

## اثر دما و زمان بر همگنی کامپوزیت‌های پلی (لاکتیک اسید)/ هیدروکسی آپاتیت در داربست‌های استخوانی

فاطمه فارغدلی<sup>۱</sup>، مهسا کریمی<sup>۲</sup>، اشکان نوین<sup>۳</sup> و مهران صولتی هاشجین<sup>۱\*</sup>

۱- دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲- دانشکده مهندسی مکانیک و علم مکانیک، دانشگاه درکسل، فیلادلفیا، ایالت متحده آمریکا

۳- دانشکده مهندسی پزشکی، بخش سلامت دانشگاه کانکتیکات، فارمینگتون، ایالت متحده آمریکا

(دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۸/۲۱ - دریافت نسخه نهایی: ۱۴۰۰/۶/۲۲)

**چکیده**- یکی از چالش‌های تهیه کامپوزیت‌های پلیمر/سرامیک، عدم توزیع یکنواخت ذرات سرامیکی در ماتریس پلیمری است. در این مطالعه تأثیر دو عامل دما و زمان بر توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در ماتریس پلی (لاکتیک اسید) بررسی شد. بدین منظور، سه دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و چهار زمان ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت برای اختلاط سوسپانسیون سرامیکی با محلول پلیمری در نظر گرفته شد. از آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه برای ارزیابی کامپوزیت‌ها استفاده شد که نشان داد که تشکیل پیوندهای فیزیکی مانند کربوکسیل-کلسیم- کربوکسیل بین هیدروکسی آپاتیت و زمینه پلیمر، بر نحوه پراکندگی ذرات تأثیر داشت. از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس برای مشاهده توزیع ذرات و تعیین میزان همگنی نمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور ابتدا تصاویر حاصل از طیف‌سنجی انرژی پراش پرتوی ایکس که نقشه حضور کلسیم را ارائه می‌دهد؛ به نه بخش مساوی تقسیم و از روش جدیدی بر پایه فاکتور توزیع ( $\alpha$ ) برای محاسبه میزان همگنی نمونه‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه تهیه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴۸ ساعت توزیع یکنواخت‌تری نسبت به دیگر نمونه‌ها داشت.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، کامپوزیت، همگنی، انحراف معیار.

### فهرست علامت‌ها

ارتفاع واحد شبکه بلور	c	آنگستروم	Å
واحد عدد موجی	cm <sup>-1</sup>	درجه سانتی‌گراد	°C
بی‌اچ- مقیاسی برای تعیین میزان اسیدی یا بازی بودن یک محلول	pH	کلسیم	Ca
فاکتور توزیع	$\alpha$	هیدروژن	H

\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehran.solati@gmail.com

N	نیروژن	$\beta$	فاکتور چولگی
O	اکسیژن	$2\theta$	زاویه پراش
P	فسفر	c	ارتفاع واحد شبکه بلور
a	طول واحد شبکه بلور		

## ۱- مقدمه

از دست رفتن استخوان، یکی از عمده‌ترین مشکلاتی است که تأثیر چشمگیری بر کیفیت زندگی افراد می‌گذارد و با وجود مطالعات بسیاری که در این زمینه انجام شده است، این مشکل همچنان از بزرگ‌ترین چالش‌های پزشکی محسوب می‌شود. تاکنون از روش‌های مختلفی برای درمان آسیب‌های استخوانی استفاده شد که از بین آنها، استفاده از اتوگرفت استخوان دارای استاندارد طلایی است؛ اما همه روش‌های به‌کار گرفته شده محدودیت‌هایی دارند که استفاده از آنها را به‌عنوان یک روش ایده‌آل محدود می‌سازند. از این رو چندین دهه است که رویکرد مهندسی بافت استخوان به‌عنوان روشی قابل اعتماد معرفی شد تا بر محدودیت‌های روش‌های پیشین غلبه کند. در این روش از ترکیب سلول و داربست برای زیست‌تقلیدی بافت استخوان طبیعی استفاده می‌شود. داربست به ساختار متخلخل و مصنوعی اطلاق می‌شود که از تشکیل بافت سه‌بعدی حمایت می‌کند [۱]. در سال‌های اخیر، در نتیجه استقبال از رویکردهای زیست‌تقلیدی و جلوگیری از ایجاد سپر تنشی، پژوهش‌های زیادی بر ساخت و ارزیابی خواص و عملکرد داربست‌های کامپوزیتی در مهندسی بافت استخوان متمرکز شده است. ترکیبات کامپوزیتی که به‌عنوان داربست استخوان استفاده می‌شوند باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بوده و توانایی یکپارچه شدن با استخوان را داشته باشند. همچنین وجود تخلخل‌های راه به در<sup>۱</sup> برای نقل و انتقال مواد معدنی و ضایعات سلولی نیز از نیازمندی‌های یک داربست مناسب است [۲ و ۳]. از روش‌های مختلفی برای ساخت داربست‌های استخوانی استفاده می‌شود که می‌توان به خشک کردن انجمادی، قالب‌گیری حلال، جداسازی فازی، الکتروریسی و نمونه‌سازی سریع اشاره کرد [۴]. یکی از روش‌های نمونه‌سازی سریع،

رسوب‌نشانی ذوبی<sup>۲</sup> است که در آن از فیلامان‌های بر پایه پلیمرهای ترموپلاستیک برای تهیه داربست‌های سه‌بعدی استفاده می‌شود [۵]. برای بهبود هدایت استخوان و بهینه‌سازی سرعت تخریب داربست‌ها معمولاً از ترکیب سرامیک و پلیمر به‌عنوان زیست‌مواد سازنده فیلامان‌ها استفاده می‌شود [۶]؛ اما یکی از چالش‌های مهم در این زمینه، تهیه فیلامان‌های همگن و یکنواخت است که تأثیر زیادی بر فرایند چاپ، خواص فیزیکی ساختار به‌دست آمده و عملکرد آن در بدن دارند [۷].

برای بهره‌وری همزمان از خواص هدایت استخوانی<sup>۳</sup> سرامیک‌ها و قابلیت کنترل زیست‌تخریب‌پذیری خوب پلیمرها، کامپوزیت‌های سرامیک/ پلیمر گوناگونی ساخته شدند. یکی از زیست‌مواد پلیمری متداول در تهیه داربست‌های استخوانی، پلی (لاکتیک اسید)<sup>۴</sup> است. این زیست‌ماده به‌دلیل زیست‌جذب‌پذیری و زیست‌تخریب‌پذیری در پزشکی به‌وفور استفاده می‌شود، اما در مورد کاربردهای استخوانی، عملکرد مکانیکی ضعیف و هدایت استخوانی پایینی دارد و به‌دلیل آبرگریز بودن، چسبندگی سلولی مناسبی از خود نشان نمی‌دهد؛ از این رو لازم است تا با یک جزء دوم کامپوزیت شود [۸ و ۹]. یکی از زیست‌موادی که می‌توان از آن به‌عنوان فاز دوم کامپوزیت استفاده کرد، هیدروکسی آپاتیت<sup>۵</sup> است. شباهت هیدروکسی آپاتیت با ترکیبات سازنده استخوان و داشتن زیست‌سازگاری بالا، منجر به استفاده فراوان این زیست‌ماده در ساخت کاشتنی، پوشش‌دهی و مهندسی بافت استخوان استفاده می‌شود [۶ و ۱۰]. کامپوزیت‌های به‌دست آمده از ترکیب پلی (لاکتیک اسید) و هیدروکسی آپاتیت خواص مکانیکی، پیوستگی ساختاری و انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به اجزای تشکیل‌دهنده خود نشان می‌دهند [۱۱]. اما کلید بهره‌برداری از خواص ویژه کامپوزیت پلی (لاکتیک اسید)/ هیدروکسی آپاتیت در روش رسوب‌نشانی ذوبی، توزیع

یکنواخت فاز سرمایی در بستر پلیمری است؛ که عوامل مختلفی از جمله غلظت، اندازه و شکل ذرات بر آن و پیرو آن بر دیگر خواص کامپوزیت تأثیر می‌گذارد [۷].

روش‌های گوناگونی برای ارزیابی توزیع ذرات در کامپوزیت‌ها وجود دارد که بیشتر بر پایه پارامترهای ریزساختار هستند؛ مانند غلظت موضعی، تعداد ذرات و فاصله بین ذرات مجاور. همچنین از معادلات ریاضی و پارامترهای آماری همچون انحراف معیار، ضریب انحراف و واریانس نیز برای بررسی توزیع ذرات استفاده می‌شود [۷]. از آنجا که عوامل متعددی بر توزیع فاز دوم در ماتریس تأثیر می‌گذارند، به‌دست آوردن کامپوزیت همگن چالش بزرگی محسوب می‌شود که مستلزم مطالعه و تحقیق دقیق است.

