

## Evaluación *in vitro* de hemocompatibilidad en hidroxiapatita sintetizada vía hidrotermal

### *In vitro* evaluation of hemocompatibility in hydrothermally synthesized hydroxyapatite

G. García Domínguez <sup>a</sup>, A. Garrido Hernández <sup>a</sup>, F. del C. Salinas Pérez <sup>a</sup>, L. Chávez-Güitrón <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División Químico Biológicas, Universidad Tecnológica de Tecámac, Carretera Federal México-Pachuca Km. 37.5 Predio Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. C.P. 55740. México

#### Resumen

La hidroxiapatita (HAp) es un biomaterial utilizado para restaurar tejido óseo por su biocompatibilidad. Entre los estudios biológicos que se deben realizar para evaluarla se encuentran la prueba de hemocompatibilidad. En este trabajo, se sintetizaron partículas de HAp por el método hidrotermal para determinar su hemocompatibilidad. El tamaño de partícula se controló mediante el uso de tensioactivos, se realizó un diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>, utilizando los siguientes tensioactivos: EDTA (1 y 2mM) y Pluronic F-127 (3 y 6 mM). La presencia de la fase hexagonal se validó mediante difracción de rayos X y los enlaces característicos de las la HAp por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El empleo de surfactante promueve el cambio de morfología de la hidroxiapatita; el EDTA promueve la formación de varillas y el Pluronic F-127 agujas y placas. La hemocompatibilidad se determinó por una prueba de hemólisis. La mayoría de las partículas de HAp sintetizadas utilizando Pluronic F-127 y EDTA muestran menos de un 5% de hemólisis lo que sugiere que son altamente compatibles según la norma ISO 10993-4 y podrían utilizarse en aplicaciones biomédicas.

**Palabras Clave:** hidroxiapatita, surfactante, morfología, hemocompatibilidad.

#### Abstract

Hydroxyapatite (HAp) is a biomaterial used to restore bone tissue due to its biocompatibility. Among the biological studies to be performed to evaluate it is the hemocompatibility test. In this work, HAp particles were synthesized by the hydrothermal method to determine its hemocompatibility. The particle size was controlled using surfactants, a 2<sup>2</sup> factorial experimental design was performed, using the following surfactants: EDTA (1 and 2mM) and Pluronic F-127 (3 and 6 mM). The presence of the hexagonal phase was validated by X-ray diffraction and the characteristic HAp bonds by Fourier transform infrared spectroscopy. The use of surfactant promotes the change of hydroxyapatite morphology; EDTA promotes the formation of rods and Pluronic F-127 needles and plates. Hemocompatibility was determined by hemolysis test. Most of the HAp particles synthesized using Pluronic F-127 and EDTA show less than 5% hemolysis suggesting that they are highly compatible according to ISO 10993-4 and could be used in biomedical applications.

**Keywords:** hydroxyapatite, surfactant, morphology, hemocompatibility.

#### 1. Introducción

La hidroxiapatita (HAp) con fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$  es una cerámica con simetría hexagonal; es el material de fosfato de calcio más estable a temperatura ambiente en el rango de pH de 4 a 12. Se han realizado grandes esfuerzos para sintetizar partículas de HAp, con el objetivo de controlar su forma, el tamaño y estructura con el fin de ser utilizada como sustituto en el cuerpo humano o acarreadora de fármacos (Curtin et al., 2012), (Yang et al., 2008). Lo anterior, es por las propiedades biológicas que presenta como principal

componente inorgánico en el hueso, los dientes y otros tejidos calcificados (Wang et al., 2006; García-Domínguez et al., 2021). Al ser un material biocompatible, tienen una aplicación potencial en la administración de fármacos, en el suministro de agentes antitumorales y anticuerpos, en el tratamiento del cáncer, etc. (Yang et al., 2008), (Curtin et al., 2012), (Amor de Jesús et al., 2018). Kargozar et al., (2022) concluyó que el uso de partículas de HAp de tamaño nanométrico como vehículo y productos farmacéuticos anticancerígenos naturales, pueden ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes, reduciendo el uso de quimioterapéuticos

\*Autor para la correspondencia: lmchavez@yahoo.com

Correo electrónico: garciagianni1311@gmail.com (Giovanni García Domínguez), ari\_teogh@hotmail.com (Aristeo Garrido Hernández), biotflorencia@yahoo.com.mx (Florencia del Carmen Salinas Pérez), lmchavez@yahoo.com (Lorena Chávez Güitrón).

convencionales que suelen provocar efectos tóxicos en el organismo.

