

Preparation of the chemical compound hydroxyapatite based on sea coral *Dendrophyllia Cornigera* as a Vital source: an in vitro study

Dr. Mounzer Asaad*
Dr. Izdihar ammar**
Ashraf Mahlobi ***

(Received 15 / 7 / 2022. Accepted 18 / 8 / 2022)

□ ABSTRACT □

Sea coral is a very rich natural source of calcium carbonate in its aragonite crystalline phase, which can be converted using hydrothermal conversion to hydroxyapatite.

For later use in the medical field in general and in the field of oral and maxillofacial surgery in particular.

Research objective: Synthesis of hydroxyapatite from sea coral using hydrothermal conversion technology.

Materials and Methods: Hydroxyapatite was characterized by infrared spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy and elemental analysis.

Results: Functional groups were determined using FTIR, crystal structure using XRD, particle morphology was checked using SEM, and component elements were determined by EDX.

Conclusions: The results of the elemental analysis showed that the P/CA value was 1.69, which is the characteristic value of hydroxyapatite with the formula $CA_{10}(PO_4)_6OH_2$.

Key words: hydrothermal conversion, marine coral, aragonite crystals.

* Associate Professor, Dept of Oral and Maxillofacial Surgery ,Faculty of Dentistry, Tishreen University, Lattakia, Syria

** Professor, Dept of Marine Biology ,Higher Institute Of marine Research ,Tishreen University, Lattakia, Syria .

*** Postgraduate student , Dept of Oral and Maxillofacial Surgery ,Faculty of Dentistry, Tishreen University, Lattakia, Syria .

تحضير المركب الكيميائي هيدروكسي أباتيت بالاعتماد على المرجان البحري *Dendrophyllia Cornigera* كمصدر طبيعي: دراسة مخبرية

د. منذر أسعد*

د. ازدهار عمار**

أشرف مهلوبي***

(تاريخ الإيداع 15 / 7 / 2022. قُبل للنشر في 18 / 8 / 2022)

□ ملخص □

يعد المرجان الحجري مصدراً طبيعياً غنياً جداً بـكربونات الكالسيوم بطورها البلوري الأراغونيت والتي من الممكن تحويلها باستخدام التحويل الحراري المائي إلى هيدروكسي أباتيت الذي يعد واسع الاستخدام في المجال الطبي عموماً ومجال جراحة الفم والفكين خصوصاً.

يهدف البحث إلى تحضير الهيدروكسي أباتيت من المرجان البحري باستخدام تقنية التحويل الحراري المائي حيث جمعت عينات حية من النوع *Dendrophyllia* خلال شهري كانون الأول 2021 وكانون الثاني 2022 من شاطئ اللاذقية وتمت معالجتها وتحضير الهيدروكسي أباتيت وتوصيفه من خلال مطيافية الأشعة تحت الحمراء FTIR، انعراج الأشعة السينية XRD، المجهر الإلكتروني الماسح SEM و التحليل العنصري EDX. حيث تم تحديد المجموعات الوظيفية باستخدام ال FTIR و البنية البلورية باستخدام XRD والتحقق من مورفولوجية الجسيمات باستخدام SEM و معرفة العناصر المكونة عن طريق EDX.

وأظهرت نتائج التحليل العنصري ان قيمة Ca/P كانت 1.69 وهي القيمة المميزة للهيدروكسي أباتيت بصيغته $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$.

الكلمات المفتاحية: التحويل الحراري المائي، المرجان الحجري، بلورات الأراغونيت، هيدروكسي الأباتيت، *Dendrophyllia*

* أستاذ مساعد، قسم جراحة الفم والفكين، كلية طب الأسنان، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

** أستاذ، قسم البيولوجيا البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

*** طالب دراسات عليا (دكتوراه) قسم جراحة الفم والفكين، كلية طب الأسنان جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

مقدمة:

زاد اهتمام جراحي الفم والفكين في السنوات الاخيرة في البحث عن طعم عظمي يحاكي في خواصه وبنيته البلورية العظم البشري الطبيعي ويكون بديلاً عن الطعم الذاتي والذي يترافق استخدامه مع الرض والانتان [1]، هنالك العديد من بدائل العظم المتوفرة (ذاتية، متغايرة، أجنبية، غير عظمية) [2]، ومن الطعوم غير العظمية فوسفات ثلاثية الكالسيوم ، الهيدروكسي اباتيت والمرجان الحيوي ولأننا نعيش في سورية وفي ظل ما نعانيه من حصار اقتصادي شديد كان لا بد علينا محاولة استخلاص بديل للطعم العظمي من مصدر حيوي متوافر بكثرة في شواطئ الساحل السوري هو المرجان نوع *Dendrophyllia Cornigera*. [3].

والمرجان حيوان بحري ينتمي إلى شعبة القراصيات *Cnidaria* صف الزهريات *Anthozoa* يتجمع على شكل مستعمرات زاهية الألوان تبدو كجنة تحت الماء، تعتمد عليها الكثير من الأنواع البحرية، تكثر في المياه المدارية الضحلة والدافئة [4].

