

Synthesis of Bioactive and Biodegradable Gelatin/Wollastonite Nanocomposite for the Delivery of Gentamicin

Esmail Salimi ^{1*}, Ava Sobhani ²

¹ Assistant Professor, Faculty of Chemical and Materials Engineering, Shahrood University of Technology, Shahrood, Semnan, Iran.

² MSc, Faculty of Chemical and Materials Engineering, Shahrood University of Technology, Shahrood, Semnan, Iran.

*Corresponding Author's Email: e.salimi@shahroodut.ac.ir (E. Salimi)

Paper History:

Received: 2023-07-05

Revised: 2023-07-25

Accepted: 2023-12-23

Keywords:

Nanocomposite,
Wollastonite,
Drug Release,
Biodegradable Composite

Abstract: In this study, wollastonite nanoparticles were synthesized and calcined at different temperatures. The resulting particles were added to a polymeric gelatin containing drug, and the gelatin/wollastonite nanocomposite was prepared as a carrier for gentamicin drug. The structure and morphology of the prepared particles and composites were evaluated using X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), and Transmission Electron Microscopy (TEM). The results showed the synthesis of single-phase wollastonite nanoparticles with sizes less than 10 nanometers, which agglomerate in some regions. The drug delivery rate in phosphate buffer solution, as analyzed by UV analysis at $\lambda_{\text{max}}=201$ nm, indicated rapid degradation of the composite, with about 60% of the drug delivered in the initial hours and complete delivery after 2 days. Therefore, it can be concluded that the resulting composite is biodegradable and has the potential to be used as filler for bone defects and local drug delivery.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.405574.1282>

URL: https://www.jamt.ir/article_187155.html

1. INTRODUCTION

After the discovery of bioactive glasses by Hench in 1970 ([Hench et al., 1971](#)), extensive research has been conducted on the replacement of glass and glass ceramics as human tissue. Bioactive glasses can be considered as one of the most important groups in biomaterials widely used in biomedical applications ([Hench, 2006](#)). Studies have shown that ceramic materials based on calcium silicate, such as wollastonite (CaSiO_3) and dicalcium silicate powder (Ca_2SiO_4), are characterized by remarkable biological activity and good biocompatibility. In addition, Kokubo et al. observed the rapid formation of hydroxyapatite layers on glass under simulated body fluid conditions ([Amin et al., 2021](#)). Wollastonite consists of tetrahedral chains of SiO_4^{4-} with the same crystal structure as perovskite ABO_3 . This crystal is formed by covalent bonds of silica modified with Ca^{2+} cations. The formation of apatite on its surface is much faster than that of other bioceramics. This biological activity results from the formation of Si-OH bonds on the surface when immersed in a simulated body fluid as well as Ca^{+} ions exchange with hydrogen ions ([Riaz et al., 2019](#)). Despite all the bioceramics properties such as high biocompatibility and bioactivity as well as low fracture toughness (low ductility) and resistance to crack propagation, their application in biomedicine has been restricted. Gelatin is one of the biological derivatives of collagen with numerous biological properties. Since the majority of the organic phase in hard tissue is made of collagen due to

inflammatory ability, biodegradability, biocompatibility, and gelatin availability, this polymer has found remarkable applications in drug delivery systems. In this study, hybrids of gelatin/elastomeric containing different amounts of bioactive glass were prepared, and their ability to gentamicin delivery as an effective antibiotic was investigated. This system can be used as bone tissue filler through injectable gels which results in delivery of certain drug.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Wollastonite synthesis

In the first step, calcium nitrate tetrahydrate was completely dissolved in deionized water and then, ammonia (25%) was added drop by drop to the solution to reach pH of 9. In the next step, sodium metasilicate pentahydrate solution was added to the previous solution and stirred at 50°C for several hours. Subsequently, hydrothermal process was completed at 120°C for 4 hours. The product was filtered and washed several times with distilled water. The resulting powder was dried in an oven and calcined at 700°C and 1000°C for 2 hours.

2.2. Synthesis of Polymer Composite with Wollastonite

In order to synthesize the composite materials containing glass nanoparticles and polymer gelatin and investigate the effect of composite composition on their bioactivity, different amounts of particles were added to



the polymer solution and well mixed at 50°C for 3 hours. Ultrasonic bath was then employed to disperse the particles in the polymer matrix and prevent agglomeration. Finally, each of the resulting composites was formed as a thin film and dried at 80°C.

Gentamicin, as a common antibiotic in orthopedics, was used as a model drug. In this research, 10 mg of the drug was added to the composite mixture and well mixed for a certain period of time to obtain a homogeneous gel solution. The resulting composite solution was allowed to dry at room temperature. Specific amounts of the prepared composites were placed in phosphate buffer solution at pH=7.4 and temperature of 37°C and then, it was gently shaken. In order to determine the amount of delivered drug at various times, samples were taken from the buffer solution and measured using UV-visible spectrophotometer at the wavelength of $\lambda=201\text{nm}$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The XRD pattern of the initial powder produced by sol-gel method indicates an amorphous and impurity-free glass which is consistent with the reports of other researchers. Several peaks appear at 700 °C which are representatives of semi-crystalline structure. Upon increasing the calcination temperature up to 1000 °C, sharp peaks appear in the XRD spectrum at the angles of 21.97°, 23.24°, 25.54°, 26.99°, 30.26°, and 49.94°, indicating the formation of crystalline phase in the bioactive glass structure which is consistent with the XRD pattern of wollastonite (CaSiO_3) phase. The diffraction peaks were indexed using Xpert software according to the standard X-ray card (JCPDS:043-1460) (Fig. 1).

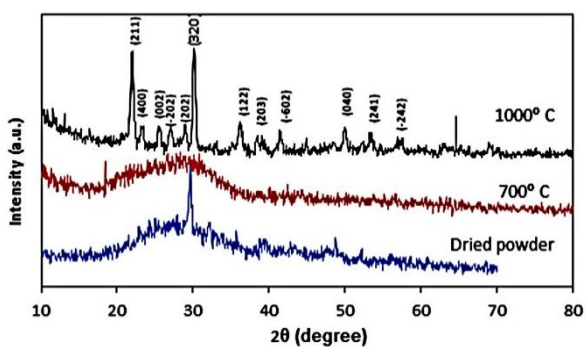


Figure 1 . XRD pattern of wollastonite bio-glass at different heat treatment temperatures.

TEM test results given in Fig. 2 confirm the formation of nearly spherical wollastonite particles with the particle size of less than 30 nanometers which is approximately consistent with the Dubey-Scherer equation and XRD spectra. Fig. 3 presents the FTIR test results carried out on the produced composites. Gelatin absorption bands in the infrared spectrum are located in the amide band region. In this study, Amide-I represents the stretching/bending hydrogen bonds C=O with COO, Amide-II the bending vibrations of N-H groups and stretching vibrations of C-N groups, and Amide-III the vibrations in the C-N and N-H groups of amided ([Das et al., 2017](#)).

The peaks attributed to Si-O and Si-O-Ca bonds in the range of 500-1100 cm^{-1} imply the presence of wollastonite mineral phase in the structure. The drug release profile represents rapid delivery rate during the initial hours, followed by a constant and continuous rate. Approximately 60% of the drug in the composite was released after 10 hours of immersion, and almost all drugs were released after two days.