El método y las condiciones de síntesis afectan al tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, estructura cristalina, pureza del producto, morfología de las partículas, etc., por consiguiente, influyen en las propiedades del material (García-Domínguez et al., 2021). Las partículas HAp con las propiedades deseadas dependen de la elección adecuada de la ruta de síntesis. Existen varios métodos para la preparación de HAp, como la precipitación química, en algunos casos seguida de un proceso mecanoquímico (Castañeda et al., 2021), (Ochoa, 2021), el secado por pulverización (Cardona, et al., 2014), la electrodeposición, hidrotermal (Qui et al., 2016), (Qoi et al., 2019), sol-gel (Juárez-Robles et al., 2017), (Castañeda et al., 2021), microemulsión, coprecipitación (Juárez-Robles et al., 2017), métodos químicos húmedos que incorporan una etapa de liofilización y la irradiación por microondas (Amor de Jesús et al., 2008), (Rivera et al., 2010). En la mayoría de los métodos de precipitación convencionales, los factores que rigen la precipitación, como el pH, la temperatura y la relación la relación molar Ca/P, etc., no siempre se controlan con precisión, lo que provoca la formación de partículas de HAp con morfologías y tamaños variables.

En aplicaciones médicas, la HAp puede estar en contacto directo con células sanguíneas, por lo que, es necesario evaluar su hemocompatibilidad mediante pruebas de hemólisis para determinar la viabilidad de estas aplicaciones y comprender la interacción de los biomateriales con los eritrocitos (Seyfert et al., 2002; De GJ et al., 2003; Ooi et al., 2019). El contacto de la sangre con un objeto extraño (no hemocompatible) puede causar la deposición de una capa de proteína plasmática, seguida de la activación del sistema inmunitario y de coagulación del cuerpo humano, lo que puede poner en riesgo la vida del paciente (Seyfert et al., 2002).

Puvvada et al 2010, sintetizaron nanopartículas de HAp en forma de aguja utilizando ácido ortofosfórico como fuente de iones  $\text{PO}_4^{3-}$ , cloruro de calcio, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido acético; estas nanopartículas mostraron una elevada hemocompatibilidad, ya que la actividad hemolítica fue menor al 5%, atribuida a la presencia de grupos hidrófilos en la superficie (grupos funcionales carboxi e hidroxilo). Radha et al., 2014, sintetizó, caracterizó y determinó las características hemolíticas de nHAp (nanohidroxiapatita) y alúmina. El comportamiento hemolítico de muestras de 10, 20 y 40 mg/ml no resultaron hemolíticas y mostraron una lisis del 1.8%, por lo que son altamente biocompatibles. Ooi et al., 2019 realizaron pruebas de hemocompatibilidad utilizando hidroxiapatita nanoporosa sintetizada por vía hidrotermal y demostraron que existió menos de un 5% de hemólisis, por lo que esta nanopartícula es altamente biocompatible.

El objetivo de este estudio es evaluar bajo condiciones *in vitro* la hemocompatibilidad en partículas de HAp sintetizadas por vía hidrotermal utilizando como agentes tensioactivos EDTA y Pluronic F-127.

## 2. Metodología

### *Síntesis y Caracterización de hidroxiapatita*

Los materiales de partida fueron nitrato de calcio hexahidratado ( $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt,  $\geq 99\%$ )), hidrógenofosfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , (Baker Analyzed, 98.7%) y agua desionizada. Se utilizaron como surfactante aniónico el Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich) y surfactante aniónico ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las soluciones de  $\text{CaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  se prepararon al 0.5 M utilizando agua desionizada. Los surfactantes EDTA y Pluronic F-127 se agregaron a la solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en un concentración de 1 y 2 mM y 3 y 6 mM, respectivamente.

