

## Effect of Manufacturing Route on Microstructure and Mechanical Properties of Calcium Phosphate/Gelatin-Starch Composite Scaffold

Faezeh Darvishian Haghighi<sup>1</sup>, \*Sahar Mollazadeh Beidokhti<sup>2</sup>, Samaneh Sahebian Saghi<sup>3</sup>, Zahra Tayarani Najaran<sup>4</sup>

1- MSc. Student, Department of Metallurgy and Materials engineering, Faculty of engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Materials and Metallurgy engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Materials and Metallurgy engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4- Associate Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

**Citation:** Darvishian Haghighi F, Mollazadeh Beidokhti S, Sahebian Saghi S, Tayarani Najaran Z. Effect of Manufacturing Route on Microstructure and Mechanical Properties of Calcium Phosphate/Gelatin-Starch Composite Scaffold. Metallurgical Engineering 2019; 22 (2): 84-95 <http://dx.doi.org/10.22076/me.2019.101173.1228>

**doi:** <http://dx.doi.org/10.22076/me.2019.101173.1228>

### ABSTRACT

There are plenty of bone damages due to different reasons these days. In order to heal of damaged area, utilizing of the scaffold is necessary. The main aim of this research is fabrication and investigation of Calcium Phosphate/Gelatin-Starch composite scaffolds. After synthesizing the Calcium Phosphate particles via sol gel route, three different methods were used to manufacture Calcium Phosphate/ Gelatin scaffolds. The method which has the porous structure was selected as the main method for fabricating Calcium Phosphate/ Gelatin-Starch scaffolds. Weight percentage of starch and applying the Gelatin-Glutaraldehyde coating were chosen as two variations. According to mechanical properties results, the sample with 60 weight percentage of Gelatin and 40 weight percentage of Starch has the highest final flexural strength which are 4.5 and 2.3 MPa for samples with and without Gelatin-Glutaraldehyde coating respectively. The SEM results show the completely porous structure with interconnected pores on the surface of coated samples and some local pores in internal parts of the scaffolds. According to the result of cell culture, these scaffolds provide surfaces that facilitate the response of stem cells related to attachment, survival, and proliferation.

**Keywords:** Scaffold, Gelatin, Starch, Calcium Phosphate Particles, flexural Strength.

Received: 16 February 2019 | Accepted: 24 November 2019

■ ..... ■

\* *Corresponding Author:*

Sahar Mollazadeh Beidokhti, PhD

Address: Department of Materials and Metallurgy engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Tel: +98 (51) 38805167

E-mail: mollazadeh.b@um.ac.ir

## تأثیر روش ساخت بر ریزساختار و خواص مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی کلسیم فسفات / ژلاتین - نشاسته

فائزه درویشیان حقیقی<sup>۱</sup>، \* سحر ملّازاده بیدختی<sup>۲</sup>، سمانه صاحبیان سقی<sup>۳</sup>، زهرا طیرانی نجاران<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی متالورژی و مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۲- استادیار، گروه مهندسی متالورژی و مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- استادیار، گروه مهندسی متالورژی و مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

### چکیده

وقوع آسیب‌های استخوانی مانند شکستگی‌های بزرگ استخوان در اثر عوامل متعدّد غیرقابل انکار است. در این موارد به داربستی نیاز است تا به کمک آن، منطقه آسیب‌دیده ترمیم شود. هدف از این پژوهش، ساخت و بررسی خواص مکانیکی داربست‌های کلسیم فسفات/ژلاتین-نشاسته است. بدین منظور پس از سنتز ذرات کلسیم فسفات به روش سل‌ژل، از سه روش مختلف برای ساخت داربست کامپوزیتی کلسیم فسفات-ژلاتین استفاده شد. در نهایت روشی که دارای ریزساختار کاملاً متخلخل و مطلوب بود، به عنوان روش بهینه جهت ساخت داربست‌های کلسیم فسفات/ژلاتین-نشاسته انتخاب گردید. در ساخت کامپوزیت‌ها از ۴ درصد وزنی مختلف نشاسته در محلول ژلاتین استفاده و تأثیر پوشش ژلاتینی دارای اتصالات عرضی با گلوکوتارآلدئید نیز بررسی گردید. طبق نتایج حاصل از آزمون مکانیکی، نمونه حاوی ۶۰ درصد ژلاتین و ۴۰ درصد نشاسته، دارای استحکام خمشی بهینه بوده که مقدار آن، ۲/۳ مگاپاسکال برای نمونه بدون پوشش و ۴/۵ مگاپاسکال مربوط به نمونه دارای پوشش است. همچنین نتایج حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، وجود شبکه کاملاً متخلخل با حفرات به هم پیوسته را در سطح نمونه‌های پوشش داده شده و حضور تخلخل‌های موضعی در ساختار متراکم را در قسمت‌های داخلی آن نشان می‌دهد. نتایج کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل نیز زیست‌سازگاری و وجود قابلیت چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی بر روی داربست را اثبات می‌کند.

واژه‌های کلیدی: داربست، ژلاتین، نشاسته، ذرات کلسیم فسفات، استحکام خمشی.

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷ | پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳

### ۱. مقدمه

هیدروکسی‌آپاتیت، فاز آلی کلاژن و آب است و حضور پروتئین‌ها در این ساختار سبب بهبود چسبندگی و پراکندگی سلول‌های استخوانی می‌شود [۴]. شیشه‌های زیست‌فعال، موادی معدنی هستند که قابلیت واکنش با مایعات فیزیولوژیکی بدن را به منظور تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت شبه استخوان دارند [۵]. مواد یادشده غالباً شیشه‌ها و شیشه‌سرامیک‌های پایه کلسیم فسفات می‌باشند [۶،۷] و در طول سه دهه اخیر در داربست‌سازی استفاده شده‌اند [۸،۹]. علی‌رغم خواص بیولوژیکی عالی، تردی و مقاومت به خستگی اندک از جمله معایب ساختارهای مذکور است. استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و ساخت داربست‌های پلیمر-سرامیک، سبب غلبه بر ضعف شیشه‌های

داربست، ماده‌ای مصنوعی است که به منظور تشکیل بافت در سه بعد و انتقال سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در مهندسی بافت بسیار حائز اهمیت است. داربست‌های ترمیم‌کننده بافت استخوان با ویژگی‌هایی چون خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری و زیست‌فعالیت مطلوب، مشابهت با استخوان و وجود ۸۰-۹۰٪ حفرات به هم پیوسته در محدوده اندازه ۶۰۰-۲۰۰ nm با هدف بازسازی بافت آسیب‌دیده استخوان طراحی می‌شوند [۱،۲]. مشکلات و اختلالات اسکلتی-عضلانی مانند شکستگی‌های متعدد غیرقابل انکار است [۳]. ایجاد و گسترش روش‌های ترمیم استخوان آسیب‌دیده، از درک ذات بیولوژیکی آن آغاز می‌شود. در واقع استخوان، نانوکامپوزیتی شامل فاز غیرآلی

\* نویسنده مسئول:

دکتر سحر ملّازاده بیدختی

نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی متالورژی و مواد.

تلفن: ۵۱۶۷-۳۸۸۰ (۵۱) ۹۸+

پست الکترونیکی: mollazadeh.b@um.ac.ir

**جدول ۱.** معرفی مواد اولیه استفاده شده به منظور فرآوری ذرات کلسیم فسفات

نام ماده	فرمول شیمیایی	نام شرکت	علت استفاده
تترا اتیل اورتوسیلیکات	$C_8H_{20}O_4Si$	Merck	پیش ماده $SiO_2$
کلسیم نیترات چهارآبه	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Merck	پیش ماده $CaO$
تری اتیل فسفات	$C_6H_{15}O_4P$	Merck	پیش ماده $P_2O_5$
اسیدنیتریک	$HNO_3$	Merck	کاهش pH
اتانول (۹۶٪)	$C_2H_5OH$	پارس الکل	حلال
آمونیاک	$NH_4OH$	اوربیتال	افزایش pH

نانوذرات هیدروکسی آپاتیت را تولید نمودند. نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی، حفراتی تا اندازه ۲۰۰ nm را نشان داد. همچنین نتایج آزمون استحکام فشاری، افزایش استحکام نهایی را از ۶/۵ MPa به ۱۰ MPa با افزایش درصد وزنی نانوذرات HA از ۲۰ به ۴۰ درصد وزنی تأیید کرد [۲۱].