يمكن تقسيم المرجان إلى قسمين أساسيين يختلفان عن بعضهما بتركيب الهيكل الخارجي وعدد المجسات [5] المرجان الطري *Soft coral*: يتكون الهيكل الخارجي من بروتين مرن يدعى *Gorgonin*، يرسب كربونات الكالسيوم لكن في مناطق معينة تدعى الشويكات، يملك ثمان مجسات ويكثر في المناطق الهادئة قليلة الموج لأنه ضعيف المقاومة.

المرجان القاسي *Hard coral*: يرسب كربونات الكالسيوم على كافة أنحاء الجسم مما يكسبه الصلابة، عدد مجساته من مضاعفات الستة ، أكثر مقاومة للموج [6].

والنوع المستخدم في هذه الدراسة نوع مرجان قاسي وذلك لغناه بكربونات الكالسيوم بسبب قدرته على ترسيبها. وهو نوع من الشعاب المرجانية الحجرية في عائلة *Dendrophyllidae* تم الحصول عليه في اعماق تصل الى 900م وهي شعاب مرجانية من نوع *Azooxanthellate* اي انها عديمة السياط، تتوفر في مياه البحر الابيض المتوسط وفي سورية على اعماق تصل حتى 90 م [7].

وقد جاءت فكرة ترسيخ المواد المرجانية في الطب من قبل *White* واخرون عام 1972 مع عملية مبتكرة لتحويل وتوليد نسخ عالية الدقة من الهياكل العظمية البحرية مثل المرجان [8]

تم استخدام الهياكل العظمية المرجانية كبداية عظمية في الجراحة على مدار السنوات القليلة الماضية ولكنها لم تكن متاحة تجارياً مثل *Bicoral* و *Interpore* حتى بداية التسعينات [9]

تم استخدام المرجان البحري المعالج والمتحول على نطاق واسع في علاج الكسور التي من غير الممكن ردها بشكل طبيعي وتعويض الضياع المادي الناتج عن استئصال الأورام، [10] وذلك بسبب البنية القنوية والمسام الداخلية والتبلور فإن الشعاب المرجانية هي بدائل حيوية لنماذج مختلفة من العظام ولكن قليل فقط من الأنواع الرئيسية المرجانية تستخدم لاعادة بناء العظام (*Lobophyllia, Acropora, Gonipora*) و ذلك بسبب توفرها الكبير وبنيتها

المستقلة، [11] و كذلك الفعل المناعي لها بالحد الأدنى وخصوصا بعد معالجتها حرارياً. [12].

تقتصر غرسات الهيكل المرجاني حالياً على العظام غير الهيكلية بسبب عدم تحملها للضغط العالي حيث ان احدى طرق زيادة تحمل الضغط العالي هي تحويل كربونات الكالسيوم الى هيدروكسي أباتيت. [13]

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث:

تتبع أهمية البحث من محاولة الاستفادة من الكائنات البحرية بتركيبها الكيميائي من اجل اصطناع هيدروكسي الأباتيت والذي يحاكي في بنيته بنية العظم الطبيعي من اجل استخدامه كبديل عظمي في المجال الطبي في سورية.

هدف البحث:

استخراج هيدروكسي الأباتيت من المرجان الحجري بتقنية التحويل الحراري المائي وتوصيفه للتأكد من صيغته الكيميائية وبنيته البلورية.

طرائق البحث ومواده

1. تحضير العينات:

تم جمع عينات من *Dendrophylliae* من شاطئ اللاذقية على الساحل السوري نظفت باستخدام هيبوكلوريد الصوديوم بتركيز 5,25 % وذلك لمدة 24 ساعة ثم غسلت بتيار من الماء الجاري لمدة ساعة ووضعت في معقمة جافة لمدة ساعتين. [14]



الشكل رقم 1 و 2 صورة مرجعية وصورة من عينة الباحث للمرجان نوع *Dendrophylliae* على الترتيب.

طحنت العينات المرجانية بعد ذلك في مخبر الوقاية والامان بالهيئة العامة للطاقة الذرية بدمشق باستخدام مطحنة الية نوع Retsch PM 400 وذلك للحصول على حبيبات بأحجام مختلفة (اقل من 1 ملم ، اقل من 2 ملم).

2 عملية التحويل الحراري المائي:

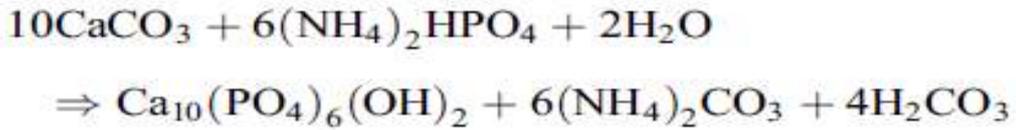
وضعت 200 غ من كربونات الكالسيوم مع كمية متساوية من ملح فوسفات الامونيوم أحادي الهيدروجين $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ وبوجود كمية قليلة حوالي 50 غ من مسرع التفاعل فوسفات احادية البوتاسيوم KH_2PO_4 كوسيط وازافة الماء المقطر ووضعها في عبوة زجاجية محكمة الاغلاق مخصصة للزرع الجرثومي وذلك بتقنية التحويل الحراري المائي الموصوفة من قبل Ye Xu, Dazhi Wang في عام 2001 [15]

وضعت الزجاجية في الأوتوكلاف بدرجة حرارة 134 درجة مئوية وضغط 2 بار لمدة 48 ساعة متواصلة الشكل 4.