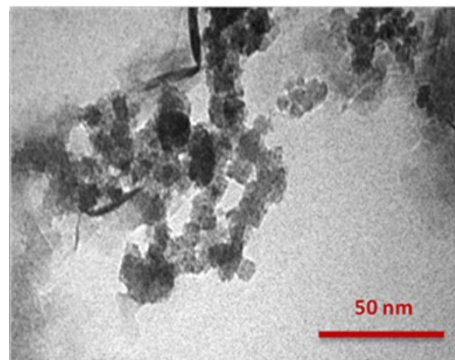


Figure 2. TEM images of wollastonite nanoparticle

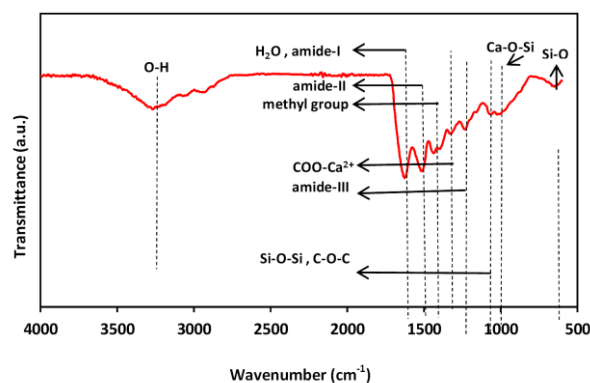


Figure 3. FTIR curve of gelatin/ wollastonite nanocomposite.

4. CONCLUSION

The results of this study demonstrate that the hydrothermal method could be used as a suitable method for producing relatively homogeneous wollastonite nanoparticles. According to X-Ray Diffraction (XRD) results, the presence of pure wollastonite phase was completely crystallized after calcination at 1000 °C without any side phases. Different amounts of glass nanoparticles added to gelatin polymeric matrix and hybrid gelatin/wollastonite formation were confirmed through the FTIR and XRD tests. Gentamicin was added to the composite for targeted drug release evaluation. The hydrophilic and unstable structure of gelatin led to rapid delivery of 60% of the drug in initial hours and gradually delivered the rest during subsequent hours. According to the findings, the produced nanocomposite can be used in bone tissue engineering as a bone filler and through simultaneously delivering antibiotics, the local infection recovery process will be accelerated.

5. ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude to Shahrood University of Technology for any support.

6. REFERENCE

1. Amin, A. M., El-Amir, A. A., Karunakaran, G., Kuznetsov, D., & Ewais, E. M. (2021). In-vitro evaluation of wollastonite nanopowder produced by a facile process using cheap precursors for biomedical applications. *Ceramics International*, 47(13), 18684-18692. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.03.201>
2. Das, M. P., Suguna, P. R., Prasad, K. A. R. P. U. R. A. M., Vijayalakshmi, J. V., & Renuka, M. (2017). Extraction and characterization of gelatin: a functional biopolymer. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 9(9), 239. [10.22159/ijpps.2017v9i9.17618](https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i9.17618)
3. Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>
4. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C., & Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of biomedical materials research*, 5(6), 117-141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>
5. Riaz, M., Zia, R., Aslam, S., Qamar, A., Hussain, T., & Anjum, S. (2019). Low temperature synthesis of wollastonite using sol-gel combustion method: In vitro bioactivity evaluation. *International Journal of Modern Physics B*, 33(10), 1950081. <https://doi.org/10.1142/S0217979219500814>



مقاله کامل پژوهشی

سنتز نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت زیست فعال و تخریب پذیر

به منظور رهایش داروی جتتامایسین

اسماعیل سلیمی^{۱*}، آوا سبحانی^۲

^۱ استادیار، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی شیمی و مواد، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

^۲ کارشناسی ارشد، گرایش سرامیک، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی شیمی و مواد، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴

بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۰۳

پذیرش قطعی: ۱۴۰۲/۱۰/۰۲

کلیدواژه ها:

نانوکامپوزیت،

ولاستونیت،

رهایش دارو،

کامپوزیت زیست تخریب پذیر

چکیده

در این تحقیق، نانوذرات ولاستونیت سنتز و در دماهای گوناگون کلسینه شدند. ذرات حاصله به پلیمر ژلاتین حاوی دارو افزوده شد و نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت به عنوان حامل داروی جتتامایسین تهیه شد. ساختار و ریخت شناسی ذرات و کامپوزیت های تهیه شده به کمک آنالیزهای پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی شدند. نتایج حاصله نشان دهنده سنتز نانوذرات تک فاز ولاستونیت با اندازه ای کوچک تر از ۱۰ نانومتر بود که در بعضی از نقاط حالت کلوخه ای داشتند. بررسی نرخ رهایش دارو در محیط بافر فسفات با استفاده از دستگاه طیف سنجی نوری ماوراء بنفش (UV) در طول موج ماکزیمم ۲۰۱ نانومتر نشان دهنده تخریب سریع کامپوزیت و آزادسازی حدود ۶۰ درصد دارو در ساعات اولیه بود که پس از ۲ روز تقریباً تمامی دارو آزاد شد. در نتیجه، می توان گفت کامپوزیت حاصله زیست تخریب پذیر است و قابلیت استفاده به عنوان پرکننده نواقص استخوانی و رهاسازی دارو را به صورت موضعی دارد.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.405574.1282>

URL: https://www.jamt.ir/article_187155.html

۱- مقدمه

توسعه مواد کامپوزیتی آلی/معدنی مشابه آنچه طبیعت ایجاد کرده است توجه بسیاری را در کاربردهای بیولوژیکی به خود جلب کرده است. بخش آلی این مواد زیستی به عنوان بستری برای جوانه زنی فازهای معدنی عمل می کنند. برای مثال، در حین تشکیل استخوان، کلاژن به عنوان بستر آلی عمل می کند و محل هایی را برای رسوب هیدروکسی آپاتیت فراهم می کند (Rhee & Tanaka, 1998). میزان ۶۵ درصد از جرم کلی استخوان را هیدروکسی کربنات آپاتیت و مابقی را آب و کلاژن تشکیل می دهد (Vallet-Regí, 2006). با توجه به شباهت های شیمیایی و بیولوژیکی هیدروکسی آپاتیت با بافت معدنی استخوان، از این ترکیب در تهیه هیبریدهای جدید برای کاربردهای پزشکی

استفاده می شود (Dorozhkin, 2011). کیم (۲۰۰۵) نشان داد که کلاژن و ژلاتین دارای گروه های عاملی بیولوژیکی فراوانی هستند. آن ها توانستند با استفاده از روش خشک کن انجمادی، نانوکامپوزیت های هیدروکسی آپاتیت/ژلاتین را به عنوان داربست برای مهندسی بافت سخت تهیه کنند (Kim et al., 2005). چانگ (۲۰۰۳) نیز توانست این نانوکامپوزیت را تهیه کند و به این نتیجه دست یابد که پیوند شیمیایی میان یون های کلسیم در هیدروکسی آپاتیت و کربوکسیل در ژلاتین می تواند به تغییر موقعیت باندهای FTIR منجر شود (Chang et al., 2003) که با نتایج سایر پژوهشگران نیز تطابق داشت. چانگ همچنین کامپوزیت هایی را با افزودن پلی وینیل الکل و اتیلن گلیکول دی اتر به مخلوط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت تولید کرد (Chang et al., 2004). گروهی

*عهده دار مکاتبات: اسماعیل سلیمی

نشانی: ایران، سمنان، شاهرود، دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده مهندسی شیمی و مواد

پیام نگار: e.salimi@shahroodut.ac.ir

دیگر توانستند کامپوزیت‌هایی برپایه ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت را تهیه کنند و با کمک گلو تار آلدئید به آن‌ها استحکام بخشند. ژلاتین کراس لینک شده به عنوان عاملی برای هسته‌زایی هیدروکسی آپاتیت عمل کرد (Touny et al., 2008).