هدف از پژوهش حاضر، یافتن روشی بهینه جهت ساخت داربستی با اعمال دماهای متفاوت و ساخت داربست‌های استخوانی با استفاده از پلیمرهای طبیعی ژلاتین و نشاسته، تقویت شده با ذرات شیشه سرامیک کلسیم فسفات است. ایجاد و یا عدم ایجاد ساختار داربست با استفاده از پلیمرهای ارزان و در دسترس یاد شده با استفاده از مشاهدات ریزساختاری و نیز تاثیر اعمال پوشش پلیمری بر خواص مکانیکی آنها نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## ۲. مواد و روش تحقیق

### مواد اولیه

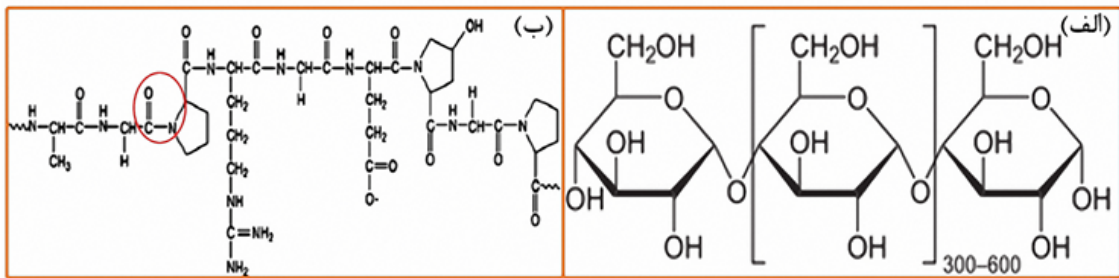
تترا اتیل اورتوسیلیکات (تئوس)، تری اتیل فسفات و کلسیم نیترات چهارآبه (مرک-آلمان) با بیش از ۹۹٪ خلوص، به ترتیب به عنوان پیش ماده‌های سیلیس، اکسید فسفر و اکسید کلسیم انتخاب شدند. مواد یاد شده بدون نیاز به فرآیند تخلیص می‌باشند و از آن‌ها در فرآوری ذرات کلسیم فسفات به روش سل ژل استفاده شد. همچنین از اتانول (پارس الکل-۹۶٪)، آمونیاک (اوربیتال) و آب دی‌یونیزه (آبتین) به منظور مواد اولیه لازم جهت انجام واکنش‌های ضروری در فرآیند سل ژل استفاده شده است.

جدول ۱، مواد اولیه را با جزئیات بیشتری معرفی می‌نماید. از ژلاتین و نشاسته خوراکی نیز به عنوان زمینه برای ساخت نمونه‌های کامپوزیتی استفاده شد. ساختار پلیمرهای یاد شده به همراه گروه‌های عاملی آن‌ها در شکل ۱ آمده است. طی تحقیقات انجام شده، استفاده از دو پلیمر زیست‌سازگار ژلاتین و نشاسته، شرایط مطلوبی از لحاظ فراهم نمودن مکان‌های مناسب جهت فعالیت‌های سلولی و نیز بهبود استحکام مکانیکی فراهم می‌کند [۲۰].

موجود و نیز شبیه‌سازی زیاد ساختار طبیعی استخوان گردید [۵].

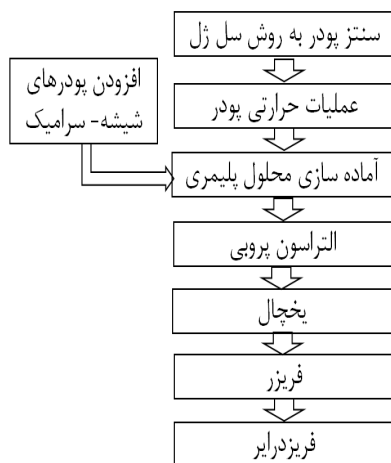
پلیمرهای یاد شده در دو گروه اصلی پلیمرهای طبیعی و سنتزی، تقسیم‌بندی می‌شوند [۱۰]. یون‌ژی‌شی و همکارانش داربست‌های حاوی درصد‌های وزنی متفاوتی از بتاتری کلسیم فسفات پوشش داده شده با پلی‌کاپرولاکتون را ساختند. طبق نتایج، نمونه حاوی ۴۰ درصد فاز کلسیم فسفات دارای بیشترین مقدار استحکام فشاری و خمشی بود که به ترتیب برابر با ۲/۷۵ و ۲/۵ مگاپاسکال می‌باشند [۱۱]. گوبائوی و همکارانش نیز داربست‌های پلی لاکتیک اسید- نانوذرات هیدروکسی آپاتیت را با بیشینه مدول خمشی ۸/۲ مگاپاسکال برای داربست حاوی ۵۰ درصد ذرات سرامیکی گزارش نمودند [۱۲]. از آنجایی که محصول تجزیه پلیمرهای سنتزی مانند پلی لاکتیک اسید در بدن، ماهیت اسیدی دارد و می‌تواند سبب التهاب در بافت شود، استفاده از پلیمرهای طبیعی در ساخت داربست، اهمیت زیادی دارد [۱۳]. در میان پلیمرهای طبیعی، کلاژن و نیز ژلاتین که از هیدرولیز جزئی کلاژن ناشی می‌شود به دلیل تشابه زیاد به فاز آلی استخوان بسیار قابل توجه است. هزینه بسیار اندک و در دسترس بودن ژلاتین نسبت به کلاژن و تشابه ساختاری زیاد به آن نیز از جمله مزایای پلیمر مذکور می‌باشد [۵، ۱۴]. آی آرسرا و همکارانش موفق به ساخت داربست‌های چیتوسان-ژلاتین/بتاتری کلسیم فسفات شدند. استحکام فشاری داربست‌های تولید شده معادل ۰/۱۱ مگاپاسکال گزارش شده است [۱۵].

در میان ترکیبات متعدد داربست‌ها، بایومواد پایه نشاسته نیز برای کاربردهای پزشکی پیشنهاد می‌شوند. سیستم‌های رهایش دارو مثالی از کاربرد نشاسته به عنوان ماده پزشکی می‌باشد [۱۶-۱۸]. وجود ساختار فوق‌العاده منظم نشاسته سبب رشد و گسترش فعالیت‌های سلولی می‌شود [۱۹]. کیتلین کاسکی و همکارانش داربست‌های کامپوزیتی نشاسته - هیدروکسی آپاتیت را ساختند. طبق نتایج، وجود نشاسته سبب بهبود استحکام فشاری از ۴/۰۷ به ۱۰/۳۵ مگاپاسکال شده است [۲۰]. جایا سون دارام و همکارانش نیز داربستی متخلخل از ژلاتین خوراکی و نشاسته ذرت حاوی



شکل ۱. (الف). ساختار خطی آمیلوز در نشاسته (ب). ساختار ژلاتین و گروه عاملی آن [۲۲،۲۳]

و توان ۱۰ به مدت ۳۵۰ ثانیه، توزیع شد. پس از افزودن ذرات شیشه-سرامیک با شرایط ذکر شده قبلی به مدت ۱۵۰ ثانیه اختلاط صورت گرفت. در روش سوم، از دمای بالا و تبخیر آب استفاده شد. بدین صورت که آماده سازی محلول ژلاتین با مقدار آب سه برابر، دمای ۱۰۰°C و با سیکل های التراسون ذکر شده، به فاصله هر ۱۵ دقیقه انجام شد، تا زمانی که آب موجود در نمونه به یک سوم مقدارش برسد. سپس مخلوط های یاد شده توسط قالب های پلی اتیلنی قالب گیری و بلافاصله درون یخچال با دمای ۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۴ ساعت، کامپوزیت ها از قالب خارج شده و در فریزر بادامی ۶۰°C- به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در مرحله نهایی نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت فریزدرای شدند. داربست های کلسیم فسفات / ژلاتین-نشاسته نیز که دارای درصد های وزنی متفاوت ژلاتین و نشاسته می باشند، طبق روش دوم تهیه شدند. بدین ترتیب که پس از استفاده از روش بن ماری برای ژلاتین، نشاسته به محلول اضافه گردید و به طور مکانیکی محلول همزده شد تا یکنواختی آن حفظ شود و ادامه مراحل کامپوزیت سازی مانند بالا انجام شد. خلاصه کلیه مراحل آماده سازی داربست های یاد شده و اطلاعات مورد نیاز نمونه ها به ترتیب در شکل ۲ و جدول ۲ آمده است.