Las soluciones se agitaron a 60 °C y 600 rpm durante 20 minutos para garantizar la disolución de los tensioactivos. Después de disolver cada surfactante, la solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  se añadió gota a gota al nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; durante la adición, la solución de Ca se mantuvo en agitación a 60 °C. El valor del pH se ajustó a 11 añadiendo NaOH a 1.5 M (Fermont,  $\geq 98.3\%$ ). La solución mezclada se mantuvo durante 30 minutos. Después de ajustar el pH la solución final se transfirió en una autoclave que tiene un contenedor de teflón de 50 mL (el volumen final se ajustó a 32 mL), esta se calentó por 15 horas a 200 °C, es aquí donde se lleva a cabo la reacción hidrotermal. Los polvos obtenidos se lavaron tres veces con agua destilada y se centrifugaron por 15 min a 4000 rpm y por último se secaron en un horno a 100 °C durante 8 horas.

### *Técnicas de caracterización*

Las muestras de HAp 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  $\text{cm}^{-1}$ . La Difracción de Rayos X (DRX) para identificación de las fases cristalinas se registró a temperatura ambiente en un difractorómetro Bruker D8 Advance Eco (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) utilizando una radiación Cu K $\alpha$  de  $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ ; la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se realizó con un equipo JOEL modelo JSM-78000F (Jeol Ltd Akishima, Tokio, Japón) operando bajo alto vacío y una baja tensión de aceleración de 5 kV para evidenciar la morfología de las partículas y para detectar aglomerados. La distribución de la longitud y el diámetro de las partículas se obtuvieron midiendo la longitud y el diámetro de 100 partículas para cada muestra, estas se seleccionaron de diferentes imágenes a 4000X y diferentes secciones las microscopías de los polvos de hidroxiapatita. Para facilitar la distribución de las partículas se utilizó el programa, ImageJ.

### *Prueba de hemólisis*

Ésta se realizó de acuerdo con el procedimiento planteado por Laranjeira et al., 2016 y Ooi et al., 2019, se recolectaron 12 mL de sangre humana, de un donante de sexo femenino, en tubos con anticoagulante ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ). Se agregaron (1.8 y 16 mg) de polvo de HAp a un 1 mL de solución salina estéril. Se añadió 0.02 mL de sangre con anticoagulante a los tubos con HAp. Para preparar el control positivo (+) y negativo (-), se les agregó 0.02 mL de sangre con anticoagulante, en el primer caso a un tubo con agua destilada y en el segundo caso a un tubo con solución salina estéril. Una vez completada la incubación (60 minutos), los tubos se centrifugaron a 8000 rpm

durante 10 min, utilizando una centrifuga Thermo Scientific (Heraeus Megafuge 4D). Se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, Perkin Elmer (Lambda 35). El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando (1):

$$(\%) = \frac{Dt - Dnc}{Dpc - Dnc} \quad (1)$$

donde: Dt es absorbancia de la solución con HAp, Dnc es la absorbancia del control negativo (-), Dpc es la absorbancia del control positivo (+). Todos los experimentos de hemólisis se realizaron por triplicado. La interpretación sobre el porcentaje de hemólisis de acuerdo con la norma ISO 10993-4 (Evaluación biológica de productos sanitarios) se muestra a continuación: <5% = altamente hemocompatible, dentro del 10% = compatible, >20% = no compatible.

### 3. Discusión de resultados

La Figura 1 presenta los espectros FT-IR de los polvos de HAp sin surfactante y HAp sintetizados con Pluronic F-127 y EDTA. Se observan las bandas típicas de los fosfatos cálcicos de HAp en 1107-1038  $\text{cm}^{-1}$  (vibración antisimétrica de los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ ), 962  $\text{cm}^{-1}$  (vibración simétrica de los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ ) y 560  $\text{cm}^{-1}$  (deformación antisimétrica de los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ ). De acuerdo con las bandas de absorción la síntesis de las partículas de HAp. Ningún enlace C-H relacionado al empleo de surfactantes en la síntesis de hidroxiapatita fue detectado, por lo cual en la etapa de lavado fueron removidas eficientemente los subproductos de la reacción hidrotérmal.

El patrón de difracción de rayos x que se muestra en la Figura 2 reveló que los polvos de HAp cristalizaron en la fase hexagonal (carta ICDD 09-0432). Por lo tanto, los tensioactivos que se usaron durante la síntesis no cambiaron la estructura cristalina; sin embargo, los principales picos de difracción presentaron diferencia en sus intensidades relativas, especialmente para los planos (002) y (211). Se observa un cambio en el pico (002), se hizo más estrecho con el uso de tensioactivos. Se ha reportado que el cambio en la intensidad y si se vuelve más ancho o estrecho indica una cristalinidad más baja y más alta en los polvos de hidroxiapatita, respectivamente.