در سال ۲۰۰۷ میلادی، کیم و همکاران برای بررسی چگونگی توزیع نانوذرات آلومینا در پلیمر پلی(اتیلن ترفتالات) از سه روش استفاده کردند؛ که شامل: (۱) محاسبه چگالی ذرات، (۲) شاخص مورسیتا<sup>۷</sup> و (۳) روش مستطیلی بود. در این مطالعه، تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری، به نواحی مستطیلی کوچک‌تر تقسیم شدند و تعداد ذرات در هر ناحیه شمرده شد و در نهایت به‌کمک پارامتری به‌نام  $\beta$  (فاکتور چولگی<sup>۸</sup>)، یکی از پارامترهای موجود برای بررسی توزیع ذرات، پراکندگی ذرات در نمونه‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد که روش مستطیلی در مقایسه با دو روش دیگر، مناسب‌تر است [۱۲]. در سال ۲۰۰۹ میلادی، بارکر و همکاران از میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۹</sup> و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس<sup>۱۰</sup> برای بررسی توزیع ذرات آلومینیوم در گرافیت استفاده کردند. در این مطالعه، هر تصویر با بزرگنمایی  $200\times$  به ۲۵ قسمت (مستطیل شکل) تقسیم شد و مجدد برای بررسی توزیع ذرات، از فاکتور  $\beta$  استفاده شد [۱۳]. در سال ۲۰۱۳ میلادی، کونگر برای بررسی توزیع زیرکونیا در ماتریس مولیت، از یک روش جدید استفاده کرد که در آن روش، اساس تحلیل برحسب تقسیم‌بندی تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش معرفی شده، به اندازه روش‌های متداول دیگر

مؤثر بوده و استفاده از تصاویر برای تحلیل، درک مطلب را راحت‌تر کرده است [۱۴].

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر دو عامل دما و زمان بر توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) و هیدروکسی آپاتیت است. با وجود روش‌های متداولی که برای بررسی چگونگی توزیع ذرات در کامپوزیت وجود دارد، در این مطالعه به‌منظور سهولت و درک بیشتر، از روش جدیدی استفاده شد که بر پایه محاسبه انحراف معیار و پارامتر جدیدی به نام فاکتور توزیع ( $\alpha$ ) است که از تقسیم انحراف معیار بر میانگین تعداد ذرات هیدروکسی آپاتیت مشاهده شده در هر نمونه، به‌دست می‌آید. از آنجا که کاربرد نهایی این کامپوزیت در تهیه فیلامان‌های قابل استفاده برای چاپ سه‌بعدی به‌روشن رسوب‌نشانی ذوبی است، یکنواخت بودن ذرات هیدروکسی آپاتیت در آن بر کیفیت فرایند چاپ و خواص مکانیکی سازه نهایی تأثیر می‌گذارد [۱۵ و ۱۶]. از این رو به‌نظر می‌رسد با کنترل دما و زمان تخلیص هیدروکسی آپاتیت در محلول پلیمری، بتوان به نمونه‌های یکنواخت‌تر دست یافت. برای بررسی تأثیر این دو عامل، ابتدا کامپوزیت‌های پلی(لاکتیک اسید)/هیدروکسی آپاتیت در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد هرکدام به‌صورت جداگانه در چهار زمان ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تهیه شده و سپس با استفاده از پراش پرتوی ایکس، طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه<sup>۱۱</sup>، میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس ارزیابی شدند.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- مواد

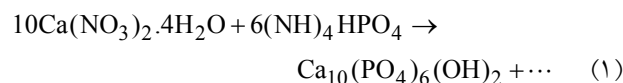
در این پژوهش از کلسیم نیترات چهار آب (Merck)، دی‌آمونیم هیدروژن فسفات (Merck)، سدیم هیدروکسید (Merck، ۱۰۱۲۰۷۰۵۰۰) و سدیوم هیدروکسید (Merck، ۱۰۶۴۶۲۱۰۰۰) برای سنتز هیدروکسی آپاتیت و از پلی(لاکتیک اسید) (Sigma-Aldrich، ۳۸۵۳۴) با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰ گرم بر مول برای ساخت کامپوزیت پلیمری استفاده شد. همچنین از کلروفرم (Sigma-Aldrich، ۲۸۸۳۰۶) نیز به‌عنوان حلال استفاده شد.

جدول ۱- نامگذاری نمونه‌ها

نام نمونه	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ساعت)
S-۲۵-۶	۲۵	۶
S-۳۷-۶	۳۷	۶
S-۴۵-۶	۴۵	۶
S-۲۵-۱۲	۲۵	۱۲
S-۳۷-۱۲	۳۷	۱۲
S-۴۵-۱۲	۴۵	۱۲
S-۲۵-۲۴	۲۵	۲۴
S-۳۷-۲۴	۳۷	۲۴
S-۴۵-۲۴	۴۵	۲۴
S-۲۵-۴۸	۲۵	۴۸
S-۳۷-۴۸	۳۷	۴۸
S-۴۵-۴۸	۴۵	۴۸

## ۲-۲- سنتز نانوذرات هیدروکسی آپاتیت

برای تهیه هیدروکسی آپاتیت ابتدا ۲۳/۶۱ گرم کلسیم نیترات چهار آبه در ۶۶۷ میلی‌لیتر آب حل شد. سپس ۷/۹ گرم دی‌آمونیم هیدروژن فسفات در ۶۶۷ میلی‌لیتر آب حل و به آرامی به محلول کلسیم نیترات اضافه شد. در اتمام مرحله انحلال، برای آنکه pH محلول نهایی به ۱۱ برسد، محلول یک مولار سدیم هیدروکسید در آب تهیه و از آن برای کنترل pH استفاده شد. پس از اتمام این مرحله، محلول به دست آمده به مدت ۲۲ ساعت روی همزن مغناطیسی همزده شد تا فرایند پیری صورت بگیرد. در پایان، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت طبق معادله (۱)، پس از شستن رسوب‌ها با آب دیونیزه و خشک کردن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمدند.



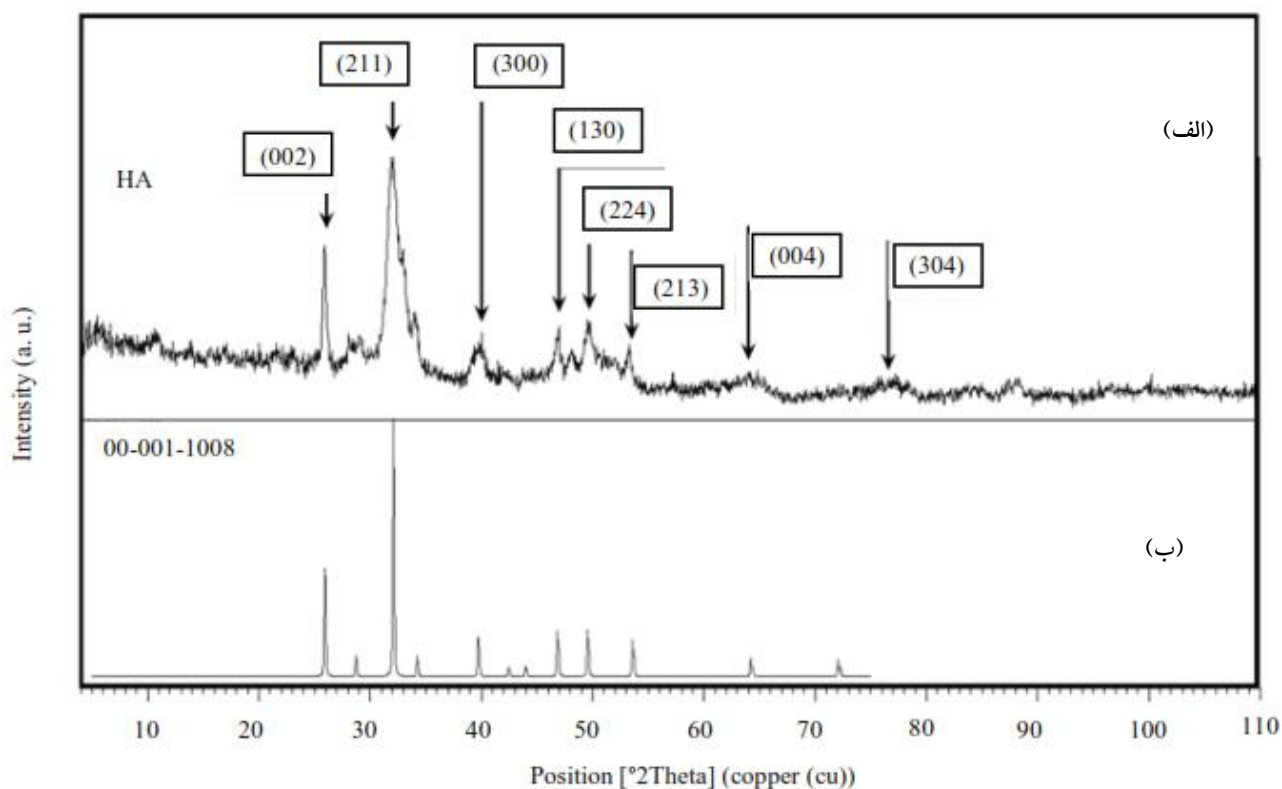
## ۲-۳- تهیه کامپوزیت پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت

برای تهیه کامپوزیت پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت با نسبت ۱:۴، ابتدا ۰/۸ گرم پلی (لاکتیک اسید) به هشت میلی‌لیتر

کلروفرم که تحت همزن مغناطیسی قرار داشت، به آرامی اضافه شد و زمان داده شد تا محلول کاملاً شفاف شود. سپس در ظرفی مجزا ۰/۲ گرم از هیدروکسی آپاتیت به دو میلی‌لیتر کلروفرم افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه فراصوت قرار داده شد تا ذرات آن از هم جدا شوند. سپس، دو ترکیب به دست آمده با هم مخلوط شده و تحت همزن قرار گرفتند. با توجه به نوع نمونه، دمای همزن و مدت زمان هم‌زدن متفاوت بود. نحوه نامگذاری نمونه‌ها در جدول (۱) ارائه شد.

## ۲-۴- مشخصه‌یابی

به منظور مطالعه ساختار بلورهای هیدروکسی آپاتیت و محاسبه اندازه بلور آن، از پراش پرتوی ایکس (Inel, EQUknox 3000, France) و برای بررسی ریزساختار و گروه‌های عاملی پلی (لاکتیک اسید) خالص و نمونه‌های پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت از طیف‌سنج مادون قرمز (Spectrum RX1, PerkinElmer, America) استفاده شد. الگوها در حالت جذب<sup>۱۲</sup> و در بازه عدد موجی ۴۰۰۰-۴۰۰ بر سانتی‌متر تهیه شدند.



شکل ۱- مقایسه الگوی پراش پرتوی ایکس پیک‌های هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با پیک‌های هیدروکسی آپاتیت در کارت مرجع: (الف) پیک‌های هیدروکسی آپاتیت سنتز شده و (ب) پیک‌های هیدروکسی آپاتیت در کارت مرجع

هیدروکسی آپاتیت هستند، آشکار شده‌اند [۱۷]. پیک‌های مشاهده شده در برخی زوایا مانند  $2\theta = 33/48$  را می‌توان در نتیجه حضور ذرات ناخالصی نظیر یون‌های سدیم و کربنات دانست؛ چرا که پیک‌ها در الگوی آپاتیت سنتز شده پهن‌تر و با شدت کمتر بوده که می‌توان آنها را دلیل بر تشکیل آپاتیت کربناته اندکی غیراستوکیومتری دانست.

برای محاسبه اندازه بلورک‌های هیدروکسی آپاتیت از فرمول شرر استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده در جدول (۲) می‌توان گفت که ذرات آپاتیت سنتز شده، در مقیاس نانو بوده و اندازه بلورها در حدود نه نانومتر است. همچنین با توجه به اینکه در ساختار بسته شش ضلعی<sup>۱۳</sup> صفحه‌های اتمی به‌صورت یکی در میان تکرار می‌شوند، فاصله بین هر صفحه در این ماده برابر با  $2/79$  آنگستروم محاسبه شد.

برای بررسی مورفولوژی سطح کامپوزیت‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (AIS2100, seron Technologies, south korea) استفاده شد. همچنین برای بررسی نحوه توزیع هیدروکسی آپاتیت و میزان همگنی نمونه، از آنالیزگر طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس که به‌طور مستقیم به میکروسکوپ الکترونی روبشی وصل است، استفاده شد.

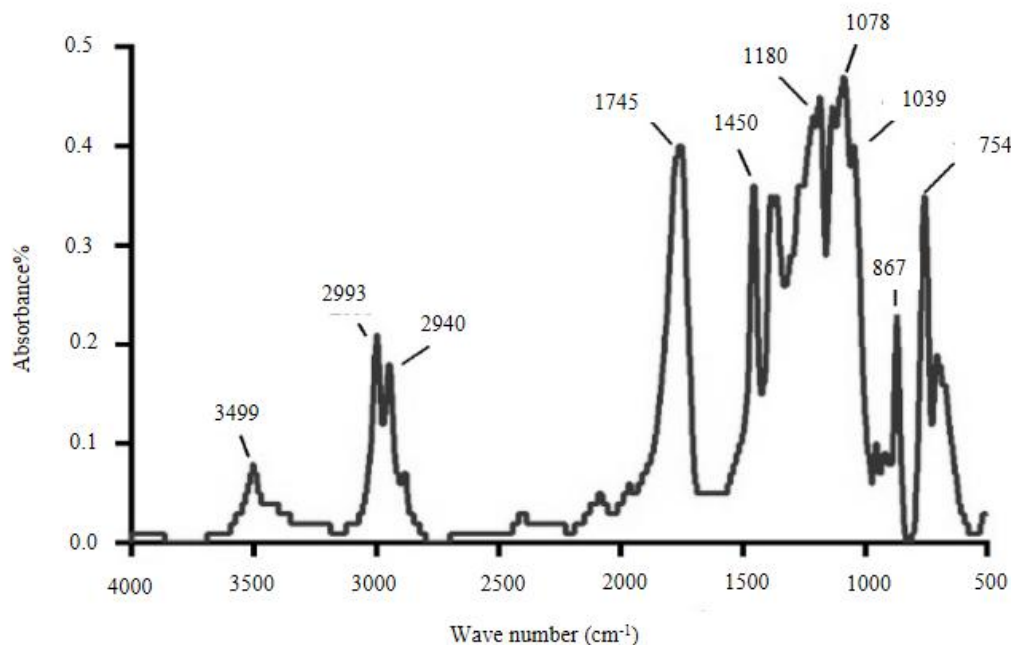
### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مطالعه ساختار بلوری

الگوی پراش پرتوی ایکس ساختار بلوری پودر هیدروکسی آپاتیت اولیه در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، محل پیک‌ها با کارت‌های مرجع انجمن استانداردهای پراش پودرها (با شماره ۰۴۳۲-۰۹) منطبق بوده و قله‌های مرتبط با صفحات (۰۰۲) و (۲۱۱) که قله‌های شاخص

جدول ۲- فواصل صفحات اتمی و اندازه بلورک‌های هیدروکسی آپاتیت سنتز شده

فاصله صفحات (آنگستروم)	اندازه بلورک (آنگستروم)	بیشینه زاویه پراش ( $2\theta$ )	a (آنگستروم)	c (آنگستروم)	هیدروکسی آپاتیت
۲/۷۹۰	۲۸۸	۳۲/۰۵	۸/۵۳۶	۲/۷۹۰	



شکل ۲- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه از پلی (لاکتیک اسید) خالص

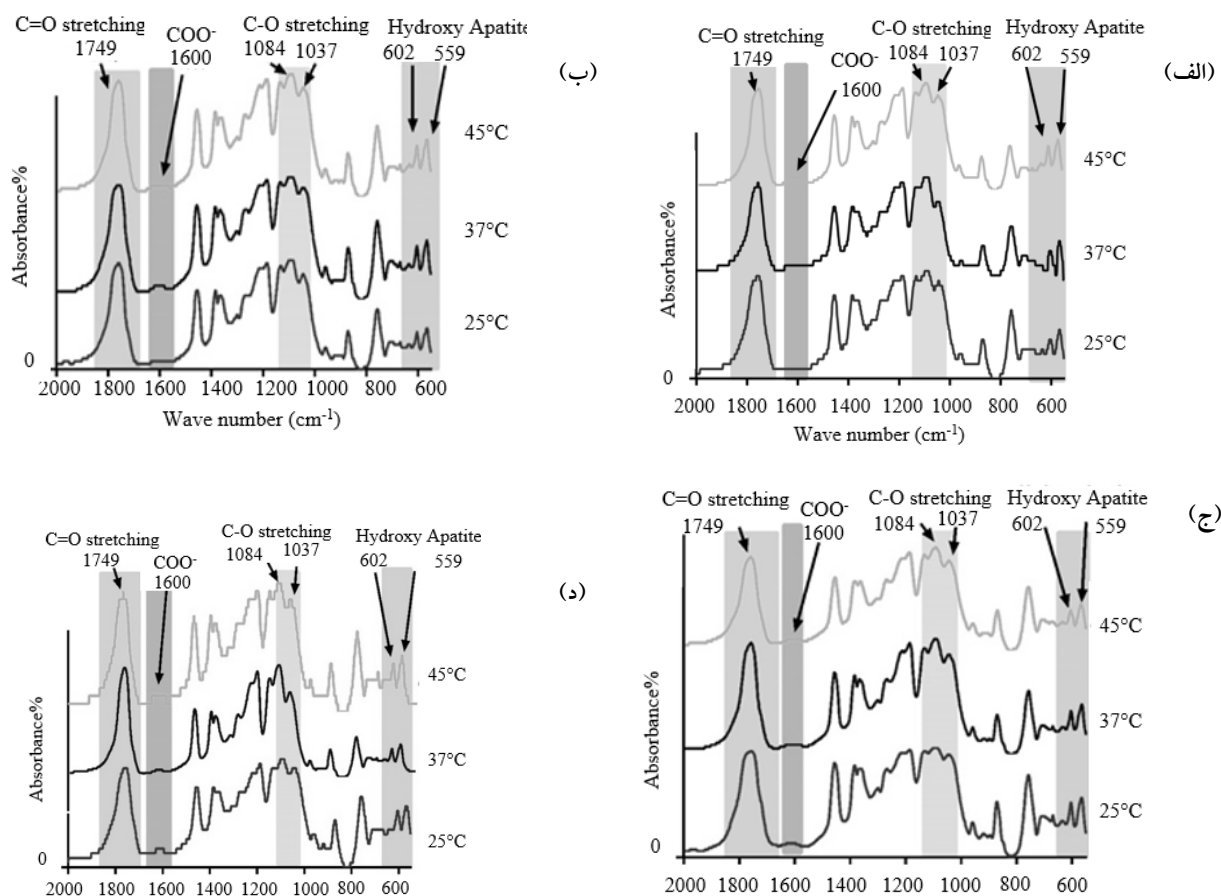
### ۲-۳- مطالعه پیوندهای موجود در کامپوزیت