شکل ۲. فلوچارت مراحل آماده سازی داربست های کامپوزیتی کلسیم فسفات / ژلاتین-نشاسته.

### آماده سازی پودر های شیشه-سرامیک

ابتدا پودر های کلسیم فسفات (SCP) به روش سل ژل در سیستم سه تایی 64%SiO<sub>2</sub>-28%CaO-8%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (درصد مولی) با استفاده از پیش ماده های کلسیم اکسید، سیلیکا و فسفات سنتز شد [۲۴]. سل های مورد نیاز از پیش ماده های یاد شده، آماده و سه روز در دمای محیط نگهداری شد. به منظور هیدرولیز از اتانول و مقداری آب دیونیزه و اسید نیتریک به عنوان کاتالیزور با هدف سرعت بخشیدن به واکنش استفاده شد. سپس منبع اکسید کلسیم به سل حاصل از مخلوط TEOS و TEP اضافه و جهت فراهم آمدن شرایط تشکیل هیدروکسی آپاتیت، pH به ۱۱ رسانده شد. نمونه ها به مدت ۱۴ روز در دمای محیط age و یک روز در خشک کن با دمای ۸۰°C خشک شد. پس از آن خردایش اولیه توسط هاون پرسلانی انجام و نمونه ها درون بوتله سرامیکی ریخته شد. سپس بوتله درون کوره قرار گرفته و با سرعت ۱۰°C/min به دمای ۵۰۰°C رسید. نمونه ها به مدت ۲ ساعت در این دما نگهداری و پس از آن در کوره سرد شد. در مرحله بعد، به مدت ۱ ساعت با هاون پرسلانی خرد و با الک دارای مش بندی ۴۰۰، الک گردید. در نهایت به مدت ۱ روز در بشر شیشه ای قرار گرفته تا نیروهای الکترواستاتیک آن حذف و از توده ای شدن ذرات در حین کامپوزیت سازی جلوگیری شود.

### ساخت داربست های کامپوزیتی کلسیم فسفات / ژلاتین و کلسیم فسفات / ژلاتین-نشاسته

کامپوزیت های حاوی ۸۰ درصد وزنی ذرات کلسیم فسفات / ژلاتین به سه روش آماده شدند. در روش اول، ابتدا ژلاتین با غلظت ۷ درصد وزنی در آب دی یونیزه روی همزن مغناطیسی و در دمای محیط قرار داده شد تا محلولی یکنواخت حاصل شود. در ادامه، ذرات کلسیم فسفات به محلول پلیمری اضافه شده و همزمان مخلوط حاصل، با همزن مغناطیسی همزده شد تا توزیع مطلوب ذرات در محلول انجام شود. در روش دوم، جهت آماده سازی محلول ژلاتینی از روش بن ماری پودر ژلاتین در دمای ۳۵°C استفاده شد. پس از آن محلول به فاصله هر ۱۵ دقیقه، توسط آلتراسون پرابی با تعداد سیکل ۲۰

جدول ۲. معرفی نمونه‌ها، درصد وزنی فازهای ژلاتین، نشاسته و SCP و دمای ساخت داربست‌های کامپوزیتی کلسیم فسفات/ژلاتین-نشاسته.

نام نمونه	دمای ساخت (°C)	درصد وزنی نشاسته	درصد وزنی ژلاتین	درصد وزنی پودر SCP
G1	۲۵	۰	۱۰۰	۸۰
G2	۳۵	۰	۱۰۰	۸۰
G3	۱۰۰	۰	۱۰۰	۸۰
100G	۳۵	۰	۱۰۰	۸۰
60G	۳۵	۴۰	۶۰	۸۰
50G	۳۵	۵۰	۵۰	۸۰
40G	۳۵	۶۰	۴۰	۸۰
100GC	۳۵	۰	۱۰۰	۸۰
60GC	۳۵	۴۰	۶۰	۸۰
50GC	۳۵	۵۰	۵۰	۸۰
40GC	۳۵	۶۰	۴۰	۸۰

\* حرف C نشان‌دهنده نمونه‌های دارای پوشش (Coverage) می‌باشد.

رابطه زیر، درصد تخلخل داربست‌ها محاسبه گردید:

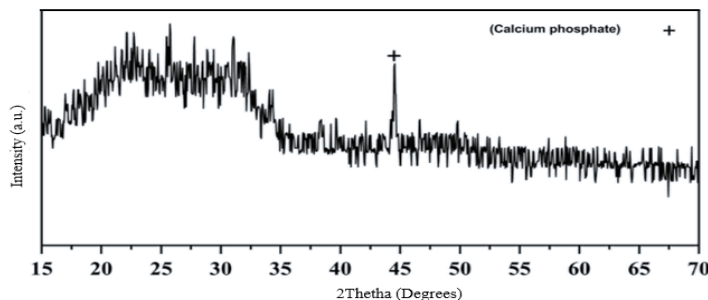
رابطه (۱):

$$\text{درصد تخلخل} = \frac{(\text{وزن اشباع} - \text{وزن خشک})}{(\text{وزن اشباع} - \text{وزن غوطه‌وری})} \times 100$$

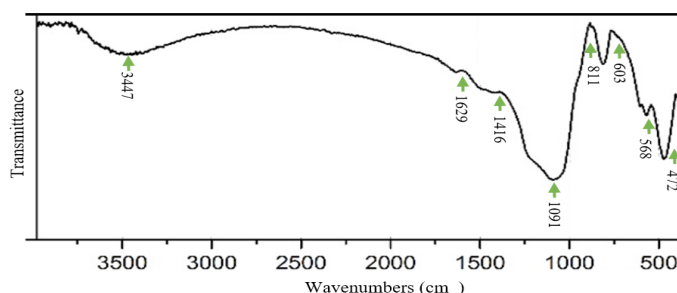
همچنین به منظور بررسی رفتار زیستی داربست، از مجاورت داربست با سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل استفاده شد. بدین صورت که ابتدا کشت و رشد کافی سلول‌های یادشده در محیط کشت DMEM در انکوباتور با دمای °C ۳۷ و حاوی ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> انجام و از سلول‌ها در پاساژ پنجم استفاده شد. سپس داربست‌ها به کمک اتانول ۷۰٪ و نیز محلول شست‌وشوی PBS استریل شدند. پس از آن داربست‌های استریل شده درون میکروتیوب‌های ۲ ml گذاشته شد. سپس ۵۰۰ µl سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲×۱۰<sup>۴</sup> سلول برروی داربست‌ها ریخته شد و به مدت ۵ ساعت درون انکوباتور نگهداری گردید. پس از آن، محتویات داخل هر میکروتیوب به یک خانه از ظروف ۲۴ خانه منتقل و داربست‌ها به مدت زمان ۵ روز درون انکوباتور نگهداری شدند. در مرحله نهایی باهدف تعیین درصد سلول‌های زنده برروی داربست‌ها از آنالیز Viability استفاده شد. بدین منظور پس از گذشت مدت زمان معین از ریختن رنگ آلماربلو برروی داربست‌ها، از دستگاه Microplate – Reader برای خوانش عدد جذب استفاده شد. پس از کشت سلول نیز مجدداً ریزساختار داربست توسط میکروسکوپ SEM مورد بررسی قرار گرفت.