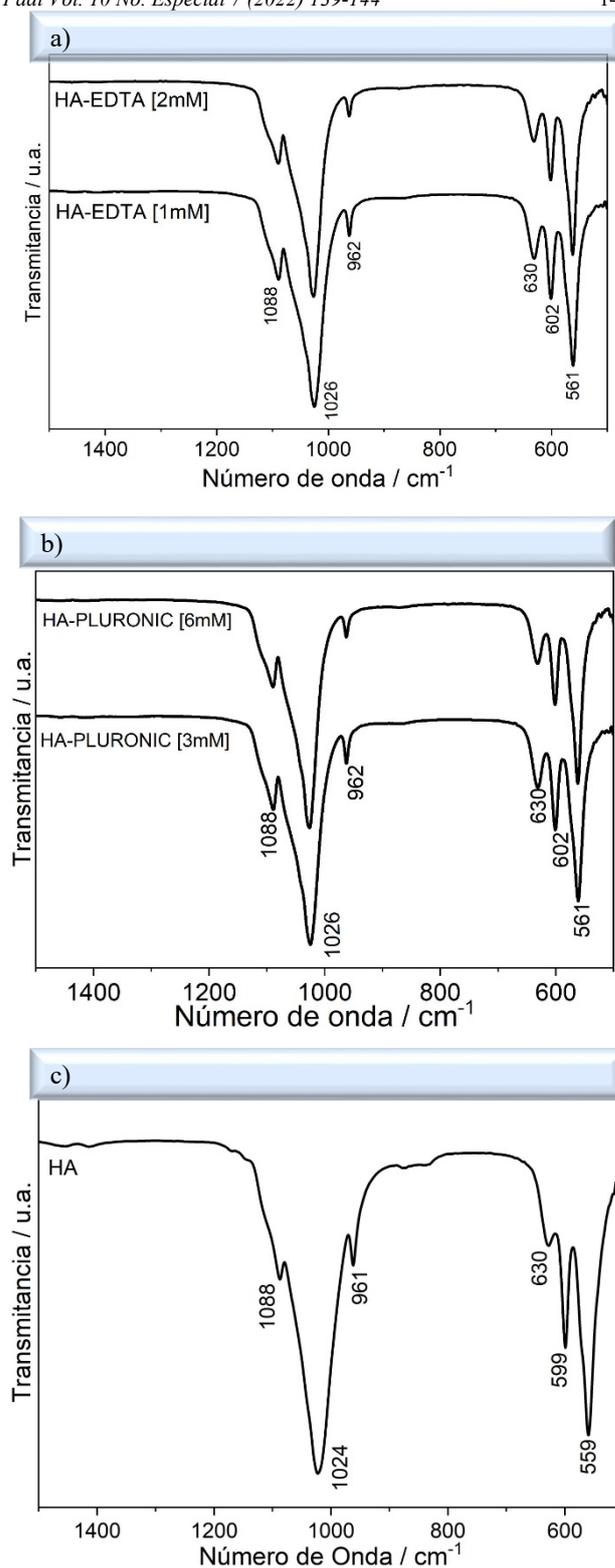


Figura 1: espectros FT-IR de las muestras de HAp sintetizadas con a) pluronic F-127, b) EDTA, c) sin surfactante