الشكل 4 يمثل تحضير المواد ووضعها ضمن الأوتوكلاف

التفاعل الكيميائي الحاصل هو :



يظهر الشكل 6 شكل المادة الناتجة عن التفاعل

غسلت المادة الناتجة بالماء المغلي وذلك لإزالة جميع الأملاح المنحلة الناتجة عن التفاعل، تم ترشيح الناتج باستخدام ورقة ترشيح رقيقة لمدة 24 ساعة واحتفظ بالناتج النهائي ضمن وعاء بلاستيكي من أجل القيام بالاستقصاءات والتحليل التي تؤكد ماهية المركب الناتج.



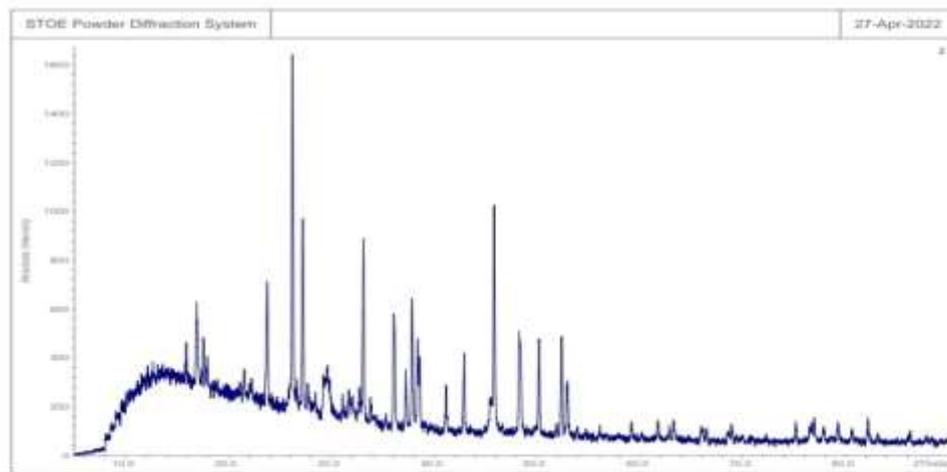
الشكل 8 العينة بشكلها النهائي



الشكل 7 العينة على ورقة الترشيح

3- توصيف المادة الأساسية (حبيبات المرجان المطحون):

وذلك للتأكد من التركيب البلوري لقطع المرجان المطحون قمنا بإجراء اختبار انعراج الأشعة السينية وهو عبارة عن انعراج الأشعة بزوايا انعراج خاصة بكل مركب يحلل البنية البلورية وضمننا البنية الكيميائية لحبيبات مسحوق ويمتاز بسهولة تحضير العينات ويعمل تحت ظروف متعددة من خلاء، هواء وحرارة وحصلنا على الطيف التالي :



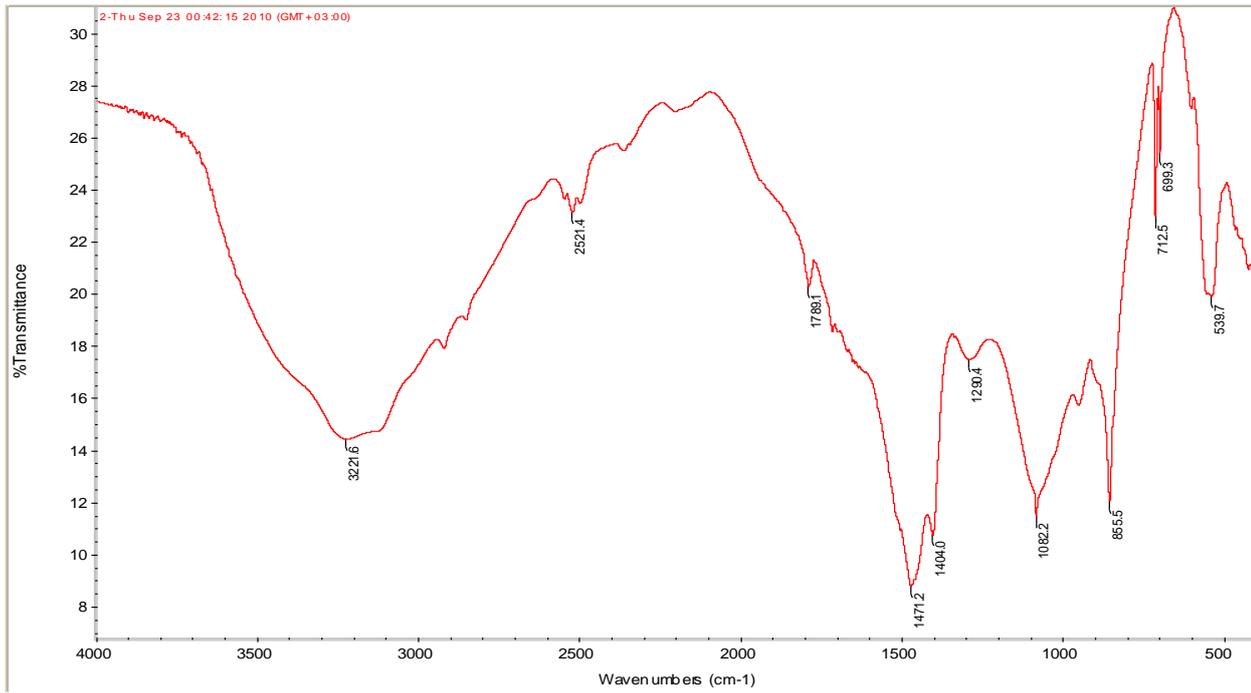
الشكل 9 طيف المرجان المطحون

4- توصيف المادة الناتجة عن التفاعل:

تم توصيف المادة الناتجة عن تفاعل التحويل الحراري المائي باستخدام SEM, FTIR, EDX, XRD . حيث أفاد ال FTIR لتحديد المجموعات الوظيفية . وتم معرفة المعلومات الشكلية للجسيمات الناتجة بواسطة SEM بينما تمكنا من إجراء تحليل العناصر الناتجة باستخدام ال EDX وتحديد البنية البلورية بواسطة انعراج الأشعة السينية XRD

1-4- مطيافية الأشعة تحت الحمراء FTIR

سحبت أطيف الأشعة ما تحت الأحمر للمسحوق الناتج باستخدام الجهاز (FT_IR THERMO NICOLET 6700) في المجال 4000-400 سم⁻¹ وذلك ضمن الشروط القياسية وذلك لتحديد المجموعات الوظيفية وسجل الطيف التالي:



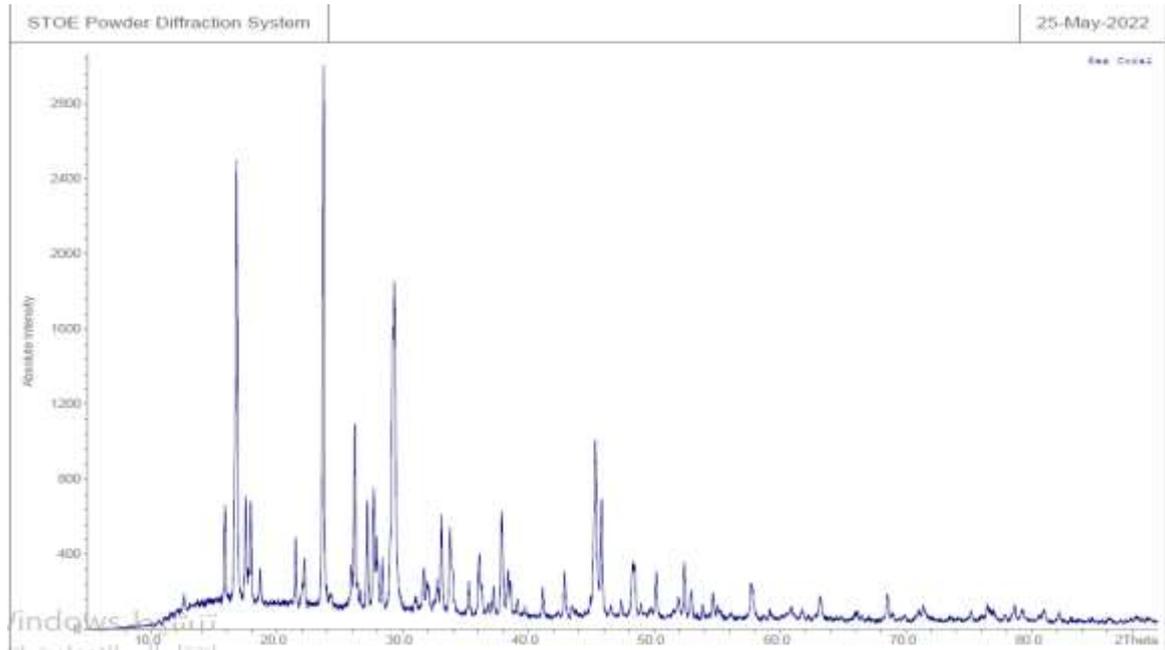
الشكل 9 طيف الأشعة تحت الحمراء

2-4- دراسة العينة بمطيافية الأشعة السينية x-ray diffraction

أنجز هذا الاختبار في مخابر هيئة الطاقة الذرية في قسم الجيولوجيا، استخدم جهاز PANalytical X'Pert Powder' XRD7 الذي يقوم بتحليل العينات الصلبة عن طريق مسحها بواسطة الأشعة السينية بشكل انعراجي ضمن مجال زاوي معين، يعطي الجهاز طيفاً كاملاً يحوي العديد من الذرات التي تحدد المحتوى الفلزي للعينة. وذلك ضمن الشروط التالية:

Radiation	Scan mode	Detector	Monochromator	Scan type	Generator
0,154060A CUKa	Transmission	Liner psD	Curved germanium III	2Theta mega	40kv,30Ma