پس از کشف شیشه‌های فعال در محیط بیولوژیک توسط Hench et al., 1971، تحقیقات فراوانی درخصوص جایگزینی شیشه و شیشه‌های سرامیک‌ها به عنوان بافت انسانی انجام شد.

شیشه‌های زیست فعال را می‌توان از جمله گروه‌های مورد توجه در مواد زیستی قلمداد کرد که کاربرد وسیعی در زمینه پزشکی پیدا کرده‌اند (Hench, 2006; Mollaqaesem et al., 2013). این ترکیبات قابلیت تحریک رشد سلول‌های استخوانی را دارند و می‌توانند، در هنگام قرارگیری در محیط بیولوژیک، لایه‌ای از هیدروکسی کربنات آپاتیت را بر روی سطح خود تشکیل دهند و پیوندی قوی با بافت سخت استخوان برقرار کنند. SiO_2 , Na_2O , CaO و P_2O_5 را می‌توان از اجزای اصلی تشکیل دهنده ساختار شیشه‌ها به شمار آورد که موجب شکل‌گیری طیف وسیعی از شیشه‌های زیست فعال و زیست سازگار شده‌اند (Kokubo, 1998). بررسی‌ها ثابت کرده است که مواد سرامیکی مبتنی بر کلسیم سیلیکات به نام ولاستونیت (CaSiO_3) و پودر دی‌کلسیم سیلیکات (Ca_2SiO_4) فعالیت زیستی عالی و زیست‌سازگاری خوبی دارند. علاوه بر این، کوکوبو و همکارانش (Kokubo et al., 1990) شاهد تشکیل سریع لایه‌های هیدروکسی آپاتیت (HAP) بر روی شیشه، تحت شرایط مایع شبیه‌سازی شده بدن، بودند (Amin et al., 2021).

ولاستونیت شامل زنجیرهای از تتراهدرال SiO_4^{4-} است که ساختاری شبیه به پروسکایت ABO_3 دارد. شبکه‌ای است که از پیوند کووالانسی سیلیکا اصلاح شده با کاتیون‌های Ca^{2+} تشکیل شده است. تشکیل آپاتیت بر روی سطح آن در مقایسه با سایر سرامیک‌های زیست فعال بسیار سریع است. فعالیت زیستی، به دلیل تشکیل پیوند Si-OH به سطح ماده است، وقتی در مایع شبیه‌سازی شده بدن غوطه‌ور می‌شود و یون‌های Ca^{+} با یون‌های هیدروژن مبادله می‌شوند (Riaz et al., 2019).

علی‌رغم تمامی خصوصیات سرامیک‌های زیستی از جمله زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری بالا، شکندگی و

مقاومت پایین آن‌ها در مقابل رشد ترک کاربرد آن‌ها را در پزشکی محدود کرده است. از طرف دیگر، نرخ تخریب شیشه‌های زیست فعال در محیط بدن را می‌توان از طریق ترکیب آن‌ها با پلیمر کنترل کرد (Rezwan et al., 2006). پژوهشگران توانستند، با افزودن پلی‌متیل متاکریلات به شیشه زیست فعال، نرخ رهایش آنتی‌بیوتیک را کنترل کنند (Arcos et al., 2001). ایجاد تخلخل در ساختار شیشه می‌تواند آن‌ها را به حاملی مناسب برای رهایش پروتئین تبدیل کند (Wu et al., 2010). اخیراً پژوهشگران توانستند مقداری از سیلیکا را در ساختار شیشه زیست فعال با بورات B_2O_3 جایگزین کنند و نرخ تخریب شیشه را افزایش دهند. از این شیشه زیست فعال بوراتی به منظور رهایش داروی آنتی‌بیوتیک مانند ونتومايسين استفاده شد. مهم‌ترین اصل، در سیستم رهایش دارو، رهایش دارو با نرخی کنترل شده به سمت سلول‌های تومر و سرطانی است، بدون این‌که به سلول‌های سالم آسیب برساند (Zhang et al., 2010).

ژلاتین از مشتقات کلاژن با خصوصیات بیولوژیکی فراوان است. از آنجایی‌که بخش عمده فاز آلی در بافت سخت از کلاژن تشکیل شده است و با توجه به قابلیت تورم، زیست تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و دسترسی آسان ژلاتین، این پلیمر کاربرد فراوانی در سیستم‌های رهایش دارو پیدا کرده است. کامپوزیت کردن ژلاتین با کیتوسان، سیلیس و داروی جنتامایسین توانسته است، بعد از قرارگیری بر روی ایمپلنت فولاد ضدزنگ، از تکثیر باکتری‌ها و ایجاد عفونت در مراحل اولیه کاشت ایمپلنت در بدن جلوگیری کند (Aydemir et al., 2020). از هیدروژل ژلاتین/لیگنین برای رهایش داروی ریبویرین استفاده شده است. نتایج نشان داد که میزان لیگنین و غلظت عامل کراس لینک‌کننده در سرعت رهایش دارو تأثیر می‌گذارد (Chiani et al., 2023). علی‌رغم تمامی فعالیت‌های انجام شده در این زمینه، تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از کامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت به منظور رهایش داروی جنتامایسین مشاهده نشده است. لذا، در این تحقیق، سعی بر آن است تا کامپوزیتی از ژلاتین/ولاستونیت حاوی ۱۰ درصد وزنی از شیشه زیست فعال تهیه شود و قابلیت آن در رهایش جنتامایسین به عنوان آنتی‌بیوتیکی مؤثر بررسی شود. این سیستم می‌تواند به عنوان ژل‌های قابل تزریق به عنوان پرکننده

۱۰ میلی گرم از دارو به ترکیب کامپوزیت افزوده شد و به مدت مشخصی همزده شد تا محلول ژله ای همگنی به دست آید. محلول کامپوزیتی حاصله را در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود. مقادیر مشخصی از کامپوزیت تهیه شده در محلول بافر فسفاتی در $\text{pH} = 7/4$ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و به آرامی تکان داده شد. میزان داروی آزاد شده به کمک دستگاه طیف سنجی نوری ماوراءبنفش در طول موج $\lambda = 201\text{nm}$ سنجش و ارزیابی شد.

۲-۳- مشخصه یابی

ساختار فازی ترکیبات سنتز شده به کمک تکنیک پراش پرتو ایکس مجهز به نرم افزار آنالیز فازی (X-ray Diffraction) (XRD, Philips PW1730, Xpert PANalytical) تحلیل شد. از منبع $\text{CuK}\alpha$ برای تولید پرتو ایکس با طول موج $1/54\text{\AA}$ استفاده شد. ولتاژ دستگاه ۴۰ کیلو ولت و طول گام ۰/۰۵ تنظیم شد.

عملیات حرارتی شیشه ها موجب تشکیل فاز می شود و با شناسایی فاز تبلور یافته می توان به ترکیب ماده پی برد. علاوه بر آن، بیشترین دمایی را که شیشه از حالت آمورف به حالت بلوری تبدیل می شود می توان به دست آورد که می تواند در انتخاب کاربرد و مکان استفاده مفید باشد. انتخاب دمای عملیات حرارتی برپایه گزارش های سایر پژوهشگران بوده است (Amin et al., 2021).

از آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (Fourier Transform Infrared, Thermo AVATAR FTIR) برای بررسی ساختار شیمیایی و پیوندها در ترکیبات تولید شده بهره گیری شد. قرص KBr از نمونه های پودری تهیه شد و طیف جذبی در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ به دست آمد.