#### مشخصه‌یابی پودر SCP و داربست‌های کامپوزیتی

جهت خشک‌نمودن نمونه‌های کامپوزیتی از دستگاه فریزدرایر مدل FD-10V استفاده شد. آنالیز فازی پراش پرتو ایکس PHILIPS PW1730 توسط دستگاه XRD (X-ray diffraction) با مشخصات x-ray Tube: Cu LEF λ=1/540598°A انجام شد. به‌منظور تعیین گروه‌های ساختاری نمونه موجود از آنالیز FTIR توسط دستگاه Thermo Nicolet مدل AVATAR 370 استفاده شد. بدین صورت که از مقدار جزئی نمونه پودری به همراه ماده مرجع KBr قرصی ساخته شده، تحت تابش نور قرار گرفته و آنالیز انجام می‌شود. همچنین برای تعیین اندازه ذره نمونه از آنالیز تعیین اندازه ذرات (PSA) توسط دستگاه Particle Size Analyzer-CORDOUAN مدل Vasco3 استفاده شد. برای این منظور مقدار جزئی از نمونه در 10CC (۰/۰۱ گرم در لیتر) آب دی‌یونیزه توزیع و محلول رقیق ساخته شده و آنالیز اندازه ذرات صورت گرفت. آزمون استحکام خمشی سه نقطه توسط دستگاه SANTAM، فاصله دو تکیه‌گاه برابر با ۱۵ mm و با سرعت ۰/۲ mm/min برای تمام داربست‌ها با ابعاد 4×4×27mm<sup>3</sup> با ۴ بار تکرار انجام شد. بررسی‌های ریزساختاری میکروسکوپی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی Oxford England مدل S-360 در حالت تصویربرداری توسط الکترون‌های ثانویه برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. همچنین به‌منظور اطلاع از درصد تخلخل داربست‌های مذکور، از روش ارشمیدسی به کمک بدین صورت که از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ g استفاده شد. ابتدا داربست به صورت خشک توزین شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب دی‌یونیزه قرار گرفت. در مرحله بعد، وزن اشباع و نیز وزن غوطه‌وری آن اندازه‌گیری شد. پس از آن به کمک

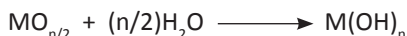


شکل ۳. نمودار آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) پودر SCP.



شکل ۴. نمودار طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) پودر SCP.

### واکنش تراکم



معمولاً آلکواکسیدها به عنوان ترکیبات آغازگر استفاده می‌شوند که موادی آلی-فلزی و به شکل  $M(OR)_n$  فلز با ظرفیت  $n$ ،  $R$ : گروه آلکیل  $(C_xH_{2x+1})$  می‌باشند. آلکواکسیدها توسط واکنش‌های تراکم و هیدرولیز، به شبکه‌های سه‌بعدی تبدیل می‌شوند.

طی ۳ روز نگهداری سل‌ها در دمای اتاق و با درب بسته، واکنش هیدرولیز انجام می‌شود. به‌عنوان مثال در تهیه سل تئوس، تترااتیل‌اورتوسیلیکات (پیش‌ماده سیلیس) با نسبتی معین از آب و اتانول مخلوط شده و ۳ روز در دمای اتاق نگهداری می‌شود. در طی این مدت، گروه‌های سیلانول  $(SiOH)$  تشکیل می‌شود. بنا به دلایل ذکر شده، فرآیند سل‌ژل در مرحله اول و نیز در حین پیرسازی یا aging به زمان طولانی نیازمند است [۲۵،۲۶].

شکل ۳ نمودار حاصل از آنالیز پراش پرتو ایکس پودر SCP سنتز شده در سیستم سه‌تایی  $64\%SiO_2-28\%CaO-8\%P_2O_5$  به روش سل‌ژل را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، پودر در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد، بخش عظیمی از ریزساختار آن آمورف و تنها بخش اندکی از آن به فاز بلورین کلسیم فسفات تبدیل شده است. در حقیقت با شرایط عملیاتی حرارتی ذکر شده، تمایلی به تبلور در سیستم وجود ندارند [۲۷].

شکل ۴ طیف FTIR پودر SCP را نشان می‌دهد. عدددهای موج  $472\text{ cm}^{-1}$ ،  $811\text{ cm}^{-1}$  مربوط به حالت ارتعاشی خمشی پیوند

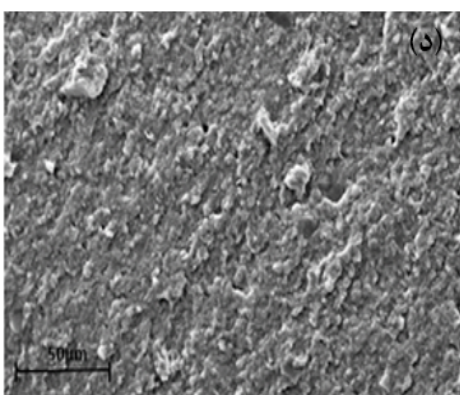
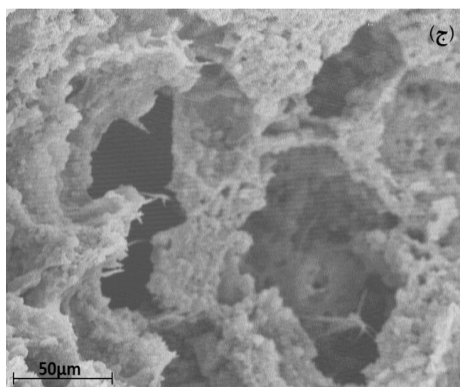
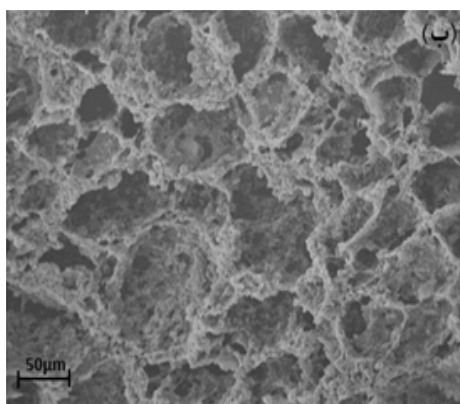
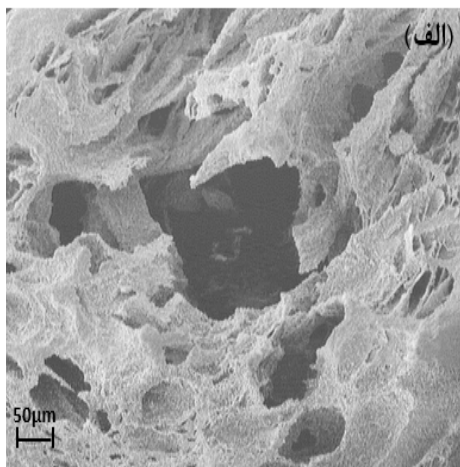
### ۳. نتایج و بحث

#### ارزیابی خواص پودر SCP

هنگام فرآوری ذرات به روش سل‌ژل، اتفاقاتی در ساختار رخ می‌دهد که منجر به تشکیل شبکه‌ای غیرآلی یا محلولی کلئیدی می‌گردد. به منظور شکل‌دهی شبکه مذکور از یک محلول، یک مرحله تشکیل شبکه مورد نیاز است. این مرحله عمدتاً به ساختار سل بستگی دارد و به دو مکانیزم تقسیم می‌شود. اولین مکانیزم بر مبنای رشد مولکول‌ها است که ماکرومولکول‌ها تشکیل شبکه نامحدود می‌دهند. این مکانیزم باعث تولید ژل‌های پلیمریزه شده می‌شود که در هیدرولیز توسط اسیدهای کاتالیزور و تراکم سیلیکات‌های تتراآلکیل مرسوم می‌باشد. مکانیزم دیگر بر اساس تجمع ذرات کلئیدی از یک سل کلئیدی می‌باشد که به یک سل نسبتاً پایدار به عنوان حد واسط نیاز دارد. به عبارتی کل فرآیند توسط مرحله رسوب‌گذاری بدون هیچ‌گونه فاز سل خاتمه می‌یابد. مرحله تشکیل شبکه در این سل‌ها شامل تجمع ذرات در یک شبکه نامحدود می‌شود. در حضور سیلیکات‌های کاتالیز شده توسط اسید از آلکواکسیدها، فرآیند پلیمر شدن به راحتی می‌تواند توسط آب کنترل شود که اگر گروه های  $-SiOR$  = بتوانند باقی بمانند تا وزن مولکولی را کاهش دهند، موجب تشکیل سل‌های پایدار می‌گردند. به‌طور کلی ۲ واکنش می‌توانند فرآیند سل‌ژل را توصیف نمایند:

#### واکنش هیدرولیز





شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از کامپوزیت‌های (الف). G1 (ب و ج). G2 (د). G3.