تم الحصول على الطيف الموضح في الشكل 10



الشكل 10 يمثل طيف ال XRD لمركب الهيدروكسي اباتيت

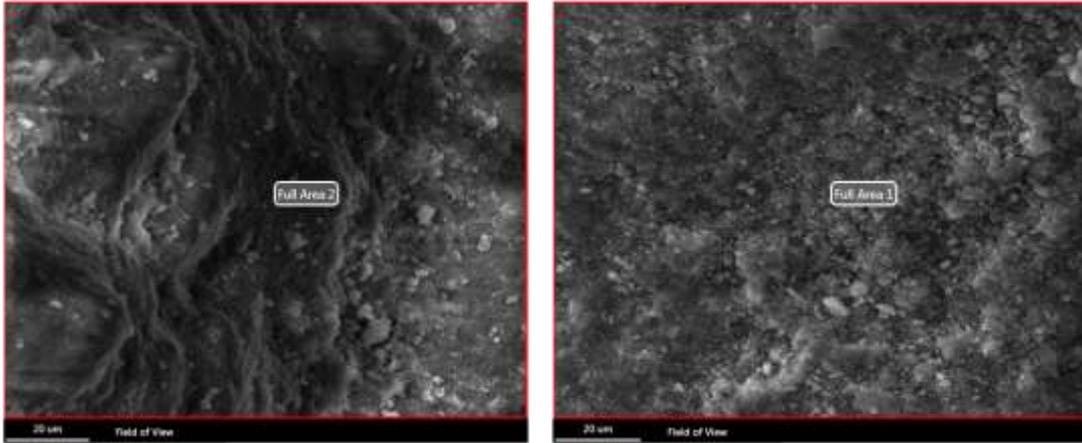
4-3 المعلومات الشكلية للعينة باستخدام المجهر الالكتروني الماسح .

تم التحليل باستخدام الجهاز الموجود في مخابر الفيزياء بالهيئة العامة للطاقة الذرية في دمشق وذلك لتبيان مورفولوجيا الجسيمات الموجودة و ذلك بوضع العينة على حامل المنيوم لصق عليه قطعة من لاصق كربوني لتثبيت المواد ثم يوضع الحامل في حجرة المجهر الالكتروني الماسح ليتم تخلية الحجرة حتى 10^{-3} mbar عندما تكون الحجرة جاهزة نسلط عليها جهد عال حتى 20 كيلو فولط على وشيعة تصدر الكترونات تصطدم بالعينة وبعدها تظهر الصورة على شاشة الحاسوب ونجري عليها التكبيرات المطلوبة.



الشكل 12 المجهر الالكتروني الماسح

تم التقاط عدد من الصور من مناطق مختلفة من العينة وذلك حسب الكيلو فولط المسلط عليها



الشكل 13 يمثل صورتين بمنطقتين مختلفتين من العينة بواسطة المجهر الماسح

A 14 : يمثل صورة بمسافة 20 ميكرون وب 10 كيلو فولط وقوة تكبير 100 (Full area 1)

A 14 : يمثل صورة بمسافة 20 ميكرون وب 30 كيلو فولط وقوة تكبير 100 (Full area2)

4-4 التحليل العنصري (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) EDXS

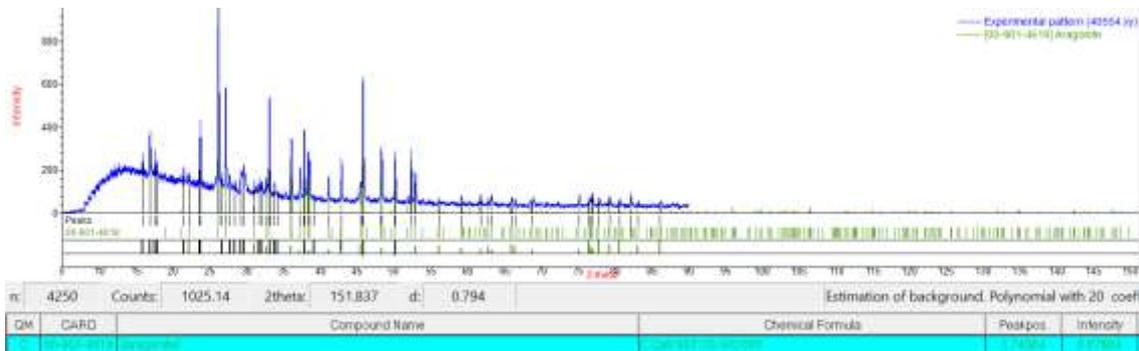
جهاز قياس طيف طاقة تشتت الاشعة السينية وهو عبارة عن تقنية كيميائية يستخدم بالمشاركة مع تحليل المجهر الالكتروني الماسح ولذلك ل

- 1_ لتحديد وجود عنصر معين (اي لمعرفة وجود اية عناصر اجنبية غير مرغوب لها ضمن المادة المدروسة)
- 2_ في حال الجمع بين مركبين ونريد معرفة مكونات كل منهما.
- 3_ لتحديد التجانس و توزيع العناصر في بنية الهيكل (في حال وجود مركبين).
- 4_ مع العلم ان بعض العناصر الخفيفة كالليثيوم والهيدروجين لا يمكن تحديدها ويجب الانتباه الى ذلك. [16]

النتائج والمناقشة :

1-مناقشة الطيف البلوري لحبيبات المرجان المطحون:

تم قراءة الطيف الناتج بالشكل 9 على برنامج Profex واطهرت نتيجته بأن المركب الكيميائي هو كربونات كالمسيوم CaCO_3 والبنية البلورية بطور الاراغونيت الشكل 16



لم نرى في الأدب الطبي اية دراسة تبين البنية البلورية للمرجان وكانت دراستنا الاولى التي تطرقت لهذا التوصيف.