به منظور مشاهده و بررسی اندازه نانوذرات و پراکندگی آن ها در کامپوزیت، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM, Zeiss HV-300-Germany) و Map استفاده شد.

به منظور بررسی قابلیت رهایش دارو، از جتتامایسین به عنوان داروی ضد میکروبی استفاده شد. میزان ۱۰ میلی گرم از دارو در ۱۰ میلی لیتر محلول کامپوزیت حل و چندین ساعت همزده شد تا به خوبی در ساختار کامپوزیت پخش شود. پروفایل رهایش دارو از نمونه کامپوزیتی با استفاده از دستگاه طیف

بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفته و داروی مورد نظر را نیز آزاد کند.

۲- روش تحقیق

۲-۱- سنتز ولاستونیت

برای آماده سازی شیشه زیست فعال ولاستونیت CaO-SiO_2 با ترکیب شیمیایی $\text{CaO}=48.3\%$ و $\text{SiO}_2=51.7\%$ از مواد اولیه شامل $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (merck) و $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ استفاده شد.

در مرحله اول، کلسیم نیترات تتراهیدرات در آب دیونیزه شده به خوبی حل شد. سپس، آمونیاک (۲۵ درصد) به صورت قطره ای به محلول اضافه شد تا به $\text{pH}=9$ دست یابیم. سپس، محلول سدیم متاسیلیکات پنتاهیدرات به محلول قبلی افزوده شد و به مدت چندین ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس همزده شد. غلظت محلول ها به گونه ای انتخاب شد که نسبت مولی نهایی $\text{Ca/Si}=1$ به دست آید. pH محلول نهایی نیز در حدود ۱۰/۸ تنظیم شد. در ادامه، فرایند هیدروترمال در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و مدت ۴ ساعت تکمیل شد. محصول به دست آمده فیلتر شد و با آب مقطر چندین مرتبه شسته شد. پودر حاصله در آون خشک شد و در دماهای ۷۰۰ و ۱۰۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت در کوره کلسینه شد (Amin et al., 2021).

۲-۲- سنتز کامپوزیت پلیمری ولاستونیت

به منظور سنتز کامپوزیت نانوذرات ولاستونیت و پلیمر ژلاتین میکروبیولوژی (مرک شماره ۱۰۴۰۷۰) و بررسی زیست فعالی آن، مقادیر ۱۰ درصد وزنی از ذرات به محلول پلیمری اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت به خوبی همزده شد. برای پراکنده کردن ذرات در بستر پلیمر و جلوگیری از آگلومره شدن، از حمام اولتراسونیک استفاده شد. در نهایت، کامپوزیت حاصل به شکل فیلمی نازک درآمد و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس خشک شد.

از جتتامایسین سولفات تولید شده توسط شرکت BioBasic کانادا به شماره کاتالوگ GB0217 به عنوان آنتی بیوتیکی رایج و مدل دارویی در اورتوپدی استفاده شد. مقدار

می‌دهند و از این روش به‌منزله فرایندی سریع، آسان و ارزان می‌توان در تولید با مقیاس صنعتی نیز استفاده کرد.

الگوی XRD مربوط به پودر شیشه زیست‌فعال ولاستونیت سنتز شده به روش سل - ژل و همچنین پس از کلسینه شدن در دماهای ۷۰۰ و ۱۰۰۰ درجه سلسیوس در شکل ۱ نشان داده شده است. الگوی XRD مربوط به پودر اولیه تولید شده به روش سل - ژل نشان‌دهنده شیشه آمورفی بدون هرگونه ناخالصی است که با یافته‌های سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد ([Amin et al., 2021](#); [Riaz et al., 2019](#)). با افزایش دمای عملیات حرارتی، تعدادی قله در دمای ۷۰۰ درجه سلسیوس ظاهر شد که بیان‌کننده ساختاری نیمه‌بلوری است. با افزایش دمای کلسیناسیون به ۱۰۰۰ درجه سلسیوس، قله‌های تیزی در طیف XRD در زوایای ۲۱/۹۷، ۲۳/۲۴، ۲۵/۵۴، ۲۶/۹۹، ۳۰/۲۶ و ۴۹/۹۴ درجه ظاهر می‌شوند که نشان‌دهنده تشکیل فاز بلوری در ساختار شیشه زیست‌فعال است و با الگوی XRD فاز ولاستونیت (CaSiO_3) مطابقت دارد. قله‌های پراشی با استفاده از نرم‌افزار Xpert و با توجه به کارت پرتو ایکس استاندارد (JCPDS:043-1460) شاخص‌گذاری شد (شکل ۲).

الگوی XRD نشان‌دهنده تبلور ولاستونیتی تک‌فاز و عاری از هرگونه فاز ثانویه است. از معادله دبای - شرر برای محاسبه اندازه بلور از عرض کامل در نصف ارتفاع شدیدترین قله از الگوی XRD مربوطه استفاده شد.

بنابراین، $D = k\lambda / B \cos \theta$ است و B پهنای متوسط در نیم ارتفاع بیشینه برحسب رادیان، λ طول موج (۰/۱۵۴۰۶ نانومتر) پرتو ایکس، θ زاویه براگ و k ثابت (۰/۹) است ([Khorsand et al., 2012](#)).

اطلاعات مربوط به قله‌ها در جدول ۲ آورده شده است. قله پراش با شدت بالا در زاویه $2\theta=30$ برای محاسبه اندازه بلور ولاستونیت خالص انتخاب شد. اندازه متوسط کریستالیت در محدوده ۲۱/۳۲-۹/۲۴ نانومتر است.

سنجی نور ماوراءبنفش در طول موج $\lambda=201\text{nm}$ در طی ۲ روز بررسی شد. بدین‌منظور، مقدار مشخصی از کامپوزیت حاوی دارو در ظروف متعدد حاوی محلول بافر قرار گرفت و به‌آرامی همزده شد. از بافر موجود در هر ظرف، بعد از گذشت زمان موردنظر، نمونه‌ای برای تعیین میزان داروی آزاد شده برداشته شد. درواقع، هر ظرف برای زمانی مشخص استفاده می‌شود و بدین‌ترتیب نیازی به جایگزین کردن محلول برداشته شده نیست.

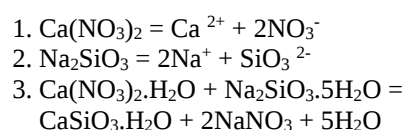
به‌منظور ارزیابی زیست‌فعالی پودر تولیدی، نانوپودرهای به‌دست‌آمده در مایع شبیه‌سازی شده بدن (SBF) با ترکیبی مشابه پلاسمای انسانی (جدول ۱)، که طبق استاندارد تهیه شده بود ([Kokubo et al., 1990](#)) به مدت ۲۱ روز غوطه ور شدند. درنهایت، برای بررسی خاصیت زیست‌فعالی، به‌کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شدند.