Si-O-Si و  $1091 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به حالت کشش نامتقارن باند Si-O-Si می‌باشد [۲۸-۳۲]. جذب در عددهای موج  $568 \text{ cm}^{-1}$  و  $603 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های فسفات ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) می‌باشد [۳۳]. همچنین ذکر شده که جذب در محدوده  $600$  تا  $570$  مربوط به ارتعاشات نامتقارن باند P-O در کلسیم فسفات آمورف می‌باشد [۳۴]. در عدد موج  $1416$  جذب مربوط به گروه‌های کربوکسیلات یا جایگزینی کربنات نوع  $\beta$  یا گروه‌های کربنات که جایگزین  $\text{SiO}_4^{4-}$  یا  $\text{PO}_4^{3-}$  در شبکه هیدروکسی آپاتیت شده‌اند، می‌باشد. پیک مشاهده شده در عدد موج  $1629$  به سبب حضور و تبلور آب در ساختار شیشه است. همچنین عددهای موج در محدوده  $3670 \text{ cm}^{-1}$  تا  $2908 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده حضور OH<sup>-</sup> مربوط به پیوند Si-OH می‌باشد [۳۳] در عدد موج  $3447$  نیز ارتعاشات باند OH وجود دارد [۳۰].

همچنین طبق نتایج حاصل از آنالیز تعیین اندازه ذرات (PSA)، میانگین اندازه قطر ذرات کلسیم فسفاتی  $232/26 \pm 235/12$  نانومتر است.

#### ارزیابی ساختاری و خواص مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی

نتایج حاصل از تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی کامپوزیت‌های کلسیم فسفات/ ژلاتین در شکل ۵ آمده است. در شکل ۵ الف ریزساختار نمونه G1 قابل مشاهده است. با توجه به شکل، داربست‌های تولید شده در دمای محیط دارای تخلخل‌هایی در محدوده اندازه  $50-300 \mu\text{m}$  می‌باشند. اما این تخلخل‌ها در کل ساختار به چشم نمی‌خورند و به صورت موضعی و پراکنده هستند. در واقع ریزساختار نمونه، در تمام مناطق، متخلخل نشده و تعداد تخلخل کم به وجود آمده دارای ابعاد بسیار بزرگی است. قرار گرفتن ژلاتین تحت شرایط بن‌ماری و در دمای میانی، سبب ایجاد شبکه‌ای کاملاً متخلخل با تخلخل‌های به هم پیوسته شده که در شکل ۵ ب و ج قابل مشاهده است. شکل ۵ د مربوط به نمونه G3 می‌باشد که تحت دمای  $100^\circ\text{C}$  تهیه شده است. مشاهده می‌شود که از ریزساختار متخلخل هیچ اثری نیست. در نتیجه در قسمت روش‌های مختلف تولید داربست، نمونه G2 به عنوان نمونه مطلوب انتخاب و جهت ساخت داربست‌های نشاسته-ژلاتین در مرحله بعد از روش بن‌ماری استفاده شد. همان‌گونه که پیش‌تر نیز اشاره شد، در ساخت داربست‌های استخوانی، توجه به رفتار مکانیکی استخوان حائز اهمیت است. استخوان از اجزاء اصلی سیستم اسکلتی-عضلانی بدن انسان است که تحت بار رشد نموده و انواع نیروها به آن وارد می‌شود. همچنین از اندام‌های حیاتی بدن حفاظت نموده و چهارچوبی برای حرکت فراهم می‌نماید. وظیفه اصلی استخوان در بدن انسان، حفاظت از بدن است که این مسئله می‌تواند با پاسخ‌های مکانیکی استخوان نسبت به

نهایی قطعات ترمیم‌کننده استخوان از جمله داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک، طی بارگذاری‌های فشاری به میزان گسترده‌ای گزارش شده‌است. همچنین از آنجایی که هدف پژوهش حاضر، محدود نمودن کاربرد داربست برای استخوان خاصی از بدن است و خمش، توزیع فشار و کشش را به‌صورت همزمان در نظر می‌گیرد، استحکام خمشی نهایی نمونه‌ها قابل توجه است.

نتایج حاصل از آزمون استحکام خمشی سه نقطه و درصد افزایش طول داربست‌های کلسیم‌فسفات/ژلاتین-نشاسته در جدول‌های ۳ و ۴ و نیز شکل ۶ و ۷ آمده‌است. با توجه به شکل مذکور و نیز همان‌طور که در ادامه در تصاویر میکروسکوپی نمونه‌ها مشاهده خواهد شد، اعمال پوشش پلیمری ژلاتین-گلوکارآلدئید، سبب افزایش درصد افزایش طول نمونه‌ها و استحکام خمشی نهایی شده است [۵,۳۸]. پوشاندن حفرات، ریزترک‌ها و عیوب سطحی احتمالی موجود سبب افزایش چقرمگی ماده است [۳۹]. همچنین نمونه 60GC با استحکام نهایی ۴/۵ مگاپاسکال به‌عنوان نمونه بهینه معرفی می‌شود. هنگامی که یک پروتئین مانند ژلاتین، پلی‌ساکاریدی مانند نشاسته و آب باهم مخلوط می‌شوند، اندرکنش‌های مختلفی بین مولکول‌های آن مانند پروتئین-پروتئین، پروتئین-پلی‌ساکارید، پلی‌ساکارید-پلی‌ساکارید و نیز ارتباط هرکدام با آب ایجاد می‌شود [۴۰]. این رخداد سبب ایجاد محلول همگن و نیز ساختار یکپارچه در کامپوزیت می‌شود که به عواملی از جمله نسبت ژلاتین و نشاسته و در نتیجه توانایی ایجاد ارتباط بین گروه‌های عاملی آن‌ها وابسته است. بنابراین برقراری پیوندهای موثر بین گروه عاملی آمیدی در ژلاتین و نیز گروه ساکاریدی نشاسته مانند آمیلوز در نمونه 60GC علاوه بر وجود شرایط مطلوب نمونه‌سازی از جمله دلایل بالا بودن استحکام خمشی نسبت به سایر نمونه‌ها است. تردی نمونه‌ها به دلیل حضور مقدار قابل توجه فاز تقویت‌کننده شیشه‌ای و نیز حضور درصد تخلخل بالا در ریزساختار داربست‌های کامپوزیتی اصلی‌ترین دلیل بالا بودن انحراف معیارهای ارائه‌شده طی بارگذاری مکانیکی می‌باشد. به همین دلیل، اندازه‌گیری استحکام خمشی

بار، به‌صورت کمی اندازه‌گیری شود. بارهای وارد بر استخوان شامل نیروهای وارد بر آن طی انجام فعالیت‌های روزانه و نیز نیروهایی است که طی آسیب‌ها و اتفاقات ناگوار بر بدن وارد می‌شود [۳۵]. نیروهایی که طی تصادف، آسیب‌های ورزشی و غیره به استخوان وارد می‌شوند فشاری، کششی، پیچشی و یا خمشی می‌باشند. به‌طور کلی، روش‌ها و آزمون‌های زیادی به‌منظور تعیین استحکام استخوان استفاده شده‌اند.

آزمون کشش که طی آن، بیشترین میزان کرنش در ناحیه میانی رخ می‌دهد و پس از انجام آزمون، حالت دمبلی مانند در نمونه ایجاد می‌کند. اگرچه اعداد گزارش‌شده طی آزمون مذکور به مقدار واقعی نزدیک است، اما به دلیل نیاز به نمونه در ابعاد بزرگ، استفاده از آن با محدودیت رو به رو می‌باشد [۳۵]. مهم‌ترین مزیت استفاده از آزمون فشاری نیاز به نمونه‌هایی در ابعاد بسیار کوچک است اما نتایج حاصل از آن به اندازه آزمون کشش، دقیق نمی‌باشد و ممکن است در بخش‌هایی از نمونه، تمرکز تنش شدید اتفاق بیفتد.