برای اطمینان از ماهیت پلی (لاکتیک اسید) خریداری شده و بررسی پیک‌های مربوط به پیوندهای شیمیایی آن، از پلی (لاکتیک اسید) اولیه آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه تهیه و با پیک‌های مرجع مقایسه شد. سه پیک اصلی پلی (لاکتیک اسید) در عددهای موجی ۱۰۴۰، ۱۰۸۴ و ۱۷۴۹ که به ترتیب بیانگر پیوند  $C-CH_3$  کششی،  $CO-C$  کششی و  $C=O$  کششی هستند، در شکل (۲) نمایان شد [۱۸]. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که پلی (لاکتیک اسید) مورد استفاده در این تحقیق با پلی (لاکتیک اسید) مرجع مطابقت داشته و همه پیک‌های مشخصه در آن حضور دارند.

الگوهای طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه مربوط به نمونه‌های پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت در چهار زمان ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ و سه دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد در

شکل (۳) نشان داده شده است. در هر یک از این نمودارها پیک‌های مشخصه پلی (لاکتیک اسید) وجود دارد که بیانگر ثابت ماندن ماهیت شیمیایی پلی (لاکتیک اسید) است. علاوه بر پیک‌های مشخصه پلی (لاکتیک اسید)، وجود پیک در اعداد موجی ۱۰۴۶، ۶۳۰ و ۵۷۶ بر سانتی‌متر، بیانگر وجود یون‌های فسفات مربوط به گروه‌های عاملی هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت ساخته شده است؛ به طوری که در پلی (لاکتیک اسید) خالص این پیک‌ها مشاهده نمی‌شود.

نکته‌ای که در شکل (۳) قابل توجه است، حضور یک پیک جدید با عدد موج حدودی ۱۴۱۴ بر سانتی‌متر است. احتمال می‌رود که برای تشکیل این پیک، گروه کربوکسیل از پلی (لاکتیک اسید) به شکل کربوکسیلات یونیزه شده و با یون‌های کلسیم موجود در هیدروکسی آپاتیت برهم‌کنش می‌دهد.



شکل ۳- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه کامپوزیت‌هایی که در طول:

(الف) ۶ ساعت، (ب) ۱۲ ساعت، (ج) ۲۴ ساعت و (د) ۴۸ ساعت در دماهای مختلف تهیه شدند.

مربوط به C=O بر اثر تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و C=O به عددهای موجی بالاتر انتقال یافت که این موضوع در شکل (۳) نیز مشاهده می‌شود، به طوری که پیک مربوط به C=O در پلی(لاکتیک اسید) از عدد موجی ۱۷۴۵ بر سانتی‌متر به عدد موجی ۱۷۴۹ بر سانتی‌متر منتقل شد.

افزون بر آن در طیف‌های حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه فیلم‌های کامپوزیتی پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت، نسبت شدت پیک پیوند C-O-C در عدد موجی ۱۰۸۴ بر سانتی‌متر نسبت به پیک C-CH<sub>3</sub> در ۱۰۳۷ بر سانتی‌متر حائز اهمیت است. به طوری که هرچه نسبتشان بیشتر باشد، برهم‌کنش بین ذرات هیدروکسی آپاتیت و زنجیره‌های

حاصل برهم‌کنش این دو گروه، پیوند کربوکسیل-کلسیم-کربوکسیل است که بر رفتار و خواص مکانیکی کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت تأثیر می‌گذارد [۱۹]؛ به طوری که در صورت عدم تشکیل این پیوند، کامپوزیت خواص مکانیکی کافی به خصوص استحکام کششی نخواهد داشت [۲۰ و ۲۱].

در مطالعه‌ای از نجاتی و همکاران نیز این پدیده مشاهده شد، به طوری که به جای پیک جذبی در عدد موجی ۳۵۸۳ بر سانتی‌متر در پلی(لاکتیک اسید)، یک پیک جدید با عدد موجی ۱۴۱۴ بر سانتی‌متر در طیف کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت پدید آمد که احتمالاً نتیجه برهم‌کنش کربوکسیلات یونیزه شده با یون کلسیم موجود در نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بود. علاوه بر آن مشاهده شد که پیک‌های

شکل (۴) و تصویر نمونه‌هایی که در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۴۸ ساعت اختلاط تهیه شدند نیز در شکل (۵) نشان داده شده است. به دلیل بالا بودن تعداد تصاویر، از آوردن همه آنها در متن خودداری شد.

در این مطالعه به منظور بررسی کمی نقش دما و زمان بر توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت نهایی، از فاکتور انحراف معیار استفاده شد؛ بدین صورت که ابتدا تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی هر نمونه و سپس نقشه‌ای از محل قرارگیری کلسیم‌های موجود در آن به کمک آنالیزگر طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس تهیه شد. سپس تصاویر به دست آمده از پراش انرژی پرتوی ایکس به نه بخش مساوی تقسیم شده و تعداد نقاط هر بخش که معرف حضور کلسیم (خود به معنای حضور هیدروکسی آپاتیت) در آن محل است، به کمک نرم‌افزار ImageJ محاسبه شد. در نهایت، میانگین تعداد نقاط شمرده شده از نه بخش به همراه انحراف معیار آن برای هر نمونه، محاسبه شد.

در داده‌های آماری، هرچه انحراف معیار کمتر باشد، توزیع یکنواخت‌تر است؛ پس به نظر می‌رسد بتوان نمونه‌ای را که دارای حداقل انحراف معیار است به عنوان نمونه بهینه انتخاب کرد. اما باید به این نکته نیز توجه شود که بر اثر عوامل مختلف مانند چسبیدن ذرات به دیواره ظروف، تعداد ذرات هیدروکسی آپاتیت موجود در سوسپانسیون‌های اولیه پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت با تعداد ذرات موجود در کامپوزیت به دست آمده از آنها با هم برابر نیستند؛ که خود بر توزیع ذرات در کامپوزیت نهایی تأثیر می‌گذارد. پرواضح است که هرچه ذرات موجود در سوسپانسیون کمتر باشد، احتمال همگن شدن آن بیشتر است. از این رو برای حذف وابستگی انحراف معیار به تعداد ذرات هیدروکسی آپاتیت، فاکتور جدیدی به نام فاکتور  $\alpha$  معرفی شد که از تقسیم انحراف معیار بر میانگین تعداد ذرات موجود در آن نمونه به دست می‌آید. از این رو برای انتخاب نمونه بهینه می‌توان فاکتور  $\alpha$  را در نظر گرفت؛ به طوری که هرچه  $\alpha$  کوچک‌تر باشد، نمونه همگن‌تر است. انحراف معیار و  $\alpha$  به دست آمده از هر نمونه، در جدول (۳) ارائه شد.

پلیمر بیشتر است. همان‌طور که در شکل (۳) مشخص است، در دماهای ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد این نسبت افزایش می‌یابد که بیانگر اهمیت دما بر برهم‌کنش ذرات هیدروکسی آپاتیت و پلیمر و یکنواخت شدن پراکندگی ذرات است [۲۲].