جدول ۱. غلظت یونی SBF و پلاسمای انسانی

یون	پلاسمای (mmol/l)	SBF (mmol/l)
Na^+	۱۴۲	۱۴۲
K^+	۵	۵
Mg^{2+}	۱/۵	۱/۵
Ca^{2+}	۲/۵	۲/۵
Cl^-	۱۰۳	۱۴۷/۸
HCO_3^-	۲۷	۴/۲
HPO_4^{2-}	۱	۱
SO_4^{2-}	۰/۵	۰/۵

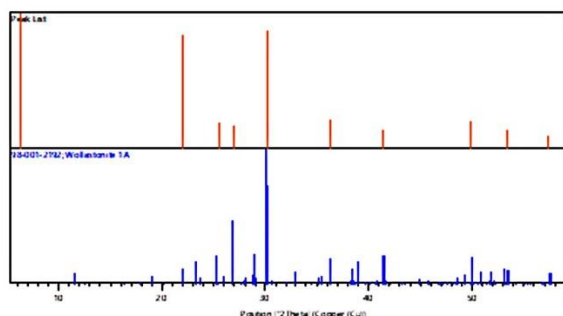
۳- نتایج و بحث

در این تحقیق، از روش هم‌رسوبی به‌عنوان روش شیمیایی سریع و ارزان‌قیمت برای تولید نانوذرات ولاستونیت استفاده شد. مراحل واکنش سنتز در ذیل آمده است ([Amin et al., 2021](#)):

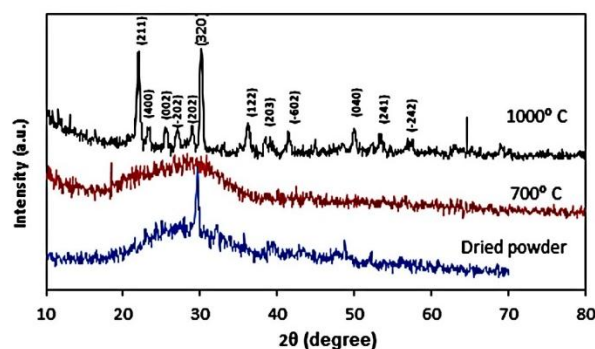


همان‌طور که در واکنش‌های بالا مشاهده می‌شود، محصولات جانبی واکنش کاملاً سازگار با محیط زیست نشان

عملیات حرارتی شده است



شکل ۲. مقایسه طیف xrd نمونه سنتز شده با طیف استاندارد



شکل ۱. الگوهای XRD ولاستونیت که در دماهای گوناگون

جدول ۲. اطلاعات مربوط به موقعیت و خصوصیات قله های XRD ولاستونیت

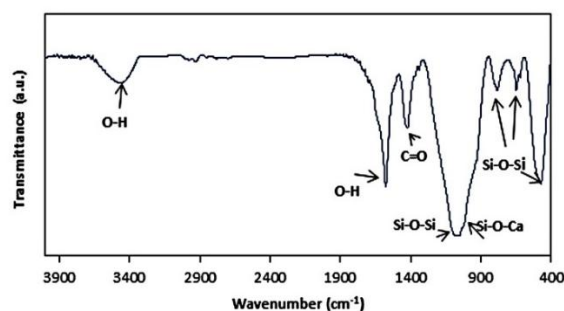
Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip Width	Matched by
۶/۲۹۵۶	۶۵۰/۶۶	۰/۵۹۰۴	۱۴/۰۳۹۶۱	۱۰۰/۰۰	۰/۷۰۸۵	
۲۱/۹۷۷۰	۵۴۲/۴۵	۰/۳۹۳۶	۴/۰۴۴۵۴	۸۳/۳۷	۰/۴۷۲۳	98-001-2192
۲۵/۵۴۲۰	۱۲۴/۴۶	۰/۳۹۳۶	۳/۴۸۷۵۴	۱۹/۱۳	۰/۴۷۲۳	98-001-2192
۲۶/۹۹۹۷	۱۱۲/۷۳	۰/۴۹۲۰	۳/۳۰۲۴۶	۱۷/۳۳	۰/۵۹۰۴	98-001-2192
۳۰/۲۶۴۵	۵۶۰/۱۱	۰/۳۹۳۶	۲/۹۵۳۲۴	۸۶/۰۸	۰/۴۷۲۳	98-001-2192
۳۶/۲۷۱۰	۱۴۳/۵۴	۰/۴۹۲۰	۲/۴۷۶۷۹	۲۲/۰۶	۰/۵۹۰۴	98-001-2192
۴۱/۴۶۷۵	۹۲/۲۶	۰/۴۹۲۰	۲/۱۷۷۶۳	۱۴/۱۸	۰/۵۹۰۴	98-001-2192
۴۹/۹۴۲۰	۱۳۰/۵۱	۰/۳۹۳۶	۱/۸۲۶۱۸	۲۰/۰۶	۰/۴۷۲۳	98-001-2192
۵۳/۴۱۸۹	۹۱/۳۷	۰/۵۹۰۴	۱/۷۱۵۲۳	۱۴/۰۴	۰/۷۰۸۵	98-001-2192
۵۷/۳۹۷۴	۶۶/۱۵	۰/۹۸۴۰	۱/۶۰۵۴۴	۱۰/۱۷	۰/۱۸۰۸	98-001-2192

شکل ۳. منحنی FTIR ولاستونیت

حالت های کشش پیوندهای O-Si-O را می توان در cm^{-1} ۴۷۳^۱ و ۷۸۳ مشاهده کرد (Amin et al., 2021). در طی عملیات حرارتی اعمال شده، تجزیه سیلیس پیوسته اتفاق افتاد که با جذب Ca^{+2} به داخل شبکه سیلیس همراه است و به تشکیل Si-O-Ca منجر می شود که در حدود 950cm^{-1} ظاهر شده است. ارتعاشات کششی پیوندهای Si-O-Ca نشانه ای برای تشکیل $\beta\text{-CaSiO}_3$ است و با الگوهای XRD به دست آمده سازگار است (Amin et al., 2021). نتایج آزمون های TEM در شکل ۴ نشان دهنده تشکیل ذرات ولاستونیت نسبتاً کروی و با ابعاد در محدوده کوچک تر از ۱۰ نانومتر تا ۳۰ نانومتر است که با نتایج حاصل از معادله دبای - شرر و براساس طیف XRD تقریباً مطابقت دارد. بخش های تیره مشاهده شده در تصویر را می توان به ترکیبات آلی باقی مانده در طی فرایند سنتز نسبت داد که وضوح تصویر نانوذرات را تحت تأثیر قرار داده است.

شکل ۳ نتیجه آزمون FT-IR را برای ولاستونیت نشان

می دهد. قله های مشاهده شده در ناحیه 3464cm^{-1} و 1576cm^{-1} بیان کننده گروه های O-H مربوط به ملکول های آب جذب شده در سطح پودر هستند (Amin et al., 2021). قله ظاهر شده در 1422cm^{-1} به دلیل ارتعاش کششی C=O فاز کربنات کلسیم است (Lakshmi & Sasikumar, 2015). قله های مشاهده شده در 1056cm^{-1} و 648cm^{-1} را می توان به ارتعاشات کششی Si-O-Si نسبت داد (Zheng et al., 2021).



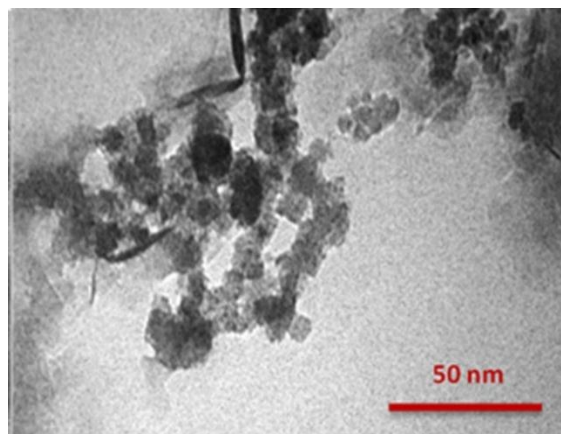
شکل ۶. نتایج آزمون FTIR انجام شده بر روی کامپوزیت تولید شده را نشان می‌دهد. باندهای جذبی ژلاتین در طیف مادون قرمز در ناحیه باند آمید قرار دارند.

Amide-I نشان‌دهنده جفت کشش/پیوند هیدروژنی C=O با COO است.