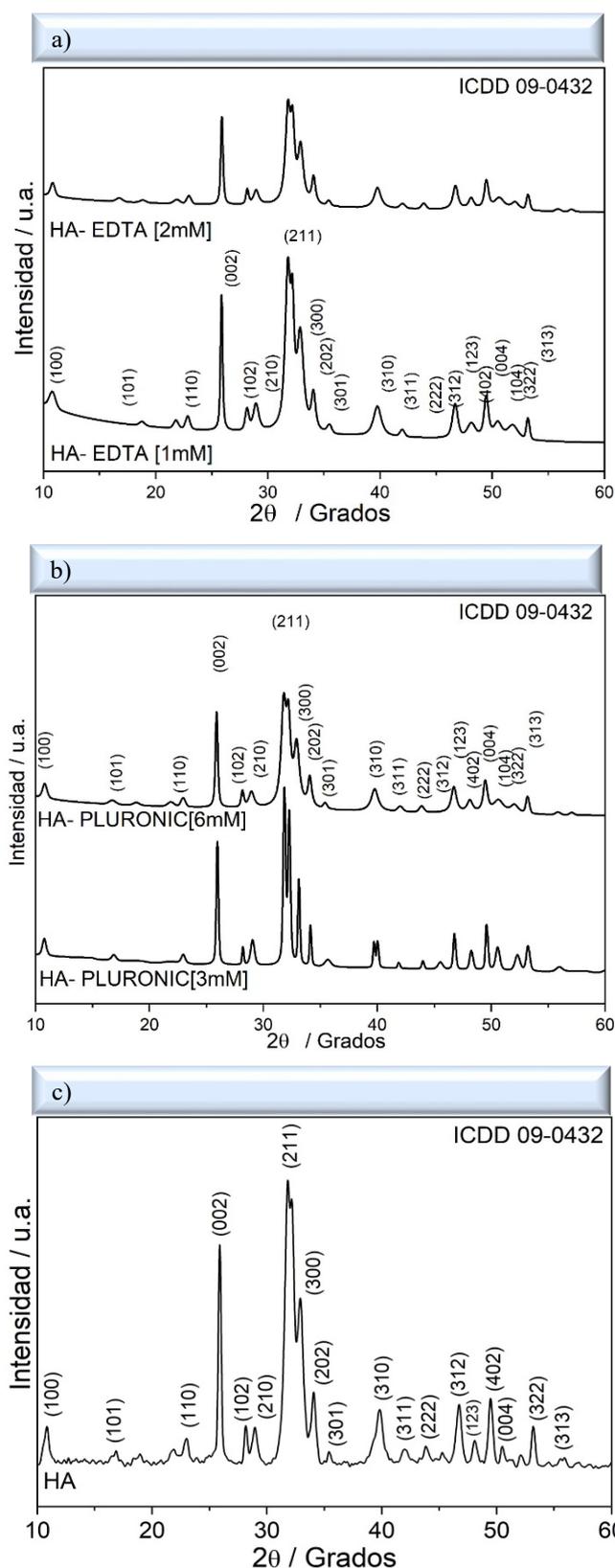


Figura 2: patrón de difracción de rayos X en HAp sintetizada con a) Pluronic F-127, b) EDTA, c) sin surfactante

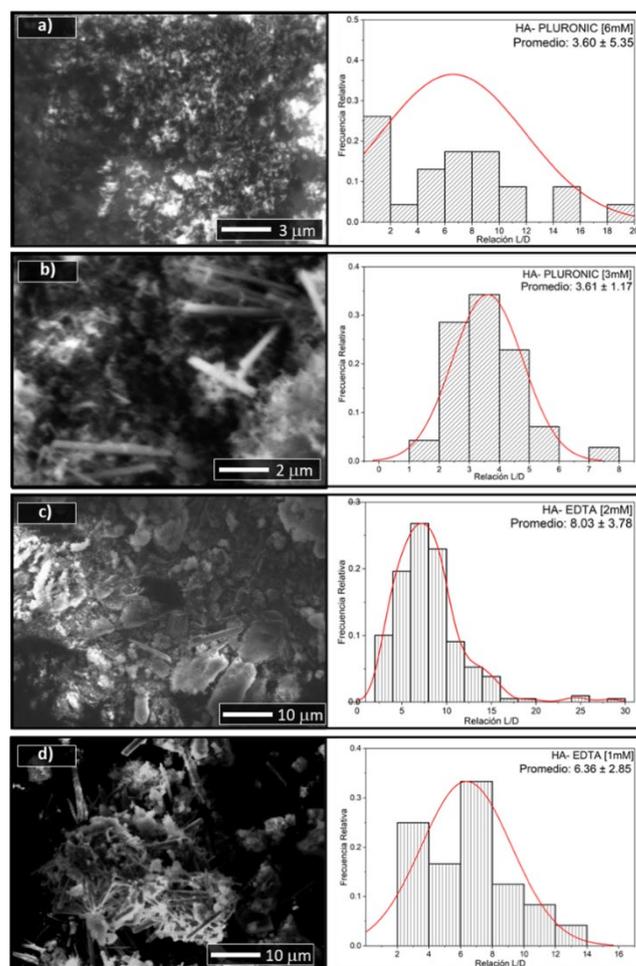


Figura 3: Micrografía electrónica de barrido e histograma de relación longitud/diámetro (L/D) de a) HAp-Pluronic F-127 [6Mm], b) HAp-Pluronic F-127 [3Mm], c) HAp-EDTA [2Mm], d) HAp-EDTA [1Mm].