اندازه‌گیری خواص مکانیکی استخوان در حالت برشی نیز، با انجام آزمون پیچش میسر می‌شود که در آن به اعمال یک گشتاور به نمونه، نیاز است. همچنین می‌توان از آزمون خمش برای اندازه‌گیری خواص بایومکانیکی استخوان و داربست‌های استخوانی استفاده نمود. علاوه بر این، بررسی رفتار خستگی استخوان و قطعات ترمیم‌کننده آن نیز، طی بارگذاری‌های فشاری، کششی، پیچشی و خمشی امکان‌پذیر می‌باشد [۳۵]. اکسونگ و همکارانش چقرمگی و استحکام خمشی استخوان افرادی با سنین مختلف را به کمک آزمون خمش سه نقطه اندازه‌گیری نمودند [۳۶]. هامبلی‌ریدها و همکارانش نیز پس از بررسی استحکام خمشی استخوان با استفاده از آزمون خمش سه نقطه، نتایج حاصل را مدلسازی کردند [۳۷]. علاوه بر این، اندازه‌گیری استحکام فشاری و یا کششی، بستگی به محل استفاده داربست در بدن دارد. معمولاً استخوان‌های تحتانی بدن انسان، بارهای فشاری را تحمل می‌کنند و استخوان‌های بالایی مانند استخوان‌های دست، تحت نیروهای کششی می‌باشند. اندازه‌گیری استحکام

جدول ۳. مقایسه استحکام خمشی نهایی و میزان افزایش طول داربست‌های کلسیم‌فسفات/ژلاتین-نشاسته بدون پوشش ژلاتین-گلوکارآلدئید.

40G	50G	60G	100G	درصد افزایش طول
۳±۰	۳±۰	۳±۰	۵±۲	
۰,۹۵±۱,۱	۱,۴±۱,۰	۲,۲±۰,۵	۴,۱۳±۱,۴	استحکام خمشی نهایی (MPa)

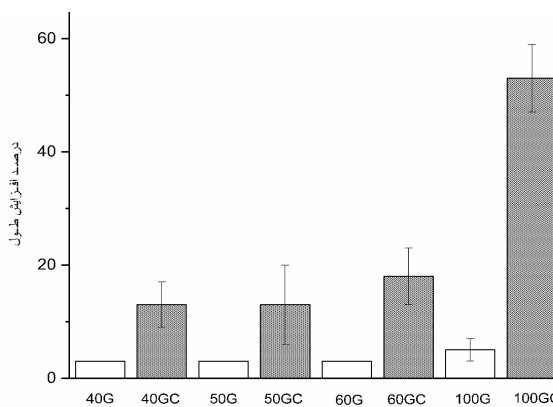
جدول ۴. مقایسه استحکام خمشی نهایی و میزان افزایش طول داربست‌های کلسیم‌فسفات/ژلاتین-نشاسته دارای پوشش ژلاتین-گلوکارآلدئید.

40GC	50GC	60GC	100GC	درصد افزایش طول
۱۳±۴	۱۳±۷	۱۸±۵	۵۳±۶	
۲,۸±۰,۸	۲,۶±۱,۱	۴,۳۴±۰,۵	۱,۹۹±۱,۳	استحکام خمشی نهایی (MPa)

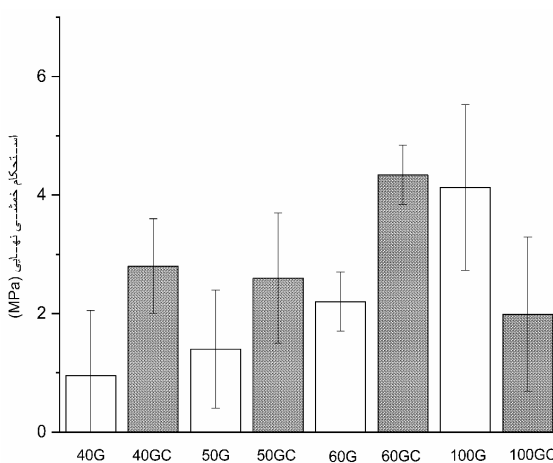


شکل ۸. الف، برای نمونه 100G ذرات سرامیکی توده‌ای شده با توزیع غیریکنواخت در زمینه مشاهده می‌شود. همان‌طور که در بزرگنمایی شکل مشخص است، در مناطقی که فاز پلیمری مقدار بیشتری دارد، حفرات در آستانه تشکیل و رشد می‌باشند، اما در سایر نواحی چنین حفراتی دیده نمی‌شود. همچنین نتایج حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشان می‌دهد که شبکه کاملاً متخلخل با تخلخل‌های به هم پیوسته در ریزساختار تمامی نمونه‌ها وجود ندارد. عدم توزیع یکنواخت فاز سرامیکی در زمینه پلیمری نیز دیده می‌شود. در مناطقی که توده‌ای شدن پودر اتفاق افتاده، عدم حضور تخلخل یا تخلخل‌های بسیار ریز مشاهده می‌شود در حالی که در حضور فاز پلیمری، تخلخل‌هایی تا اندازه حدود  $150 \mu\text{m}$  با ایجاد یک شبکه به هم پیوسته به چشم می‌خورد. در این نواحی، ساختار داربست کاملاً ایجاد شده است. در شکل ۸. ب که مربوط به نمونه حاوی ۵۰ درصد ژلاتین می‌باشد، در بزرگنمایی نسبتاً پایین، یک ساختار متراکم، ذرات توده‌ای شده و حفرات بسیار ریز موضعی مشهود است و در بزرگنمایی بالا، حفراتی در محدوده اندازه  $5-15 \mu\text{m}$  که روی آن‌ها غشاهای پلیمری قرار گرفته، دیده می‌شود. حضور موفق غشاهای مذکور، در نقاطی که با علامت پیکان مشخص شده کاملاً مشهود است. این مناطق، بهترین مکان برای جوانه‌زنی سلول است چراکه از چسبندگی مطلوبی برخوردار می‌باشد [۲]. پراکندگی و تعداد کم مناطق یادشده در نمونه 50G کاربرد آن را در مهندسی بافت محدود می‌کند. شکل ۸. ج، نمایانگر ایجاد یک شبکه سه‌بعدی و به هم پیوسته از تخلخل‌هایی در محدوده اندازه  $150-50 \mu\text{m}$  در نمونه 60GC می‌باشد. این تصویر مربوط به مناطقی است که تجمع فاز پلیمری به مقدار کافی وجود داشته و عدم حضور ذرات سرامیکی در این شبکه متخلخل بر روی غشاهای ژلاتین-نشاسته مشهود است. همچنین، وقوع پارگی و شکست از غشاهای پلیمری مشخص است. مرز بین پوشش و کامپوزیت نیز در شکل ۸. د قابل مشاهده است. حضور این پوشش، می‌تواند محل مناسبی برای فعالیت‌های سلولی سطحی باشد. همچنین پس از ۵ روز کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل بر روی داربست نیز حضور سلول‌های یادشده بر روی دیواره‌های داربست قابل مشاهده است. شکل ۹ نیز تصویر داربست یادشده را پس از کشت سلول نشان می‌دهد. حضور سلول بنیادی بر روی سطح دیواره داربست با علامت پیکان مشخص شده است. همچنین نتایج آنالیز Viability حضور ۷۸٪ سلول زنده را بر روی داربست و نیز داخل حفرات موجود در آن تایید می‌کند.