2. مناقشة طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب الناتج:

نلاحظ من الشكل 9 الطيف وجود قمم تتوافق مع اهتزازات امتطاط واخرى تتوافق مع اهتزازات انحناء الاولى روابط من نوع P-O (امتطاط الرابطة عند 1082.1290) والآخرى من نوع روابط O-P-O اهتزاز الرابطة عند طول الموجة 539.602 وتكون تابعة لمجموعة الفوسفات PO_4^{-3} والموجودة في بنية الهيدروكسي اباتيت HA وقيم تتوافق مع اهتزازات ل OH- تعود لمركب هيدروكسي الاباتيت ايضاً واخرى لجزيئات الماء الممتص ، وقيم ل C-O تابعة لمجموعة الكربونات CO_3^{-2} .

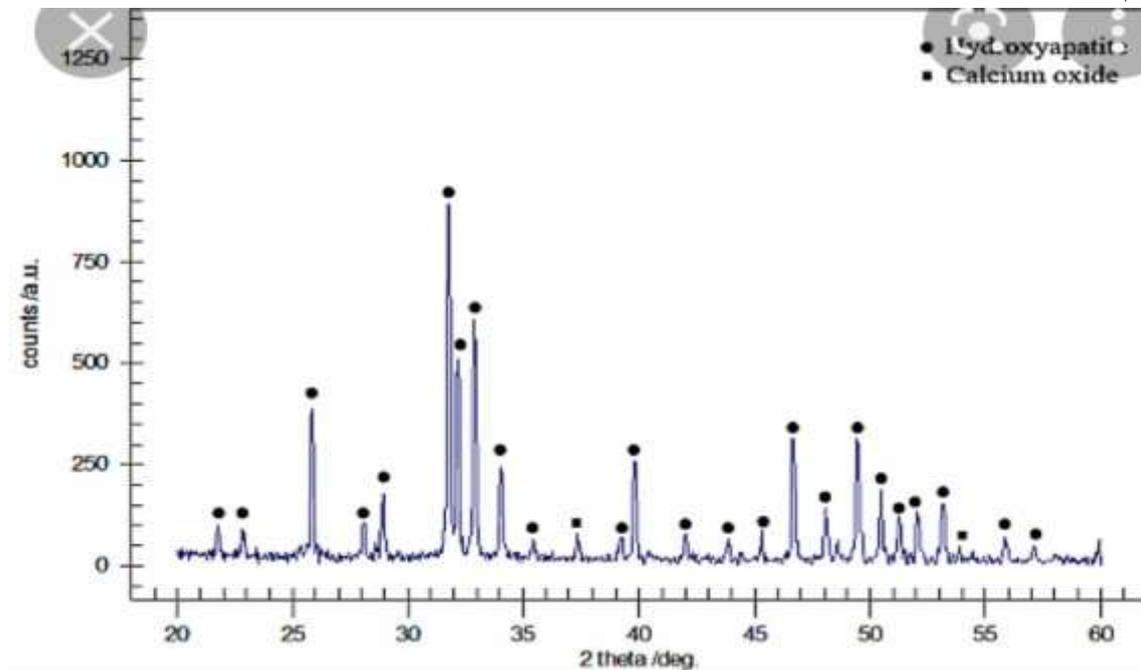
الجدول رقم 1 يوضح قيم القمم الناتجة والمقارنة مع القيم المرجعية

نموذج هيدروكسي الاباتيت	P_O امتطاط	O_P_O انحناء	C_O	OH- H2O	OH- HA
الاطوال الموجية	1082,1290	539,602	1471	1789	3221
القيم المرجعية	1038	565,603	1420	1650	3570

بمقارنة قيم القمم للمركب المحضر مع القيم الموجودة في المراجع العلمية [17] . يمكن تأكيد وجود المجموعات الوظيفية التي تشكل مركب الهيدروكسي اباتيت ، وكانت النتائج متوافقة مع كل من Nazia Bano et al, 2017 , Hien et al, 2010 , , sduy, عدى السبب ذلك بانهم استخدموا المرجان في هذه الدراسات. [18]

3. مناقشة طيف انعراج الأشعة السينية للمركب الناتج:

عند مقارنة الطيف الناتج المذكور بالشكل 10 مع الطيف المرجعي لهيدروكسي الاباتيت نلاحظ تطابق جيد لمواقع القمم المعبر عنها [19]