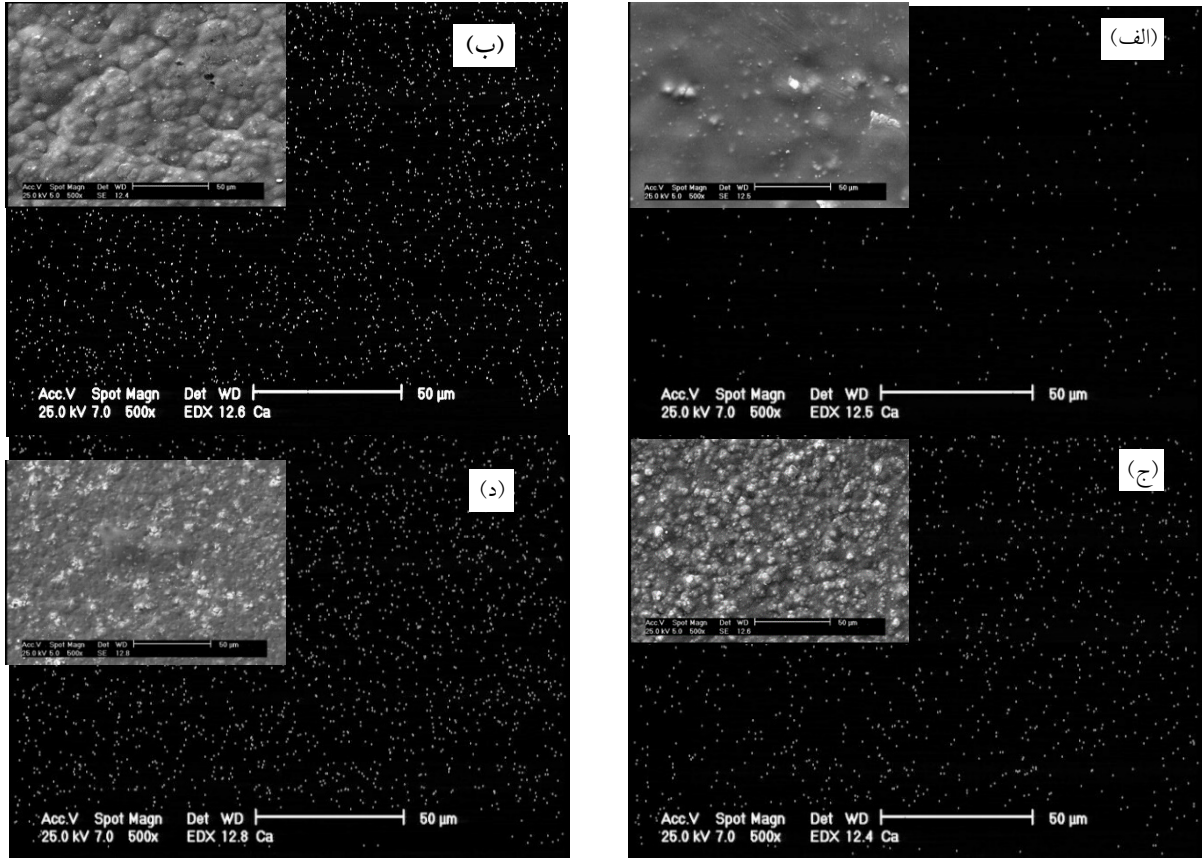
### ۳-۳- بررسی ریزساختار کامپوزیت

توزیع یکنواخت هیدروکسی آپاتیت در نمونه‌های کامپوزیتی پلی (لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت که به عنوان ماده ورودی در چاپ سه‌بعدی به روش رسوب‌نشانی ذوبی استفاده می‌شود، اهمیت زیادی دارد؛ زیرا کلوخه‌هایی که بر اثر عدم توزیع یکنواخت نانوذرات تشکیل می‌شوند، به مکان‌های برای تمرکز تنش و آغاز ترک تبدیل شده و استحکام مکانیکی فیلامان‌ها و داربست‌هایی را که در ادامه از آنها تهیه می‌شوند، کاهش می‌دهند [۲۰ و ۲۳].

توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در ماتریس پلیمری به عوامل متعددی از جمله انعطاف‌پذیری زنجیره‌های پلیمری، توانایی بلورینگی زنجیره‌ها، گروه‌های عاملی موجود و وزن مولکولی پلیمر بستگی دارد [۲۳]. علاوه بر آن نوع حلال و شرایط آزمایش مانند زمان و دمای اختلاط نیز بر توزیع ذرات و برهم‌کنش آنها با زنجیره‌های پلیمری تأثیر می‌گذارد [۲۰ و ۲۱]. در این مطالعه به منظور بررسی مورفولوژی نمونه‌ها و مشاهده توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در پلی (لاکتیک اسید)، از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی استفاده شد. همچنین برای مشاهده موقعیت ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت، از آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس استفاده شد تا نقشه‌ای از مکان کلسیم‌های موجود در کامپوزیت به دست آید. از آنجا که کلسیم یکی از اجزای اصلی تشکیل دهنده هیدروکسی آپاتیت است، نقشه به دست آمده از مکان کلسیم را می‌توان معادل نقشه ذرات هیدروکسی آپاتیت در نظر گرفت [۲۳ و ۲۴].

الگوی پراش انرژی پرتوی ایکس و تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی نمونه‌هایی که پس از ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاط، تحت دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شدند، در

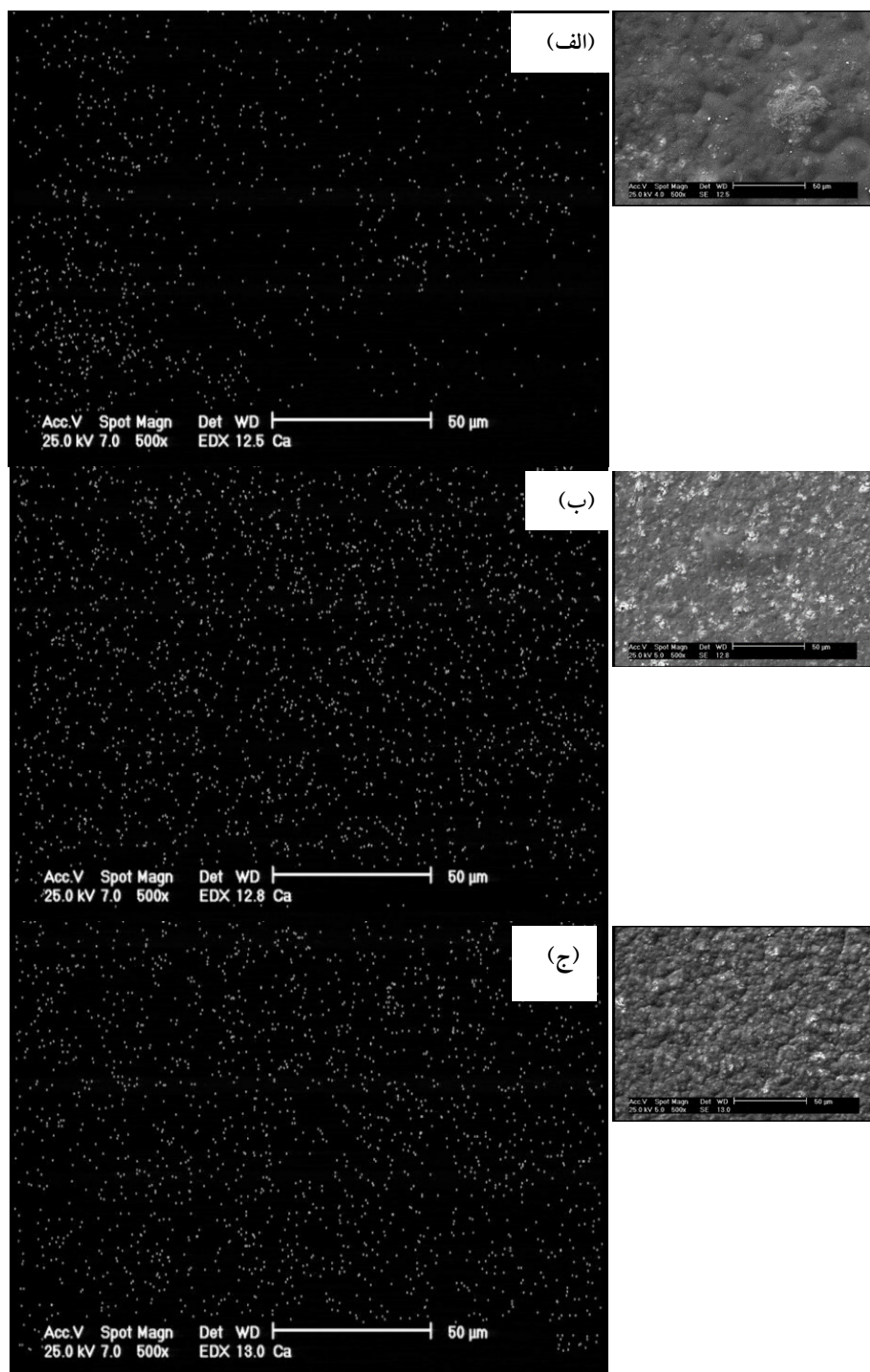




شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی به‌همراه نقشه پراکندگی عنصر کلسیم از کامپوزیت‌های تهیه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های: الف) ۶، ب) ۱۲، ج) ۲۴ و د) ۴۸ ساعت