نهایی هر سری از داربست‌ها، بیش از سه بار تکرار شده است. به‌طور کلی هرچه درصد فاز تقویت‌کننده در داربست‌های کامپوزیتی بیشتر شود، درصد تخلخل نمونه کاهش و استحکام نهایی افزایش می‌یابد [۴۱]. در واقع عامل یادشده اصلی‌ترین عامل تفاوت در درصد تخلخل داربست می‌باشد. با توجه به حضور مقدار برابر فاز تقویت‌کننده در داربست‌های کامپوزیتی پژوهش حاضر، دو نمونه 60G و 60GC به روش ارشمیدسی تخلخل‌سنجی شدند. نتایج نشان می‌دهد که نمونه 60G دارای ۴۳/۵ درصد تخلخل و نمونه 60GC دارای ۴۸ درصد تخلخل می‌باشد. با توجه به مقدار یکسان فاز تقویت‌کننده، علت تفاوت می‌تواند به حضور پوشش ژلاتین-گلو تار آلدهید بر روی سطح داربست نمونه 60GC مربوط باشد. اعمال پوشش پلیمری بر سطح داربست، سبب افزایش جذب آب، تورم لایه پلیمری و در نتیجه افزایش درصد تخلخل می‌شود.

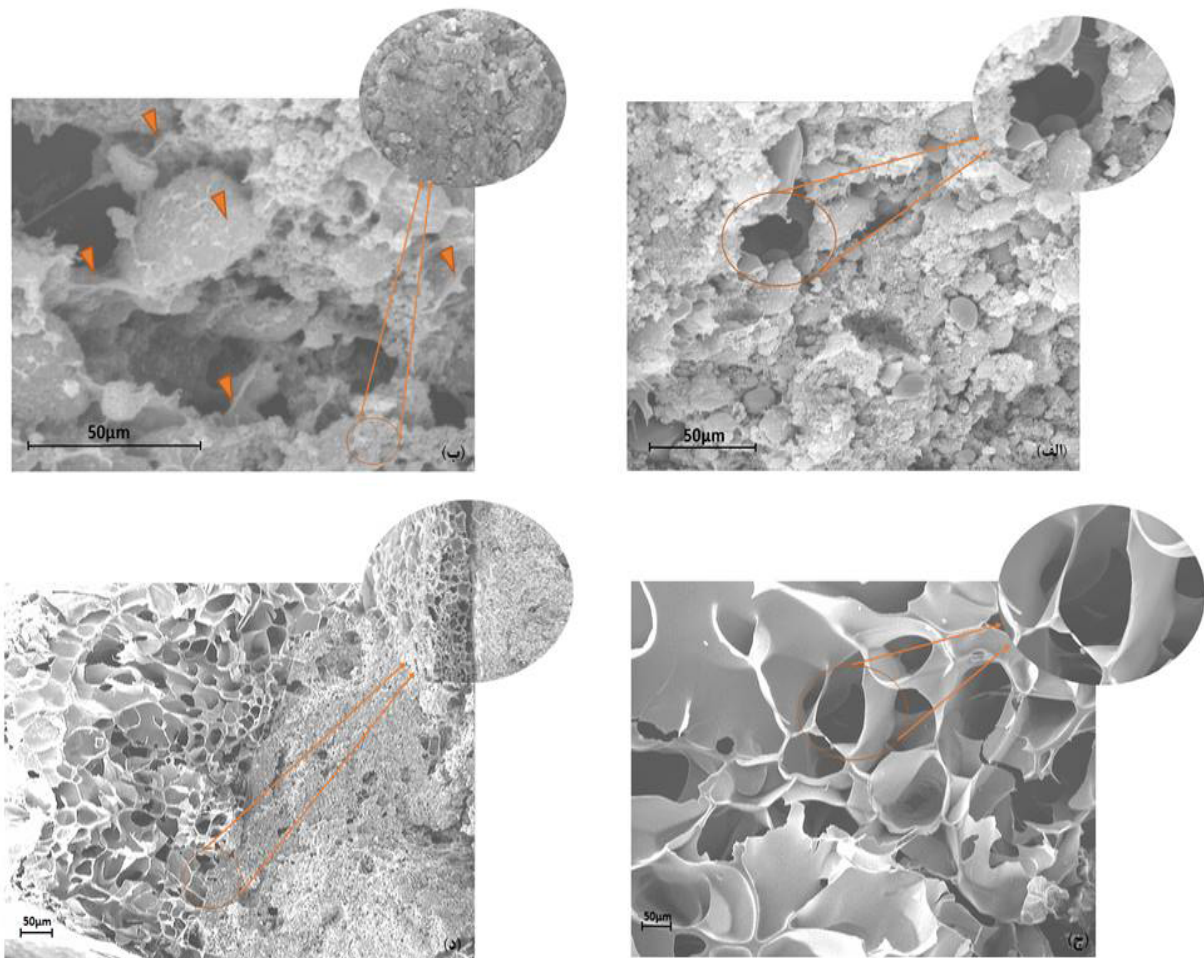


شکل ۶. مقایسه درصد افزایش طول داربست‌های کامپوزیتی کلسیم فسفات/ژلاتین-نشاسته طی آزمون استحکام خمش سه‌نقطه.



شکل ۷. مقایسه استحکام خمشی نهایی داربست‌های کامپوزیتی کلسیم فسفات/ژلاتین-نشاسته طی آزمون استحکام خمش سه‌نقطه.

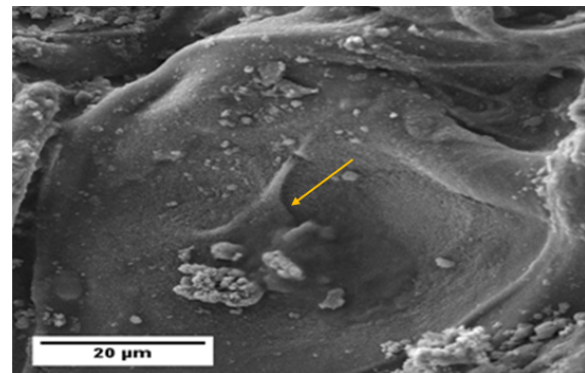
تصاویر سطح شکست داربست‌های کامپوزیتی طی انجام آزمون خمش سه‌نقطه در شکل ۸ آمده است. در



شکل ۸. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح شکست نمونه‌های (الف). 100G (ب). 50G (ج) و (د). 60G.

نهایی و میزان افزایش طول نمونه‌ها در اثر اعمال پوشش ژلاتین-گلوآرآلدهید مشهود است که به علت پوشیده شدن عیوب موجود در سطح و افزایش چقرمگی می‌باشد. خواص مکانیکی مطلوب و ریزساختار مناسب در نمونه ۶۰GC سبب یافتن نسبت بهینه نشاسته-ژلاتین در نتیجه ارتباط موفق ساختارهای مولکولی آن‌ها می‌باشد.

همچنین نتایج کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل نیز چسبندگی و تکثیر سلول‌های یادشده را بر روی داربست تایید می‌کند.



شکل ۹. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح شکست داربست پس از ۵ روز از کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل.

## References

- [1] D. Iannazzo, A. Pistone, M. Salamò, S. Galvagno, Hybrid ceramic/polymer composites for bone tissue regeneration, 2017. doi:10.1016/B978-0-08-100789-1.00006-X.
- [2] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, Mater. Sci. Eng. C. 78 (2017) 1246-1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [3] M. Meskinfam, Polymer scaffolds for bone regeneration, Elsevier Ltd., 2017. doi:10.1016/B978-0-08-100737-2.00017-0.