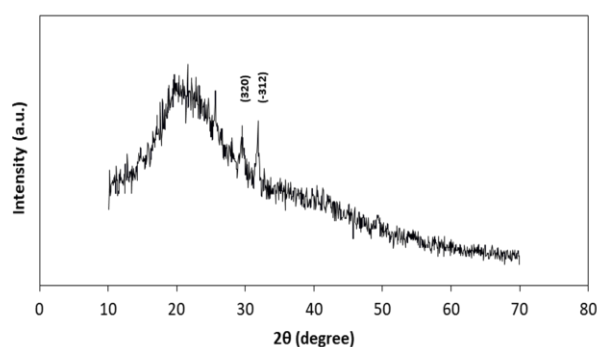
Amide-II نشان‌دهنده ارتعاش خمشی گروه‌های N-H و ارتعاشات کششی گروه‌های C-N است.

Amide-III مربوط به ارتعاشات در صفحه گروه‌های C-N و N-H آمید متصل است (Zamanian & Banafatizadeh, 2022; Das et al., 2017). قله‌های جذب در 3343 ، 2896 ، 1428 ، 1104 و 1024 به ترتیب به ارتعاشات کششی O-H، C-H، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات کششی C-O-C نسبت داده می‌شوند. نواری اضافی در طیف ژلاتین خالص قابل مشاهده در 1340 cm^{-1} را می‌توان به حضور COOH نسبت داد (Zhang et al., 2018). قله‌های مربوط به پیوندهای Si-O و Si-O-Ca در محدوده 1100 - 500 cm^{-1} بیان کننده حضور فاز معدنی ولاستونیت در ساختار هستند. مشاهده اتصال میان گروه‌های کربوکسیل در پلیمر و یون‌های کلسیم در ولاستونیت در حدود 1300 cm^{-1} بیان‌کننده برهم‌کنش مناسب میان فاز معدنی و بستر پلیمری است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از کامپوزیت پس از قرارگیری در SBF (شکل ۷) نشان‌دهنده جوانه‌زنی ذرات ریز کلسیم فسفات است که بیان‌کننده قابلیت تبادل یونی میان ذرات ولاستونیت و یون‌های کلسیم و فسفات موجود در SBF است و زیست‌فعالی بالای این کامپوزیت و توانایی آن در پیوند با بافت استخوان را نشان می‌دهد. توزیع مناسب یون‌های فسفر و کلسیم به همراه یون‌های سیلیسیم و اکسیژن نیز که در تصاویر Map نشان داده شده است تأییدکننده همین ادعا است. بررسی خواص زیست‌فعالی کامپوزیت شیشه 45S5 و پلی‌لاکتید گلیکولید اسید نشان داد که رشد و تمایز سلول‌های استخوانی در مجاورت نمونه‌های حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی شیشه بیشتر از نمونه حاوی ۵۰ درصد شیشه 45S5 بود. براساس آن تحقیق، مقدار زیاد شیشه زیست‌فعال در کامپوزیت دارای حدی بحرانی است و مقدار زیاد شیشه موجب افزایش pH در محیط اطراف و آسیب سلولی می‌شود (Borhan & Esmaeilzadeh, 2023). لذا، کامپوزیت تولید شده در این

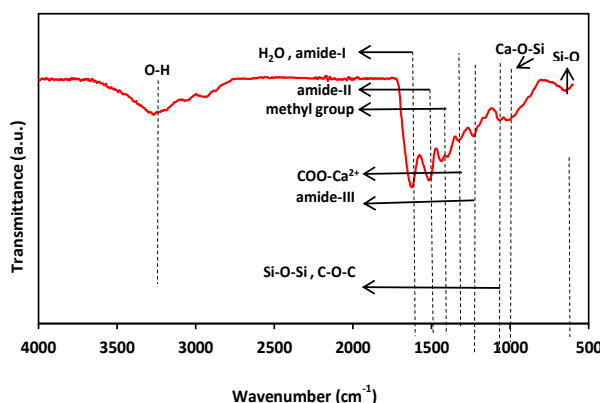


شکل ۴. تصاویر TEM از نانوذرات ولاستونیت



شکل ۵. الگوی XRD نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت

در شکل ۵، الگوی XRD کامپوزیت حاوی ۱۰ درصد وزنی از ولاستونیت مشاهده می‌شود. قله‌هایی با زوایای $31/8$ درجه از صفحه (3 1 2) و $29/9$ درجه از صفحه (3 2 0) دیده می‌شود که نشان‌دهنده حضور ولاستونیت در ساختار است و همچنین قله گسترده مشاهده شده در $20=21.9$ را می‌توان به ساختار آمورف ژلاتین نسبت داد (Radev et al., 2009).



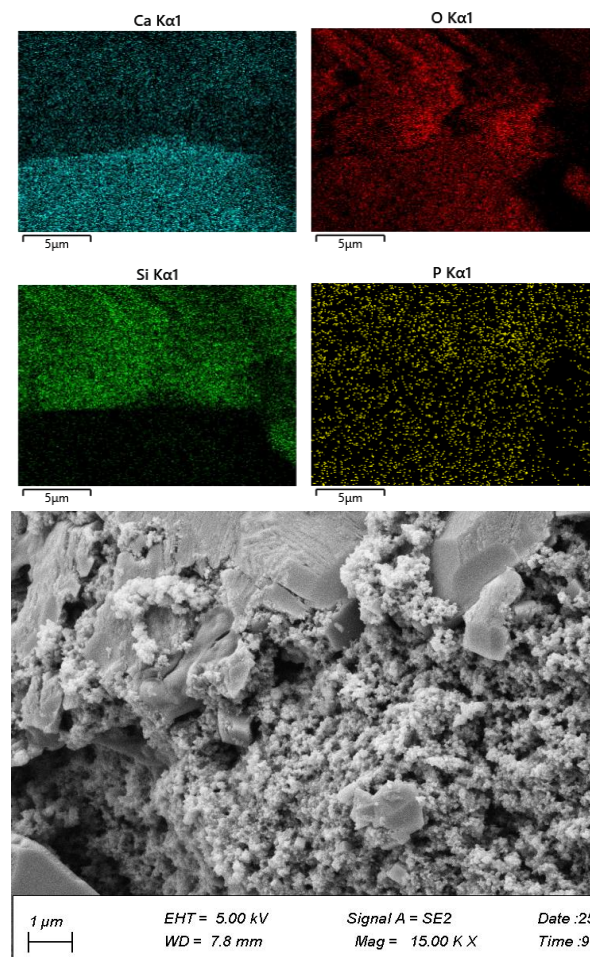
شکل ۶. منحنی FTIR نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت

را می توان به ساختمان این ترکیبات آلی نسبت داد.