جدول ۳- انحراف معیار و  $\alpha$  نمونه‌ها

نام نمونه	میانگین تعداد ذرات	انحراف معیار	فاکتور توزیع ( $\alpha$ )
S-۲۵-۶	۱۵۴/۳۳	۱۸/۶۹	۰/۱۲۱
S-۳۷-۶	۳۹	۵/۸۱	۰/۱۴۸
S-۴۵-۶	۹۳/۷۷	۱۴/۹۲	۰/۱۵۹
S-۲۵-۱۲	۱۸۶/۱۱	۱۹/۸۷	۰/۱۰۶
S-۳۷-۱۲	۱۲۵/۳۳	۱۶/۳۹	۰/۱۳۰
S-۴۵-۱۲	۱۱۴/۱۱	۱۳/۴۴	۰/۱۲۶
S-۲۵-۲۴	۱۷۶	۱۹/۴۷	۰/۱۱۰
S-۳۷-۲۴	۲۳۲/۳۳	۲۸/۷۱	۰/۱۲۳
S-۴۵-۲۴	۵۶۷/۲۲	۴۹/۰۳	۰/۰۸۶
S-۲۵-۴۸	۱۰۵/۸۸	۴۵/۰۷	۰/۴۲۵
S-۳۷-۴۸	۲۱۲/۸۸	۱۴/۳۷	۰/۰۶۷
S-۴۵-۴۸	۱۷۸/۱۱	۱۵/۷۸	۰/۰۸۹



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی به همراه نقشه پراکندگی عنصر کلسیم از کامپوزیت‌های تهیه شده در زمان ۴۸ ساعت و دماهای: (الف) ۲۵، (ب) ۳۷ و (ج) ۴۵ درجه سانتی‌گراد

کامپوزیت به خوبی پراکنده نشده‌اند. عدم توزیع یکنواخت ذرات در این نمونه می‌تواند ناشی از پایین بودن دما و به تبع آن، بالا بودن ویسکوزیتی سوسپانسیون پلی(لاکتیک اسید)/هیدروکسی

با توجه به جدول (۳) و مقادیر  $\alpha$  به دست آمده، به نظر می‌رسد که در نمونه S-۶-۲۵ که پس از شش ساعت اختلاط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد، ذرات هیدروکسی آپاتیت در

هیدروکسی آپاتیت در سوسپانسیون تثبیت شده و توزیع یکنواخت‌تری صورت گیرد، ۲) ذرات هیدروکسی آپاتیت موجود در سوسپانسیون اولیه پس از گذشت زمان، به هم چسبیده و تشکیل کلوخه دهند. برای مثال در مطالعه‌ای از بالاسیوانانداها و همکاران [۲۶] تأثیر زمان اختلاط بر توزیع ذرات آلومینیوم در ماتریس فلزی بررسی شد. نتایج نشان داد که زمان تأثیر مستقیم بر توزیع ذرات گذاشته است، به طوری که با افزایش زمان، توزیع ذرات یکنواخت‌تر شد. اما در این پژوهش مشاهده می‌شود که افزایش زمان حتماً منجر به توزیع یکنواخت‌تر نمی‌شود که جلوتر به آن پرداخته می‌شود.

برای بررسی همه نمونه‌ها، دو نکته اشاره شده در بالا حائز اهمیت است. حال با توجه به نتایج ارائه شده در جدول (۳)، می‌توان مشاهده کرد که در نمونه S-۱۲-۲۵، با اینکه زمان اختلاط به ۱۲ ساعت افزایش یافت، اما پراکندگی ذرات به خوبی صورت نگرفت. عدم یکنواخت بودن ذرات در این نمونه را می‌توان ناشی از پایین بودن دما و بالابودن ویسکوزیتی سوسپانسیون دانست.

در نمونه S-۱۲-۳۷، افزایش دما و افزایش زمان هیچکدام نتوانستند منجر به توزیع یکنواخت‌تر ذرات شوند؛ به طوری که کلوخه‌های تشکیل شده از هیدروکسی آپاتیت در این نمونه در شکل (۴-ب) کاملاً مشهود است. اما در نمونه S-۱۲-۴۵ با افزایش دما تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، همان‌طور که انتظار می‌رفت، نمونه همگن‌تری به دست آمد.

در سه نمونه بعدی، زمان اختلاط از ۱۲ ساعت به ۲۴ ساعت افزایش یافت؛ که با توجه به جدول (۳)، به طور کل میانگین ذرات موجود در این نمونه‌ها نیز افزایش یافته است. از این یافته‌ها به نظر می‌رسد که با افزایش دمای نمونه‌هایی که در طی ۲۴ ساعت اختلاط تهیه می‌شوند، ذرات هیدروکسی آپاتیت بیشتری در سوسپانسیون تثبیت می‌شوند.

با توجه به جدول (۳) و مقایسه  $\alpha$  سه نمونه تهیه شده در مدت زمان ۲۴ ساعت با سه نمونه تهیه شده در مدت زمان ۱۲ ساعت، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان به ۲۴ ساعت،

آپاتیت در حلال باشد که مانع از برهم‌کنش کافی بین زنجیره‌های پلی(لاکتیک اسید) و ذرات هیدروکسی آپاتیت می‌شود. این روند در مطالعه حسن آجیلی و همکاران [۲۵] که تنها سه ساعت زمان برای توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در محلول پلیمر (در دمای اتاق) در نظر گرفته بودند نیز مشاهده شد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد بسیاری از ذرات هیدروکسی آپاتیت در بستر پلیمری به صورت آگلومره باقی ماندند.

در نمونه S-۶-۳۷، زمان اختلاط با نمونه قبلی برابر است؛ اما دما اندکی افزایش یافته است. همان‌طور که از شکل (۴-الف) نیز مشخص است، ذرات هیدروکسی آپاتیت به شدت کلوخه شده و تعداد کمی از آنها در نمونه توزیع شده‌اند. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که از آنجا که زمان اختلاط کوتاه است، افزایش دما نمی‌تواند تأثیر قابل توجهی در توزیع یکنواخت ذرات بگذارد.

در نمونه S-۶-۴۵ دما تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. به طور کلی هر چه دما بیشتر شود، حرکت‌های زنجیره‌های پلیمری بیشتر شده و امکان برهم‌کنش آنها با ذرات هیدروکسی آپاتیت افزایش می‌یابد؛ اما همانند دو نمونه قبل که پس از شش ساعت اختلاط تهیه شدند، توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت نهایی، یکنواخت نبود.

نتایج حاصل از بررسی سه نمونه تهیه شده در مدت زمان شش ساعت نشان می‌دهد که به دلیل کوتاه بودن زمان اختلاط فرصت کافی برای برهم‌کنش ذرات هیدروکسی آپاتیت موجود با پلیمر پلی(لاکتیک اسید) فراهم نمی‌شود؛ از این رو تغییر دما و افزایش سرعت حرکت زنجیره‌های پلیمر نمی‌تواند تأثیر چندانی بر توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت نهایی بگذارد.

در سه نمونه بعدی، زمان اختلاط به ۱۲ ساعت افزایش یافت. با افزایش زمان اختلاط دو حالت ممکن است رخ دهد: ۱) افزایش زمان منجر به افزایش برهم‌کنش گروه‌های عاملی پلی(لاکتیک اسید) و هیدروکسی آپاتیت و تشکیل پیوند کربوکسیل-کلسیم-کربوکسیل شود؛ به طوری که ذرات

اختلاط و دمای نه چندان بالای این نمونه می‌توانند عوامل همگن بودن این نمونه باشند؛ به طوری که نه تنها زنجیره‌های پلیمری به مقدار کافی حرکت می‌کنند، بلکه برهم‌کنش کافی نیز با ذرات هیدروکسی آپاتیت برقرار کرده و پس از ۴۸ ساعت یک سوسپانسیون همگن از ذرات هیدروکسی آپاتیت در محلول پلیمر تشکیل می‌دهند.

در نمونه S-۴۵-۴۸، با اینکه دما افزایش می‌یابد، اما میانگین ذرات مشاهده شده کاهش یافته و توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت غیریکنواخت‌تر می‌شود. به نظر می‌رسد دمای بالای اختلاط در طول ۴۸ ساعت نمی‌تواند یکنواختی ذرات در سوسپانسیون را حفظ کند.