A partir de la micrografía SEM mostrada en la Figura 3, se observa la influencia del surfactante en la morfología de las partículas. La diferencia en la concentración del agente tensoactivo se observa en un cambio en la morfología y tamaño de las partículas obtenidas, se muestra el diámetro (D), largo (L) la relación L/D de las partículas (Tabla 1).

Tabla 1. Forma, diámetro, longitud y relación L/D de HAp sintetizada con Pluronic F-127 y EDTA.

| Surfactante    | Concentración | Forma           | Diámetro (μm) | Longitud (μm) | Relación L/D |
|----------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| Pluronic F-127 | 3 mM          | Varilla         | 0.19±0.04     | 0.69±0.23     | 3.61±1.17    |
|                | 6 mM          | Varilla         | 0.35±0.12     | 3.11±1.18     | 6.60±5.35    |
| EDTA           | 1 mM          | Placas y agujas | 2.40±1.77     | 12.69±7.07    | 6.36±2.85    |
|                | 2 mM          | Agujas          | 1.36±0.82     | 9.63±4.89     | 8.03±3.78    |

El diámetro de las varillas de HAp sintetizadas con Pluronic F-127 (3 mM) es de  $0.19 \pm 0.04 \mu\text{m}$ , una longitud de  $0.69 \pm 0.23 \mu\text{m}$  y una relación L/D de  $3.61 \pm 1.17 \mu\text{m}$ , mientras que para HAp sintetizada con el mismo agente tensoactivo a una concentración de 6mM, mostraron un diámetro de  $0.35 \pm 0.12 \mu\text{m}$ , una longitud de  $3.11 \pm 1.18 \mu\text{m}$  y una relación L/D de  $6.60 \pm 5.35 \mu\text{m}$ .

Estos resultados concuerdan con Ooi et al., 2019 quienes reportaron un hallazgo similar respecto a la morfología, los

autores indicaron que las muestras de HAp son partículas aglomeradas en forma de varilla con poros formados entre las partículas y explican que esta es debida a fuerzas de atracción de Van der Waals. Al igual Zhao et al., 2011 que mencionan que la dispersabilidad de las muestras de HAp que son sintetizadas utilizando tensioactivos mixtos como plantillas es mejor que las que usan un solo tensioactivo como plantilla, explicando así la aglomeración presente en las partículas sintetizadas con Pluronic F-127.

De acuerdo con la distribución de tamaño de partícula, observado a partir de las micrografías. Los polvos de HAp sintetizados empleando EDTA al 1mM está constituido por morfologías de agujas y placas tuvieron un diámetro de  $2.40 \pm 1.77 \mu\text{m}$ , una longitud de  $12.69 \pm 7.07$  y una relación L/D de  $6.36 \pm 2.85$ . Las partículas sintetizadas con EDTA al 2mM, las morfologías contaban con un diámetro de  $1.36 \pm 0.822 \mu\text{m}$ , una longitud de  $9.63 \pm 4.8912 \mu\text{m}$  y una relación L/D de  $8.03 \pm 3.78$ .

La hemólisis se presenta cuando las células sanguíneas se dañan o destruyen por el contacto con ciertas sustancias extrañas.