۳-۳- پروفایل رهایش دارو

نرخ رهایش دارو برحسب زمان در نمودار شکل ۹ نشان داده شده است. پروفایل رهایش دارو بیان کننده رهایش سریع در ساعات اولیه بود و سپس با نرخ ثابت و پیوسته ادامه پیدا کرد. به طوری که در حدود ۶۰ درصد از داروی موجود در کامپوزیت پس از ۱۰ ساعت غوطه وری آزاد شد و پس از ۲ روز تقریباً تمامی دارو آزاد شد. با توجه به خاصیت آب دوستی ژلاتین و انحلال پذیری بالای آن در محیط آبی، تخریب بستر پلیمری موجب رهایش مقدار بالایی از دارو در ساعات اولیه می شود. پس از آن، ذرات ولاستونیت به آرامی تخریب می شوند و مولکول های دارو، که بر روی سطح ذرات ولاستونیت جذب شده بودند، آزاد می شوند. در تحقیقی مشابه نیز، نبی پور و همکارانش (۲۰۱۸) موفق به سنتز نانوکامپوزیت ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت/پلی لاکتیک اسید به عنوان حامل دارو شدند (Nabipour et al., 2018). این کامپوزیت، در مدت ۱۲ ساعت اولیه، بیش از ۷۰ درصد از داروی ایبوپروفن را آزاد کرد. آن ها این نرخ رهایش را به سازوکار نفوذ دارو به بیرون از کامپوزیت نسبت دادند. در ابتدا که مسیر نفوذ کوتاه است، میزان رهایش دارو بالا است و، با افزایش مسیر نفوذ، از نرخ رهایش دارو نیز کاسته می شود. مطالعات قبلی بر روی تخریب ولاستونیت نشان دهنده کاهش ۱۷ درصد وزن ولاستونیت پس از قرار گرفتن در محیط بافر برای ۲۱ روز بوده است (Palakurthy & Samudrala, 2019). پیوندهای ضعیف واندروالس و هیدروژنی، که میان ذرات سرامیکی و شبکه ژلاتین به وجود می آیند، پس از قرارگیری در محیط بیولوژیک، به راحتی شکسته و موجب تخریب سریع بستر پلیمری می شوند. هرچند استفاده از مشتقات سیلان به منظور ایجاد کراس لینک در شبکه ژلاتین در مقالات گزارش شده است، این امر موجب افزایش پایداری و کاهش نرخ تخریب پلیمر می شود و نرخ رهایش دارو را تا حد زیادی کاهش می دهد (Lao et al., 2016). علی رغم این که دستیابی به نرخ رهایش آرام و طولانی مدت دارو همواره مورد توجه بوده است، در بعضی از موارد و به ویژه در جلوگیری از انتشار عفونت یا هدف قرار دادن عضوی خاص که نیاز به رهایش داروی آنتی بیوتیک با سرعت بالا دارد، ایجاد سیستم

تحقیق را که حاوی ۱۰ درصد وزنی ولاستونیت است می توان گزینه مطمئن زیست فعالی در کاربردهای بیولوژیک به شمار آورد.



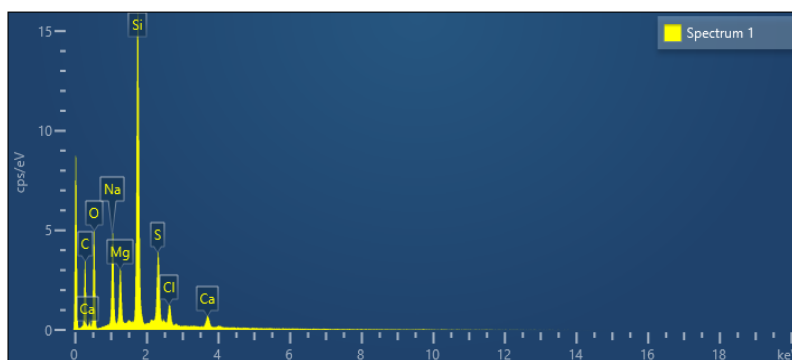
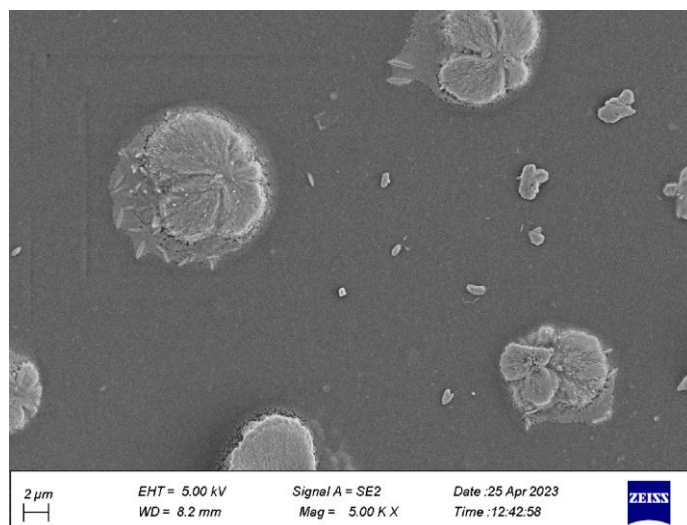
شکل ۷. تصویر SEM و Map نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت

پس از غوطه وری در SBF

۳-۲- بررسی کامپوزیت حاوی دارو

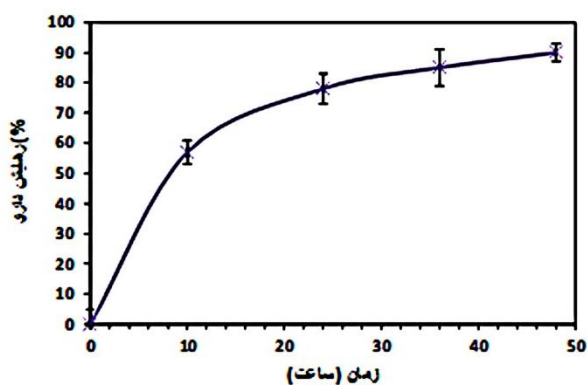
همان طور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی FESEM در شکل ۸ نشان داده شده است، ذرات ولاستونیت در بستر پلیمر پخش شده اند. در بعضی نقاط، کلوخه هایی از ذرات مشاهده می شوند که ناشی از کوچک بودن اندازه آن ها و کشش سطحی زیاد و تمایل بالا به چسبیدن به یکدیگر است. نتایج مربوط به آنالیز EDX در شکل ۸ نشان دهنده حضور جتتامایسین سولفات و ذرات ولاستونیت در بستر پلیمر است. حضور عنصر S مربوط به ساختمان دارو است و عناصر Si و Ca مربوط به ذرات ولاستونیت هستند. با توجه به شباهت ساختار شیمیایی جتتامایسین و ژلاتین، عناصر کربن و اکسیژن

حامل دارو با نرخ تخریب بالا می‌تواند استراتژی مناسبی به شمار آید (Huang & Brazel, 2001). بنابراین، می‌توان از این سیستم برای رهایش دارو سریع و پیوسته استفاده کرد.



Spectrum 1				
Element	Line Type	Weight %	Weight % Sigma	Atomic %
C	K series	39.12	0.51	52.75
O	K series	27.59	0.33	27.92
Na	K series	5.81	0.09	4.09
Mg	K series	3.00	0.06	2.00
Si	K series	15.60	0.16	8.99
S	K series	5.61	0.09	2.83
Cl	K series	1.85	0.05	0.84
Ca	K series	1.43	0.05	0.58
Total		100.00		100.00

شکل ۸. تصویر FESEM از نانوکامپوزیت تهیه‌شده به‌همراه آنالیز EDX و اطلاعات مربوط به مقدار عناصر موجود در نانوکامپوزیت



شکل ۹. پروفایل رهایش دارو از نانوکامپوزیت (n=3)

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان نکات زیر

عنوان کرد:

- استفاده از مواد اولیه ارزان‌قیمت، شرایط مطلوب و سریع واکنشی، فرایند آسان و بدون هرگونه آلودگی محیطی را می‌توان از مزایای روش هیدروترمال و روشی مناسب به‌منظور تولید نانوذرات نسبتاً همگن و لاستونیت به شمار آورد.
- با توجه به این نکته که میزان بلورینگی شیشه - سرامیک‌ها در میزان تخلخل و انرژی سطحی آن‌ها تأثیر می‌گذارد و لذا در میزان قابلیت زیست‌فعالی آن‌ها نیز مؤثر است و براساس نتایج حاصل از پراش پرتو ایکس در این تحقیق، می‌توان بیان کرد که فاز خالص و لاستونیت پس از کلسینه شدن در دمای ۱۰۰۰ درجه سلسیوس کاملاً متبلور شده است.
- ساختار آب‌دوست و ناپایدار ژلاتین در نانوکامپوزیت ژلاتین/ولاستونیت به رهایش سریع ۶۰ درصد داروی جنتامایسین در ساعات اولیه و رهایش مابقی دارو در طی ساعات بعدی منجر شد و لذا می‌توان بیان کرد که نانوکامپوزیت تولیدشده می‌تواند در مهندسی بافت استخوان و به‌عنوان پرکننده استخوان استفاده شود و هم‌زمان نیز داروهای آنتی‌بیوتیک را آزاد کند و به تسریع در روند بهبود عفونت‌های موضعی منجر شود.