طبق نتایج ارائه شده در این مطالعه، همان‌طور که انتظار می‌رفت، دو عامل دما و زمان بر چگونگی توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت مؤثر بوده‌اند. عامل دما روی سرعت حرکت زنجیره‌های پلیمر و ویسکوزیتی سوسپانسیون پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت تأثیر می‌گذارد؛ که خود بر برهم‌کنش زنجیره پلی(لاکتیک اسید) با ذرات هیدروکسی آپاتیت مؤثر است. عامل زمان نیز در کلوخگی ذرات هیدروکسی آپاتیت بسیار اهمیت دارد.

کنترل توزیع ذرات در ماتریس پلیمری محدود به متغیرهای دما و زمان نشده و می‌توان از روش‌های دیگر نیز در این راستا استفاده کرد. برای مثال در مطالعه‌ای از هوای و همکاران [۲۷] پس از انحلال کامل پلی(لاکتیک اسید) در کلروفورم، سوسپانسیون تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت در اتانول، به صورت قطره‌قطره به محلول پلیمری اضافه شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق تحت همزن مغناطیسی قرار گرفت. در یک مطالعه دیگر از گولتکین و همکاران [۲۸] نیز که از گروه‌های عاملی سیلان برای اصلاح هیدروکسی آپاتیت استفاده شد، مشاهده شد که توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت همگن‌تر بوده است.

آنچه نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد این است

نمونه‌های یکنواخت‌تری به دست می‌آیند. همگن بودن نمونه‌ها می‌تواند ناشی از افزایش زمان اختلاط باشد؛ به طوری که به نمونه‌ها اجازه برهم‌کنش کافی بین پلی(لاکتیک اسید) و هیدروکسی آپاتیت داده می‌شود. همچنین مشاهده می‌شود که در نمونه S-۴۵-۲۴ که دارای حداکثر دما بین سه نمونه تهیه شده در ۲۴ ساعت است، ذرات دارای توزیع بسیار یکنواخت هستند. یکنواخت بودن این نمونه می‌تواند هم ناشی از بالا بودن زمان اختلاط و هم بالا بودن دمای اختلاط باشد؛ به طوری که در این شرایط احتمال تشکیل کلوخه به حداقل می‌رسد. از این رو می‌توان ادعا کرد که ترکیب این دما و زمان یکی از شرایط بهینه برای تهیه کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت است.

در سه نمونه بعدی که در شکل (۵) مشخص است، مدت زمان اختلاط تا ۴۸ ساعت افزایش یافت. با توجه به جدول (۳)، ذرات هیدروکسی آپاتیت موجود در نمونه S-۴۸-۲۵ نسبت به دیگر نمونه‌هایی که در همین دما (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تهیه شدند، دارای حداکثر مقدار  $\alpha$  است، بدان معنا که ذرات در این نمونه دارای توزیع غیریکنواخت‌تری هستند. عدم همگنی ذرات هیدروکسی آپاتیت در این نمونه می‌تواند ناشی از تأثیر همزمان پایین بودن دما و طولانی بودن زمان اختلاط باشد؛ زیرا در این دما، ویسکوزیتی بالای سوسپانسیون پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت مانع از حرکت آسان ذرات هیدروکسی آپاتیت موجود و منجر به کلوخه شدن می‌شود. از آنجا که زمان نیز نسبت به نمونه‌های دیگر بیشتر است، تأثیر مسئله گفته شده، پررنگ‌تر می‌شود. توزیع بسیار غیریکنواخت ذرات هیدروکسی آپاتیت در این نمونه، در شکل (۵-الف) قابل مشاهده است.

همان‌طور که در شکل (۵-ب) مشخص است، با افزایش دما در نمونه S-۴۸-۳۷، ذرات به طور یکنواخت‌تری پراکنده شده و کلوخگی کاهش می‌یابد. با نگاهی دقیق‌تر به جدول (۳) مشاهده می‌شود که نمونه S-۴۸-۳۷ با کمترین مقدار  $\alpha$ ، یکنواخت‌ترین نمونه به دست آمده است. مدت زمان بالای

ذرات هیدروکسی آپاتیت در نمونه‌های پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت، سه دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و چهار زمان ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. پس از شمارش ذرات هیدروکسی آپاتیت هر نمونه و مقایسه پراکندگی ذرات به کمک یک روش جدید، نمونه ۳۷-۴۸ S- به‌عنوان بهینه‌ترین نمونه، در نظر گرفته شد. با توجه به مشخص شدن دما و زمان بهینه برای تهیه کامپوزیت‌های پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت، مشکل عدم همگنی فیلامان‌های بر پایه پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت و خواص مکانیکی ضعیف آنها به‌حداقل می‌رسد؛ که منجر به بهبود فرایند چاپ و خواص نهایی داربست استخوان خواهد شد.

### تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از شرکت زیست‌نگار امیرکبیر و خانم دکتر میترا اسدی به‌خاطر در اختیار قرار دادن تجهیزات لازم و حمایت از این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

که افزایش مدت‌زمان اختلاط به‌تنهایی منجر به توزیع یکنواخت ذرات نمی‌شود؛ زیرا در دماهای پایین، با گذشت زمان ذرات هیدروکسی آپاتیت مجدد به‌هم چسبیده و تشکیل کلوخه می‌دهند. اما با افزایش دما امکان درگیری مکانیکی ذرات با زنجیره‌های پلیمری بیشتر می‌شود که خود بر توزیع یکنواخت‌تر و تقویت خواص مکانیکی آنها کمک می‌کند [۲۹ و ۳۰]. اما لازم است توجه شود که افزایش دما نیز به‌تنهایی نمی‌تواند توزیع یکنواخت ذرات سرامیکی در ماتریس پلیمری را ضمانت کند. برای مثال در مطالعه ماتئو و همکاران [۱۵] که تخلیط ذرات هیدروکسی آپاتیت در محلول پلیمر پلی(لاکتیک اسید) دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، تنها به‌مدت ۳۰ دقیقه انجام شد، توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت پلی(لاکتیک اسید) / هیدروکسی آپاتیت به‌دست آمده یکنواخت نبود.

### ۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای بررسی تأثیر دو عامل دما و زمان بر توزیع

### واژه‌نامه

- interconnected
- fused deposition modeling (FDM)
- osteoinductive
- polylactic acid (PLA)
- hydroxyapatite (HA)
- polyethylene terephthalate
- Morisita index
- Skewness factor
- scanning electron microscope (SEM)
- X-ray diffraction (XRD)
- Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)
- absorbance
- hexagonal closest packed

### مراجع

- Tariverdian, T., Sefat, F., Gelinsky, M., and Mozafari, M., *Scaffold for Bone Tissue Engineering in Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, Woodhead Publishing, 2019.
- Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., and Boccaccini, A. R., "Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 18, pp. 3413-3431, 2006.
- Kim, H. L., Jung, G. Y., Yoon, J. H., Han, J. S., Park, Y. J., Kim, D. G., Zhang, M., and Kim, D. J., "Preparation and Characterization of Nano-Sized Hydroxyapatite/Alginate/Chitosan Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Material Science of Engineering*, Vol. 54, pp. 5-20, 2015.
- Hutmacher, D. W., "Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues -State of the Art and Future Perspectives", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 12, No. 1, pp. 107-124, 2001.
- Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J. D., Yoo, J., and Soker, S., "Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds", *Stem Cells*