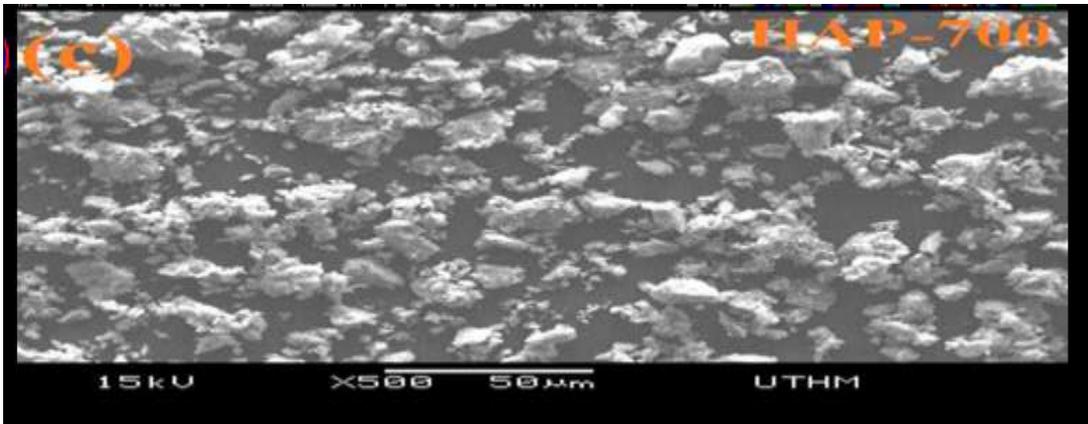


الشكل 17 يمثل الطيف المرجعي لهيدروكسي الاباتيت

كانت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع مع كل من Nazia Bano et al 2017 ، Ye Xu et al 2001 ، Abifarin et al 2019 ومختلفة عن غنام وزملاؤه 2016 ، قره علي وزملاؤه 2021، يعزى السبب ذلك لاتباع طريقة تحضير هيدروكسي اباتيت مختلفة. [20]

4-مناقشة مورفولوجية الجسيمات الناتجة:

وذلك بمقارنة الصور الملتقطة مع الصورة المرجعية التالية [21] نلاحظ وجود بعض التوافق الشكلي بينهم، اتفقنا نسبياً مع كل من Nazia Bano et al 2017 ، Abifarin et al 2019 ، Ye Xu et al 2001 وذلك بسبب اختلاف قوة التكبير حيث استخدمنا قوة تكبير 100 لمسافة 20 ميكرون بينما استخدمو 500 بمسافة 50 ميكرون [22].

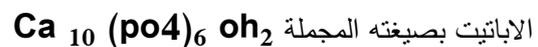


الشكل 18 يمثل صورة مرجعية لجسيمات الهيدروكسي اباتيت

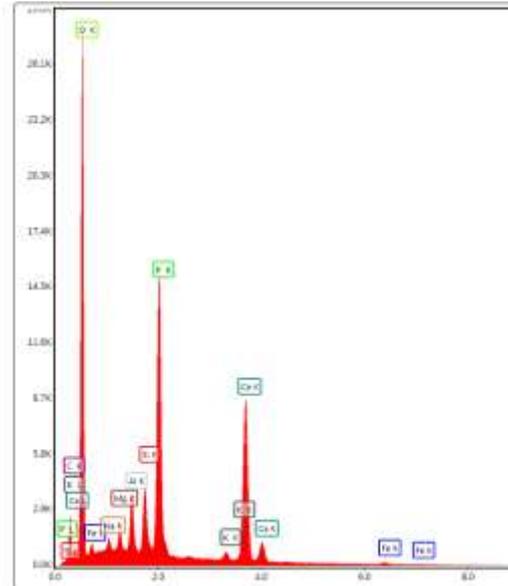
5-مناقشة التحليل العنصري لعناصر العينة الناتجة:

نلاحظ بعد التحليل العنصري وجود الكالسيوم و الفوسفور والاكسجين بنسب مرتفعة جداً ويبين الجدول التالي النسبة المئوية لكل مركب فيها وبحساب بسيط لنسبة Ca/P وهي النسبة المميزة لامكانية استخدام الهيدروكسي اباتيت الناتج بالاعمال الجراحية وقيمتها القياسية 1.67 [23]

وقد بلغت نسبة الكالسيوم الى الفوسفور في دراستنا 1.69 وبالتالي نستطيع القول ان المركب الناتج هو هيدروكسي



اتفقنا مع كل من Nazia Bano et al 2017 ، غنام وزملاؤه 2016 اختلفنا مع J.K. Abifarin et al 2019 والذي استخدم النموذج المحروق للهيدروكسي اباتيت بينما استخدمنا في دراستنا النموذج المجفف. [24]



الشكل رقم 15 مخطط بياني للعناصر الموجودة في العينة

الجدول رقم 3 يوضح النسب المئوية والذرية لعناصر العينة

13	Element	Weight %	Atomic %
14	C K	2.51	4.81
15	O K	39.68	57.12
16	Fe L	1.31	0.54
17	Na K	0.61	0.61
18	Mg K	0.82	0.77
19	Al K	2.45	2.09
20	Si K	3.11	2.55
21	P K	18	13.38
22	K K	1.09	0.64
23	Ca K	30.43	17.49

الاستنتاجات والتوصيات:

تم تحضير هيدروكسي اباتيت من المرجان بنسبة 93 % و بلغ متوسط ابعاد الحبيبات في هذه الطريقة 2 ملم، ظهر طيف FTIR على الروابط P-O و O-P-O ، كان نسبة كربونات البوتاسيوم في المرجان 99% يمكن القول أن النوع Dendrophyllia يعد مصدراً حيوياً هاماً لهيدروكسي الاباتيت مما يجعلنا نستفيد منه لاحقاً كبديل عظمي في عمليات ترميم العيوب العظمية في جراحة الفم والفكين. وقد أظهر تحليل الـEDX للعينة قيمة Ca/P المميزة للصيغة الكيميائية لهيدروكسي الاباتيت.