## ۴. نتیجه‌گیری

ساخت کامپوزیت در دمای ۳۵°C با توجه به دمای ذوب پایین ژلاتین خوراکی، بهترین انتخاب برای ایجاد ریزساختار متخلخل و ایجاد شبکه‌ای به هم پیوسته از حفرات است. طبق نتایج حاصل از آزمون مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی حاوی ذرات کلسیم فسفات/نشاسته-ژلاتین، افزایش استحکام خمشی

- [4] S. Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, C. Liu, X. Yang, Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. R Reports*. 80 (2014) 1–36. doi:10.1016/j.mser.2014.04.001.
- [5] M.J. Woźniak, A. Chlanda, P. Oberbek, M. Heljak, K. Czarnecka, M. Janeta, L. John, Binary Bioactive Glass Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering – Structure and Mechanical Properties in Micro and Nano Scale. A preliminary study, 2018. doi:10.1016/j.micron.2018.12.006.
- [6] R. Langer, J.P. Vacanti, N. Series, N. May, *Poly tr au ma* 1/2006, 260 (2006) 1–102. doi:10.1126/science.8493529.
- [7] A. Vats, N.S. Tolley, J.M. Polak, J.E. Gough, Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications, *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 28 (2003) 165–172. doi:10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x.
- [8] M. Varkey, S.A. Gittens, H. Uludag, Growth factor delivery for bone tissue repair: an update, *Expert Opin Drug Deliv.* 1 (2004) 19–36. doi:10.1517/17425247.1.1.19.
- [9] R.Z. Legeros, J.P. Legeros, Hydroxyapatite, *Bioceram. Their Clin. Appl.* (2008) 367–394. doi:10.1533/9781845694227.2.367.
- [10] C. Koski, B. Onuike, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Starch-hydroxyapatite composite bone scaffold fabrication utilizing a slurry extrusion-based solid freeform fabricator, *Addit. Manuf.* 24 (2018) 47–59. doi:10.1016/j.addma.2018.08.030.
- [11] Y.Z. Shi, J. Liu, L. Yu, L.Z. Zhong, H.B. Jiang,  $\beta$ -TCP scaffold coated with PCL as biodegradable materials for dental applications, *Ceram. Int.* 44 (2018) 15086–15091. doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.142.
- [12] G. Wei, P.X. Ma, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 25 (2004) 4749–4757. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.005.
- [13] Z. Xiong, Y. Yan, S. Wang, R. Zhang, C. Zhang, Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition, *Ser. Mater.* 46 (2002) 771–776. doi:10.1016/S1359-6462(02)00071-4.
- [14] S. Kuttappan, D. Mathew, M.B. Nair, Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1390–1401. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.043.
- [15] I.R. Serra, R. Fradique, M.C.S. Vallejo, T.R. Correia, S.P. Miguel, I.J. Correia, Production and characterization of chitosan/gelatin/ $\beta$ -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 55 (2015) 592–604. doi:10.1016/j.msec.2015.05.072.
- [16] P.X. Ma, R. Langer, Degradation, structure and properties of fibrous nonwoven poly(glycolic acid) scaffolds for tissue engineering, *Polym. Med. Pharm.* 394 (1995) 99–104. doi:doi:10.1557/PROC-394-99.
- [17] L.L. Hench, H.A. Paschall, Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle, *J. Biomed. Mater. Res.* 7 (1973) 25–42. doi:10.1002/jbm.820070304.
- [18] Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials, 2 (n.d.).
- [19] I.K. Kang, Y. Ito, Y. Imanishi, M. Sisido, Synthesis, antithrombogenicity and gas permeability of copolypeptides having silyl groups or dimethylsiloxane oligomers substituted in the side chains, *Int. J. Biol. Macromol.* 10 (1988) 169–177. doi:10.1016/0141-8130(88)90044-X.
- [20] S. Dasgupta, K. Maji, S.K. Nandi, Investigating the mechanical, physiochemical and osteogenic properties in gelatin-chitosan-bioactive nanoceramic composite scaffolds for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo, *Mater. Sci. Eng. C*. 94 (2019) 713–728. doi:10.1016/j.msec.2018.10.022.
- [21] J. Sundaram, T.D. Durance, R. Wang, Porous scaffold of gelatin-starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying, *Acta Biomater.* 4 (2008) 932–942. doi:10.1016/j.actbio.2008.01.019.
- [22] S. Tabasum, M. Younas, M.A. Zaeem, I. Majeed, M. Majeed, A. Noreen, M.N. Iqbal, K.M. Zia, A review on blending of corn starch with natural and synthetic polymers, and inorganic nanoparticles with mathematical modeling, *Int. J. Biol. Macromol.* 122 (2019) 969–996. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.092.
- [23] A. Duconseille, T. Astruc, N. Quintana, F. Meersman, V. Sante-Lhoutellier, Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 360–376. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.06.006.
- [24] SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, in: 2016.
- [25] C.J. Brinker, I. Introduction, Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects of Structure, (2) (3) 1.1., 100 (1988) 31–50.
- [26] L. Eindhoven, NON-CRYSTALLINE SOLIDS Hydrolysis-condensation mechanism of a two-step sol-gel process of mixtures of TEOS and T E O G, 148 (1992) 13–17.
- [27] L. Desogus, A. Cuccu, S. Montinaro, R. Orrù, G. Cao, D. Bellucci, A. Sola, V. Cannillo, Classical Bioglass® and innovative CaO-rich bioglass powders processed by Spark Plasma Sintering: A comparative study, *J. Eur. Ceram. Soc.* 35 (2015) 4277–4285. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2015.07.023.
- [28] W.T. Lin, J.C. Chen, Y.C. Hsiao, C.J. Shih, Re-crystallization of silica-based calcium phosphate glass prepared by sol-gel technique, *Ceram. Int.* 43 (2017) 13388–13393. doi:10.1016/j.ceramint.2017.07.041.
- [29] N. Jmal, J. Bouaziz, Synthesis, characterization and bioactivity of a calcium-phosphate glass-ceramics obtained by the sol-gel processing method, *Mater. Sci. Eng. C*. 71 (2017) 279–288. doi:10.1016/j.msec.2016.09.058.
- [30] L.A. Quintero Sierra, D.M. Escobar, Characterization and bioactivity behavior of sol-gel derived bioactive vitroceraic from non-conventional precursors, *Bol. La Soc. Esp. Ceram. y Vidr.* 58 (2019) 85–92. doi:10.1016/j.bsecev.2018.07.003.
- [31] B. Li, W. Luo, Y. Wang, H. Wu, C. Zhang, Bioactive SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> hollow nanospheres for drug delivery, *J. Non. Cryst. Solids*. 447 (2016) 98–103. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2016.05.041.
- [32] A. Moghanian, A. Sedghi, A. Ghorbanoghli, E. Salari, The effect of magnesium content on in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial activity of sol-gel derived 58S bioactive glass, *Ceram. Int.* 44 (2018) 9422–9432. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.159.
- [33] D. Avram, D. Ungureanu, N. Angelescu, J. Barroso de Aguiar, A Comparative Study on the Properties of Potentially Bioactive Glasses Obtained by Sol-Gel Technique and by Melting Mixtures of Oxides, *Sci. Bull. Valahia Univ. - Mater. Mech.* 15 (2017) 18–24. doi:10.1515/bsmm-2017-0013.
- [34] A. Saboori, M. Rabiee, F. Moztarzadeh, M. Sheikhi, M. Tahriri, M. Karimi, Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO bioglass, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 335–340. doi:10.1016/j.msec.2008.07.004.
- [35] L. Karim, A.I. Hussein, E.F. Morgan, M.L. Bouxsein, The Mechanical Behavior of Bone, Fourth Edition, Elsevier, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-415853-5.00019-4.
- [36] X. Wang, X. Shen, X. Li, C.M. Agrawal, Age-related Changes in the Collagen Network and Toughness of Bone, 31 (2002) 1–7.
- [37] H. Ridha, P.J. Thurner, Finite element prediction with experimental

- validation of damage distribution in single trabeculae during three-point bending tests, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 27 (2013) 94–106. doi:10.1016/j.jmbbm.2013.07.005.
- [38] N. Subhapradha, M. Abudhahir, A. Aathira, N. Srinivasan, A. Moorthi, Polymer coated mesoporous ceramic for drug delivery in bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 110 (2018) 65–73. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.146.
- [39] L. Stipniece, I. Narkevica, M. Sokolova, J. Locs, J. Ozolins, Novel scaffolds based on hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated porous TiO<sub>2</sub> ceramics for bone tissue engineering, *Ceram. Int.* 42 (2016) 1530–1537. doi:10.1016/j.ceramint.2015.09.101.
- [40] A. Podshivalov, M. Zakharova, E. Glazacheva, M. Uspenskaya, Gelatin/potato starch edible biocomposite films: Correlation between morphology and physical properties, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1162–1172. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.079.
- [41] D. Mao, Q. Li, N. Bai, H. Dong, D. Li, Porous stable poly ( lactic acid )/ ethyl cellulose / hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration, *Carbohydr. Polym.* 180 (2018) 104–111. doi:10.1016/j.carbpol.2017.10.031.