidas por la vía hidrotermal propuesta son citocompatibles, dando indicios de su posible aplicación en la ingeniería de tejidos como la implantación ósea o para el tratamiento de infecciones cutáneas.

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

- Auclair-Daigle, C., Bureau, M. N., Legoux, J. G., & Yahia, L. H. (2005). Bioactive hydroxyapatite coatings on polymer composites for orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 73(4), 398-408.
- Boanini, E., Fini, M., Gazzano, M., & Bigi, A. (2006). Hydroxyapatite nanocrystals modified with acidic amino acids.
- Habibovic, P., Barrere, F., Van Blitterswijk, C. A., de Groot, K., & Layrolle, P. (2002). Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *Journal of the American Ceramic Society*, 85(3), 517-522.
- Kundu, B., Lemos, A., Soundrapandian, C., Sen, P. S., Datta, S., Ferreira, J. M. F., & Basu, D. (2010). Development of porous HAp and β -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold-based drug delivery system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(11), 2955-2969.
- Lahiri, D., Benaduce, A. P., Rouzaud, F., Solomon, J., Keshri, A. K., Kos, L., & Agarwal, A. (2011). Wear behavior and in vitro cytotoxicity of wear debris generated from hydroxyapatite-carbon nanotube composite coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96(1), 1-12.
- Liu, H., Yazici, H., Ergun, C., Webster, T. J., & Bermeck, H. (2008). An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta biomaterialia*, 4(5), 1472-1479.
- Ozawa, M., & Suzuki, S. (2002). Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*, 85(5), 1315-1317.
- Malhotra, A., & Habibovic, P. (2016). Calcium phosphates and angiogenesis: implications and advances for bone regeneration. *Trends in biotechnology*, 34(12), 983-992.
- Mobasherpour, I., Heshajin, M. S., Kazemzadeh, A., & Zakeri, M. (2007). Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, 430(1-2), 330-333.
- Mondal, S., Bardhan, R., Mondal, B., Dey, A., Mukhopadhyay, S. S., Roy, S., & Roy, K. (2012). Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity assessment of hydroxyapatite from different bioresources for tissue engineering application. *Bulletin of materials science*, 35(4), 683-691.
- Mondal, S., Dey, A., & Pal, U. (2016). Low temperature wet-chemical synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles and their in-situ cytotoxicity study. *Advances in nano research*, 4(4), 295.
- Motskin, M., Wright, D. M., Muller, K., Kyle, N., Gard, T. G., Porter, A. E., & Skepper, J. N. (2009). Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*, 30(19), 3307-3317.
- Ozawa, M., & Suzuki, S. (2002). Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*, 85(5), 1315-1317.
- Prakash Parthiban, S., Elayaraja, K., Girija, E. K., Yokogawa, Y., Kesavamoorthy, R., Palanichamy, M., & Narayana Kalkura, S. (2009). Preparation of thermally stable nanocrystalline hydroxyapatite by hydrothermal method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1), 77-83.
- Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D., Largeteau, A., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Biodegradable materials and metallic implants—a review. *Journal of functional biomaterials*, 8(4), 44.
- Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Kannan, S., Agathopoulos, S., & Ferreira, J. M. F. (2005). Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Journal of Materials Chemistry*, 15(47), 5007-5011.
- Roy, M., Fielding, G. A., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2012).

Mechanical, in vitro antimicrobial, and biological properties of plasma-sprayed silver-doped hydroxyapatite coating. *ACS applied materials & interfaces*, 4(3), 1341-1349.

Sariibrahimoglu, K., Wolke, J. G., Leeuwenburgh, S. C., Yubao, L., & Jansen, J. A. (2014). Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(3), 415-422.

Shitara, K., Murata, H., Watanabe, K., Kojima, C., Sumida, Y., Nakamura, A., Nakahira, A., Tanaka, I. & Matsunaga, K. (2014). Cytotoxicity of

stoichiometric hydroxyapatites with different crystallite sizes. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2(1), 64-67.

Wei, Y., Chang, Y. H., Liu, C. J., & Chung, R. J. (2018). Integrated oxidized-hyaluronic acid/collagen hydrogel with β -TCP using proanthocyanidins as a crosslinker for drug delivery. *Pharmaceutics*, 10(2), 37.

Wei, T., Wang, J., Yu, X., Wang, Y., Wu, Q., & Chen, C. (2019). Mechanical and thermal properties and cytotoxicity of Al_2O_3 nano particle-reinforced poly (ether-ether-ketone) for bone implants. *RSC advances*, 9(59), 34642-34651.