References:

- 1) Darnell Kaigler, B.S.; David Mooney *Tissue Engineering's Impact on Dentistry*, 2001 Journal of dental education /volume 65.issue 5 p.456_462
- 2 Doherty, M.J.; Schlag, G.; Schwarz, N.; Mollan, R.A.; Nolan, P.C.; Wilson, D.J. *Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts*. *Biomaterials* **1994**, 15, 601–608.
3. Soost, F. *Biocoral—An alternative bone substitute*. *Chirurg* **1996**, 67, 1193–1196.
4. White, E.; Shors, E.C. *Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite*. *Dent. Clin. North Am.* **1986**, 30, 49–67.
5. Alsaffar A , Hani Al-Tamimi: (2006), *Conservation of Coral Reefs in Kuwait*. *Arabian Gulf Marin Conservation Forum Abu Dhabi, United Arab Emirates* 11-14 September 2006
- 6 Sumich, J. L. (1996). *An Introduction to the Biology of Marine Life*; Sixth Edition. Dubuque, IA, USA: Wm. C. Brown. pp. 255–269
- 7 Barnes, R.D. (1987). *Invertebrate Zoology*; Fifth Edition. Orlando, FL, USA: Harcourt Brace Jovanovich, Inc.. pp. 149–163
- 8 White, E.; Shors, E.C. *Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite*. *Dent. Clin. North Am.* **1986**, 30, 49–67.
9. Tamai, N.; Myoui, A.; Tomita, T.; Nakase, T.; Tanaka, J.; Ochi, T.; Yoshikawa, H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59, 110–117.
- 10 White, R.A.; Weber, J.N.; White, E.W. *Replamineform: A new process for preparing porous ceramic, metal, and polymer prosthetic materials*. *Science* **1972**, 176, 922–924.
- 11 Petite, H.; Viateau, V.; Bensaid, W.; Meunier, A.; de Pollak, C.; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L.; Guillemin, G. *Tissue-engineered bone regeneration*. *Nat*
12. Wu, Y.C.; Lee, T.M.; Chiu, K.H.; Shaw, S.Y.; Yang, C.Y. *A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals based on the criteria for bone-tissue engineering scaffolds*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, 20, 1273–1280.
- 13 Ben-Nissan, B.; Milev, A.; Vago, R. *Morphology of sol-gel derived nano-coated coralline hydroxyapatite*. *Biomaterials* **2004**, 25, 4971–4975.
- 14 Ye Xu, Dazhi Wang*, Lan Yang, Honggao Tang *Hydrothermal conversion of coral into hydroxyapatite* *Materials Characterization* 47 (2001) 83– 87
- 15 S. S. Rahavi, O. Ghaderi, A. Monshi, and M. H. Fathi, (2017) “A comparative study on physicochemical properties of hydroxyapatite powders derived from natural and synthetic sources,” *Russ. J. Non-Ferrous Met.*, vol. 58, no. 3, pp. 276–286.
- 16 W. Khoo, F. M. Nor, H. Ardhyantana, and D. Kurniawan, (2015) “Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures,” *Procedia Manuf.*, vol. 2, pp. 196–201.
- 17 N. A. M. Barakat *et al.*, (2008) “Physicochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 8, pp. 1381–1387.
- 18 I. Hilmi, M. Rinastiti, and M. K. Herliansyah, (2011) “Synthesis of hydroxyapatite from local bovine bones for biomedical application,” *Proc. - Int. Conf. Instrumentation, Commun. Inf. Technol. Biomed. Eng. 2011, ICICI-BME 2011*, no. November, pp. 409–411.
- 19 A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujjanagul, and T. Tunkasiri, (2008) “Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 8, no. 3–4, pp. 270–272.

20. Kara ali, A, Abbas, M *Preparation of Nano-hydroxyapatite from Eggshells by Wet Chemical Method* Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (34) No. (2) 0202.
21. Gannam, N, Asaad, M, Khalil, A *The chemical compound hydroxyapatite preparation depending on the peel chicken eggs as a natural resource to be used medically.* Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (38) No. (6) 2016
22. Nazia Bano¹, Suzi Salwah Jikan *Natural Hydroxyapatite Extracted From Bovine Bone* Journal of Science and Technology, Vol. 9 No. 2 (2017) p. 22-28
23. J.K. Abifarin, D.O. Obada. *Experimental data on the characterization of hydroxyapatite synthesized from biowastes* <www.elsevier.com/locate/dib.html>
24. C. F. Ramirez-Gutierrez, A. F. Palechor-Ocampo, S. M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, and M. E. Rodríguez-García, (2016) "Cooling rate effects on thermal,