۵- سپاسگزاری

در اینجا، بر خود لازم می‌دانیم از حمایت‌های مادی و

معنوی دانشگاه صنعتی شاهرود قدردانی کنیم.

مراجع

- Amin, A. M., El-Amir, A. A., Karunakaran, G., Kuznetsov, D., & Ewais, E. M. (2021). In-vitro evaluation of wollastonite nanopowder produced by a facile process using cheap precursors for biomedical applications. *Ceramics International*, 47(13), 18684-18692. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.03.201>
- Arcos, D., Ragel, C. V., & Vallet-Regí, M. (2001). Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system. *Biomaterials*, 22(7), 701-708. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00233-7)
- Aydemir, T., Liverani, L., Pastore, J. I., Ceré, S. M., Goldmann, W. H., & Boccaccini, A. R. (2020). Functional behavior of chitosan/gelatin/silica-gentamicin coatings by electrophoretic deposition on surgical grade stainless steel. *Biomaterials*, 31(22), 5865-5874. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111062>
- Borhan, S., & Esmailzadeh, J. (2023). The Effect of Bioactive Glass Synthesis Method on the Flowability and Structural Stability of the Injectable Pastes Prepared from It. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.30501/jamt.2023.376241.1259>
- Chang, M. C., Ko, C. C., & Douglas, W. H. (2003). Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*, 24(17), 2853-2862. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00115-7)
- Chang, M. C., Ikoma, T., & Tanaka, J. (2004). Cross-linkage of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite using EGDE. *Journal of materials science*, 39(16-17), 5547-5550. <https://doi.org/10.1023/B:JMSC.0000039284.70028>
- Chiani, E., Beaucamp, A., Hamzeh, Y., Azadfallah, M., Thanusha, A. V., & Collins, M. N. (2023). Synthesis and characterization of gelatin/lignin hydrogels as quick release drug carriers for ribavirin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 1196-1205. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.205>
- Das, M. P., Suguna, P. R., Prasad, K. A. R. P. U. R. A. M., Vijaylakshmi, J. V., & Renuka, M. (2017). Extraction and characterization of gelatin: a functional biopolymer. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 9(9), 239. [10.22159/ijpps.2017v9i9.17618](https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i9.17618)
- Dorozhkin, S. V. (2011). Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater*, 1(2), 121-164. <https://doi.org/10.4161/biom.18790>
- Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C., & Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of biomedical materials research*, 5(6), 117-141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>
- Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 121-136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6)
- Khorsand Zak, A., Yousefi, R., Abd Majid, W. H., & Muhamad, M. R. (2012). Facile synthesis and X-ray peak broadening studies of Zn1-xMgxO nanoparticles. *Ceramics International*, 38(3), 2059-2064. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.10.042>
- Kim, H. W., Kim, H. E., & Salih, V. (2005). Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 26(25), 5221-5230. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.047>
- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1990). Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of biomedical materials research*, 24(6), 721-734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>
- Kokubo, T. (1998). Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta materialia*, 46(7), 2519-2527. [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(98\)80036-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(98)80036-0)
- Lakshmi, R., & Sasikumar, S. (2015). Influence of needle-like morphology on the bioactivity of nanocrystalline wollastonite—an in vitro study. *International journal of nanomedicine*, 10(sup2), 129-136. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.2147/IJN.S79986>
- Lao, J., Dieudonne, X., Fayon, F., Montouillout, V., & Jallot, E. (2016). Bioactive glass-gelatin hybrids: Building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(14), 2486-2497. <https://doi.org/10.1039/C5TB02345A>
- Mollaqaesem, V. K., Ardakani, M. H., & Hesarakhi, S. (2013). Effects Bone Regeneration Using Nanotechnology—Calcium Silicate Nano-Composites. *Journal of Research in Science, Engineering and Technology*, 1(04), 1-4.

20. Nabipour, Z., Nourbakhsh, M. S., & Baniasadi, M. (2018). Evaluation of ibuprofen release from gelatin/hydroxyapatite/polylactic acid nanocomposites. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 75-84. <https://doi.org/10.22034/IJPS.2018.32051>
21. Palakurthy, S., & Samudrala, R. K. (2019). In vitro bioactivity and degradation behaviour of β -wollastonite derived from natural waste. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.101>
22. Radev, L., Fernandes, M., Salvado, I., & Kovacheva, D. (2009). Organic/Inorganic bioactive materials Part III: in vitro bioactivity of gelatin/silicocarnotite hybrids. *Open Chemistry*, 7(4), 721-730. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0078-z>
23. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>
24. Rhee, S. H., & Tanaka, J. (1998). Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method. *Journal of the American Ceramic Society*, 81(11), 3029-3031. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02734.x>
25. Riaz, M., Zia, R., Aslam, S., Qamar, A., Hussain, T., & Anjum, S. (2019). Low temperature synthesis of wollastonite using sol-gel combustion method: In vitro bioactivity evaluation. *International Journal of Modern Physics B*, 33(10), 1950081. <https://doi.org/10.1142/S0217979219500814>
26. Touny, A. H., Laurencin, C., Nair, L., Allcock, H., & Brown, P. (2008). Formation of composites comprised of calcium deficient HAp and cross-linked gelatin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 3193-3201. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3459-5>
27. Vallet-Regí, M. (2006). Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Transactions*, (44), 5211-5220. <https://doi.org/10.1039/B610219K>
28. Wu, C., Zhang, Y., Ke, X., Xie, Y., Zhu, H., Crawford, R., & Xiao, Y. (2010). Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein-delivery properties by biomimetic surface modification. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(2), 476-485. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32873>
29. Zamanian, A., & Banafatizadeh, F. (2022). The effect of adding different percentages of γ -Glycidioxypropyltrimethoxysilane cross-linker on properties of freeze-dried gelatin/chitosan scaffolds with introducing Optimum Condition for Cross-linking the Chitosan/Gelatin Scaffolds for Bone Tis. *Journal of Advanced Materials and Technologies*. <https://doi.org/10.30501/jamt.2022.347635.1229>
30. Zhang, X., Jia, W., Gu, Y., Xiao, W., Liu, X., Wang, D., & Zhou, N. (2010). Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model. *Biomaterials*, 31(22), 5865-5874. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.005>
31. Zhang, Y., Jiang, Y., Han, L., Wang, B., Xu, H., Zhong, Y., & Sui, X. (2018). Biodegradable regenerated cellulose-dispersed composites with improved properties via a pickering emulsion process. *Carbohydrate polymers*, 179, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.065>
32. Zheng, Y., Wang, C., Zhou, S., & Luo, C. (2021). The self-gelation properties of calcined wollastonite powder. *Construction and Building Materials*, 290, 123061. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.123061>