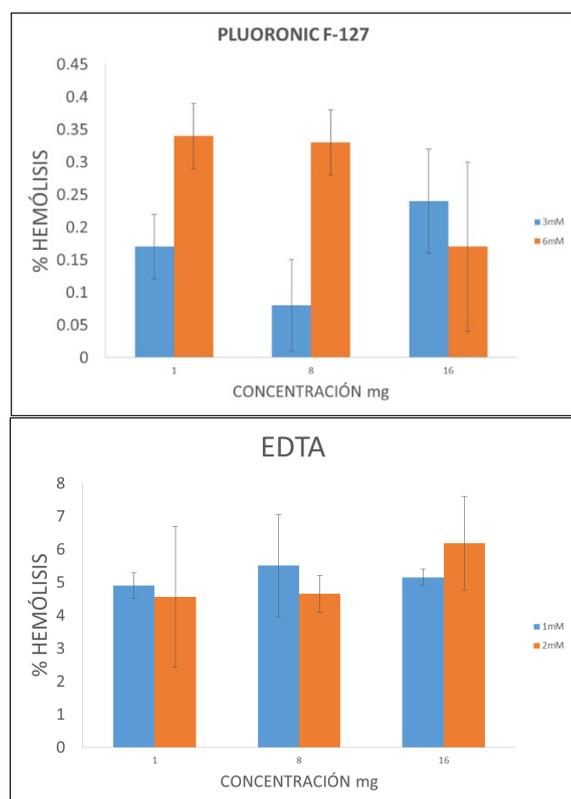


Figura 4: Porcentaje de hemólisis con HAp sintetizada con Pluronic F-127 y EDTA

Las gráficas (Figura 4) muestran que el porcentaje de hemólisis más bajo en Pluronic F-125 (3mM) más bajo se presentó en la concentración de 16 mg/mL, siendo de  $0.17 \pm 0.14\%$ , convirtiéndose en la concentración más hemocompatible de HAp, seguida de la concentración de 8 mg/mL que mostró un porcentaje de hemólisis de  $0.22 \pm 0.07\%$

y para finalizar, la concentración de 1 mg/mL que mostró un porcentaje de hemólisis de  $0.34 \pm 0.05\%$ . Para Pluronic F-127 a una concentración de [6 mM] los histogramas muestran un porcentaje de hemólisis menor en la concentración de 8 mg/mL, siendo de  $0.08 \pm 0.05 \%$ , convirtiéndose en la concentración más hemocompatible de HAp, seguida de la concentración de 1 mg/mL que mostró un porcentaje de hemólisis de  $0.17 \pm 0.05\%$  y la concentración de 16 mg/mL mostró un porcentaje de hemólisis de  $0.24 \pm 0.13 \%$ . Los porcentajes de hemólisis de todas las muestras sintetizadas usando Pluronic F-127 fueron menores del 5%, por lo que son altamente hemocompatibles según lo reportado por Radha et al., 2015 y Ooi et al., 2019. Esto indica que los materiales no son hemolíticos, por lo tanto, la HAp podrían tener aplicaciones biomédicas.

La HAp sintetizada utilizando como surfactante Pluronic F-127 (3mM) y (6mM) presentaron tamaños de partículas menores que los polvos de HAp sintetizados usando EDTA, por lo cual el área superficial es mayor. Este hallazgo ilustra un comportamiento contrario efecto de la sangre con un cuerpo extraño. Por lo cual, el efecto de la carga superficial de las partículas tiene influencia directa el efecto de la carga superficial de las partículas es muy importante en la hemólisis, la naturaleza anionica del surfactante EDTA pudo influenciar la carga de las partículas, resultando en un incremento en la hemólisis. La carga de superficial de las partículas puede dañar la membrana plasmática de los glóbulos rojos.

## Conclusiones

Se sintetizó HAp por vía hidrotermal utilizando como agentes tensioactivos Pluronic F-127 y EDTA, este último surfactante en las dos concentraciones utilizadas (1 mM y 2 mM) promovieron un mayor tamaño de los cristales. La hemocompatibilidad de la HAp no se afectó por los surfactantes utilizados en este estudio para la síntesis y esto es debido a las propiedades fisicoquímicas similares de ambas muestras. La evaluación de la hemocompatibilidad (prueba de hemólisis) revela que las muestras de HAp sintetizadas en este estudio con Pluronic F-127 y EDTA son biomateriales altamente hemocompatibles y no causan un efecto adverso a nivel de glóbulos rojos, por lo que podría tener aplicaciones biomédicas.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al COMECYT, No. de proyecto FICDTEM-2021-103 por el financiamiento, y al CCAI-UTTEC por el uso de las instalaciones para realizar los análisis de caracterización, así como a Stephanie Ariana Núñez Santana por su contribución en la fase experimental del presente trabajo.

## Referencias

- Amor de Jesús, A. G. (2018). Obtención de nanoestructuras de hidroxiapatita-Au y su potencial aplicación en liberación de fármacos (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Cardona, J. C. O., Zuluaga, I. M., Sossa, P. A. F., Arango, P. J. A., & Parra, E. R. (2014). Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita natural obtenida del hueso de cerdo. *Revista Colombiana de Materiales*, (5), 165-171.

- Curtin, C.M.; Cunniffe, G.M.; Lyons, F.G.; Bessho, K.; Dickson, G.R.; Duffy, G.P.; O'Brien, F.J. Innovative Collagen Nano-Hydroxyapatite Scaffolds Offer a Highly Efficient Non-Viral Gene Delivery Platform for Stem Cell-Mediated Bone Formation. *Adv. Mater.* 2012, 24, 749–754. <https://doi.org/10.1002/adma.201103828>
- Castañeda Vía, J. A., Quispe Marcatoma, J., Landauro Sáenz, C. V., Vera Gonzales, C. A., & Tay Chu Jon, L. Y. (2021). Simulación Teórica y Evaluación Experimental de Hidroxiapatita Sintetizada por Método Sol-Gel y Mecano-Síntesis.
- García Domínguez, G., Díaz 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. <https://doi.org/10.3390/ma14216522>
- Gómez, M. I. O., Gómez, M. E. L., & López, H. C. (2021). Síntesis y caracterización de polvos de hidroxiapatita carbonatada tipo b con diferentes contenidos de carbonato. *Revista Colombiana de Materiales*, (17), 22-32.
- Juárez Robles, D. E., Salas Avalos, N. S., Chávez García, M. D. L., & García Mejía, T. A. (2017). Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos sol-gel y coprecipitación. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 2017, 3 (3).
- Lara-Ochoa, S., Ortega-Lara, W., & Guerrero-Beltrán, C. E. (2021). Hydroxyapatite nanoparticles in drug delivery: Physicochemistry and applications. *Pharmaceutics*, 13(10), 1642.
- Laranjeira, M. S., Moço, A., Ferreira, J., Coimbra, S., Costa, E., Santos-Silva, A., & Monteiro, F. J. (2016). Different hydroxyapatite magnetic nanoparticles for medical imaging: Its effects on hemostatic, hemolytic activity and cellular cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 363-374.
- Kargozar, S., Mollazadeh, S., Kermani, F., Webster, T. J., Nazarnezhad, S., Hamzehlou, S., & Baino, F. (2022). Hydroxyapatite Nanoparticles for Improved Cancer Theranostics. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(3), 100.
- Olson, B. J., & Markwell, J. (2007). Asesas for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 38(1), A-3A.
- Ooi, C. H., Ling, Y. P., Abdullah, W. Z., Mustafa, A. Z., Pung, S. Y., & Yeoh, F. Y. (2019). Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(4), 1-10.
- Puvvada, N., Panigrahi, P. K., & Pathak, A. (2010). Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. *Nanoscale*, 2(12), 2631-2638.
- Qi, M. L., Xiao, G. Y., & Lu, Y. P. (2016). Rapid hydrothermal synthesis of submillimeter ultralong flexible hydroxyapatite fiber using different pH regulators. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, 29(7), 609-613.
- Radha, G., Balakumar, S., Venkatesan, B., & Vellaichamy, E. (2015). Evaluation of hemocompatibility and in vitro immersion on microwave-assisted hydroxyapatite–alumina nanocomposites. *Materials science and engineering: C*, 50, 143-150.
- Rivera, J. A., Fetter, G., & Bosch, P. (2010). Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 15, 506-515.
- Seyfert, U. T., Biehl, V., & Schenk, J. (2002). In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular engineering*, 19(2-6), 91-96.
- Wang, Y., Zhang, S., Wei, K., Zhao, N., Chen, J., & Wang, X. (2006). Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template. *Materials Letters*, 60(12), 1484-1487.
- Yang, P., Quan, Z., Li, C., Kang, X., Lian, H., & Lin, J. (2008). Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. *Biomaterials*, 29(32), 4341-4347.
- Zhao, Q., Wang, T., Wang, J., Zheng, L., Jiang, T., Cheng, G., & Wang, S. (2011). Template-directed hydrothermal synthesis of hydroxyapatite as a drug delivery system for the poorly water-soluble drug carvedilol. *Applied Surface Science*, 257(23), 10126-10133.