- Translational Medicine*, Vol. 1, No. 11, pp. 792-802, 2012.
6. Wei, G., and Ma, P. X., "Structure and Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 19, pp. 4749-57, 2004.
  7. Yakaboylu, G. A., and Sabolsky, E. M., "Determination of a Homogeneity Factor for Composite Materials by a Microstructural Image Analysis Method", *Journal of Microscopy*, Vol. 266, No. 3, pp. 263-272, 2017.
  8. Laput, O., Vasenina, I., Salvadori, M. C., Savkin, K., Zusa, D., and Kurzina, I., "Low-Temperature Plasma Treatment of Poly(lactic acid) and PLA/HA Composite Material", *Journal of Materials Science*, Vol. 54, No. 17, pp. 11726-11738, 2019.
  9. Mirhaj, M., Mahmoodi, M., and Shybani, A., "Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Properties of Keratin/Poly Caprolactone Nanofibers for Tissue Engineering", *Journal of Advanced Materials In Engineering*, Vol. 36, No. 4, pp. 45-57, 2018.
  10. Fathi, M. H., Hanifi, A., and Roohani Esfahani, S. I., "Synthesis, Characterization, and Comparative Bioactivity Evaluation of Nano Structured Hydroxyapatite", *Journal of Advanced Materials In Engineering*, Vol. 30, No. 2, pp. 1-12, 2011.
  11. Russias, J., Saiz, E., Nalla, R. K., Gryn, K., Ritchie, R. O., and Tomsia, A. P., "Fabrication and Mechanical Properties of PLA/HA Composites: A Study of in Vitro Degradation", *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic and Supramolecular Systems*, Vol. 26, No. 8, pp. 1289-1295, 2006.
  12. Kim, D., Lee, J. S., Barry, C. M., and Mead, J. L., "Microscopic Measurement of the Degree of Mixing for Nanoparticles in Polymer Nanocomposites by TEM Images", *Microscopy and Research Technique*, Vol. 70, No. 6, pp. 539-546, 2007.
  13. Barekar, N. T. S., Dhinaw, B. K., Patel, J., Hari Babu, N., and Fan, Z., "Processing of Aluminum-Graphite Particulate Metal Matrix Composites by Advanced Shear Technology", *Journal of Materials Engineering and Performance*, Vol. 18, pp. 1230-1240, 2009.
  14. Konegger, T., "Image-Analytical Evaluation of the Spatial Distribution of Particulate Fillers in Ceramic Composites Prepared via the Polymer-Derived Ceramics Route", *Materials Characterization*, Vol. 86, pp. 9-20, 2013.
  15. Mathieu, L., Bourban, P., and Manson, J., "Processing of Homogeneous Ceramic/Polymer Blends for Bioresorbable Composites", *Composites Science and Technology*, Vol. 66, No. 11-12, pp. 1606-1614, 2006.
  16. Pietrzykowska, E., Romelczyk-Baishya, B., Wojnarowicz, J., Sokolova, M., Szlczak, K., Swieszkowski, W., Locs, J., and Lojkowski, W., "Preparation of a Ceramic Matrix Composite Made of Hydroxyapatite Nanoparticles and Poly(lactic acid) by Consolidation of Composite Granules", *Nanomaterials (Basel)*, Vol. 10, No. 6, pp. 1006-1060, 2020.
  17. Nur, A., Jumari, A., Budiman, A. W., Wicaksono, A. H., Nurohmah, A. R., Nazriati, N., and Fajaroh, F., "Synthesis of Nickel – Hydroxyapatite by Electrochemical Method", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 543, pp. 12-26, 2019.
  18. Persson, M., Lorite, G. S., Cho, S. W., Tuukkanen, J., and Skrifvars, M., "Melt Spinning of Poly(lactic acid) and Hydroxyapatite Composite Fibers: Influence of the Filler Content on the Fiber Properties", *ACS Application Materials and Interfaces*, Vol. 5, No. 15, pp. 64-72, 2013.
  19. Nejati, E., Mirzadeh, H., and Zandi, M., "Synthesis and Characterization of Nano-hydroxyapatite rods/poly(l-lactide acid) Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, Vol. 39, No. 10, pp. 1589-1596, 2008.
  20. Supova, M., "Problem of Hydroxyapatite Dispersion in Polymer Matrices: a Review", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 6, pp. 1201-1213, 2009.
  21. Martynková, G. S., "Preparation and Mechanical Properties of Polymeric Nanocomposites with Hydroxyapatite and Hydroxyapatite/Clay Mineral Fillers – Review", *Nanotechnology: Nanomedicine & Nanobiotechnology*, Vol. 2, No. 3, pp. 1-8, 2015.
  22. Pande, A. M., Constantinescu, A., Radu, I. C., Miculescu, F., Ioan Voicu, S., and Ciocan, L. T., "Synthesis and Characterization of PLA-Microstructured Hydroxyapatite Composite Films", *Materials (Basel)*, Vol. 13, No. 2, p. 274., 2020.
  23. Goonasekera, C. S., Jack, K. S., Cooper-White, J. J., and Grondahl, L., "Dispersion of Hydroxyapatite Nanoparticles in Solution and in Polycaprolactone Composite Scaffolds", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 4, No. 3, pp. 409-421, 2016.
  24. Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., and Bonanno, E., "Energy Dispersive X-ray (EDX) Microanalysis: A Powerful Tool in Biomedical Research and Diagnosis", *European Journal of Histochemistry*, Vol. 62, No. 1, p. 2841, 2018.
  25. Hassanajili, S., Karami-Pour, A., Oryan, A., and Talaei-Khozani, T., "Preparation and Characterization of PLA/PCL/HA Composite Scaffolds Using Indirect 3D Printing for Bone Tissue Engineering", *Materials Science and Engineering: c*, Vol. 104, p. 109960, 2019.
  26. Prabu, S. B., Karunamoorthy, L., Kathiresan, S., and Mohan, B., "Influence of Stirring Speed and Stirring Time on Distribution of Particles in Cast Metal Matrix Composite", *Journal of Materials Processing*

- Technology*, Vol. 171, No. 2, pp. 268-273, 2006.
27. Ran, T. H. and Nguyen, K. N., "Effect of pore Architecture on Osteoblast Adhesion and Proliferation on Hydroxyapatite/Poly(D,L) Lactic Acid- Based Bone Scaffolds", *Journal of the Iranian Chemical Society*, Vol. 15, pp. 1663-1671, 2018.
28. Gültekin, N., Tıhminlıoğlu, F., Çiftçioğlu, R., Çiftçioğlu, M., and Harsa, Ş., "Preparation and Characterization of PolyLactide-Hydroxyapatite Biocomposites", *Key Engineering Materials*, Vol. 264-268, pp. 1953-1956, 2004.
29. Supova, M., "Problem of Hydroxyapatite Dispersion in Polymer Matrices: a Review", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 6, pp. 1201-13, 2009.
30. Bhowmik, R., Katti, K. S., and Katti, D., "Molecular Dynamics Simulation of Hydroxyapatite-Polyacrylic Acid Interfaces", *Polymer*, Vol. 48, No. 2, pp. 664-674, 2007.

# EFFECT OF TEMPERATURE AND TIME ON THE HOMOGENEITY OF POLYLACTIC ACID /HYDROXYAPATITE COMPOSITES FOR BONE SCAFFOLDS

F. Fareghdeli<sup>1</sup>, M. Karimi<sup>2</sup>, A. Novin<sup>3</sup> and M. Solati-Hashjin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Amirkabir University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Mechanical Engineering and Mechanics Department, Drexel University, Philadelphia, United States

<sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, University of Connecticut Health Center, Farmington, United States

(Received: 11 November 2020; Accepted: 13 September 2021)

## ABSTRACT

One challenge in preparing polymer/ceramic composites is non-uniform ceramic particles distribution in a polymer matrix. This research evaluated the effect of stirring time and temperature on hydroxyapatite (HA) distribution through (polylactic acid) PLA matrix. Therefore, to mix the ceramic suspension with the polymer solution, three temperatures, namely 25, 37, and 45°C and four times including 6, 12, 24 and, 48 h were examined. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was used to investigate the bonds, which showed physical bond formation such as carboxyl-calcium-carboxyl between HA and polymer matrix, influenced on particles distribution. Scanning electron microscopy (SEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were used to observe particles distribution and determine samples homogeneity. To fulfill this goal, each obtained photograph representing the calcium presentation was split into nine equal sections, and a method based on the newly defined index called dispersion factor “ $\alpha$ ” was used to analyze the distribution. Results showed that the sample prepared at 37°C and 48 h had the topmost homogeneity properties.

**Keywords:** Polylactic acid, Hydroxyapatite, Composite; Homogeneity, Bone scaffold.

## 1. INTRODUCTION

Bone loss is one of the major problems that significantly impacts the quality of people life. In the past decades, the tissue engineering approach has been touted as a reliable way to create engineered tissues such as bones. In this approach, scaffolds play an important role [1]. Over the past years, to follow the biomimetic approach and avoid shield stress, many researches have been focused on the fabrication and evaluation of the properties and performance of composite scaffolds in bone tissue engineering [2].

Rapid prototyping (RP) is one of the popular methods in bone scaffold preparation. One of the RP methods is FDM, in which filaments based on thermoplastic polymers are used to prepare three-dimensional scaffolds [3]. These filaments usually consist of ceramic and polymer combinations to improve bone induction and optimize scaffold degradation rate. However, one of the major

mehran.solati@gmail.com

challenges is the preparation of homogeneous and uniform filaments that considerably impact the printing process, the physical properties of the structure obtained, and its function in the body [4-6].

Many parameters such as ceramic concentration, particle size, solution temperature, and stirring time influence particle distribution in the polymer matrix and, later on, filament homogeneity [4].

In this research, first, a new method was defined to analyze particle distribution, then the effect of two parameters, including temperature and stirring time was evaluated. For this purpose, four times and three temperatures including 6, 12, 24, and 48 h and 25, 37, and 45°C were investigated, respectively.

## 2. MATERIALS AND METHODS

HA particles was synthesized by wet precipitation method. To prepare polymer/ceramic composites (4:1), 0.6 g PLA was dissolved completely at 8 ml



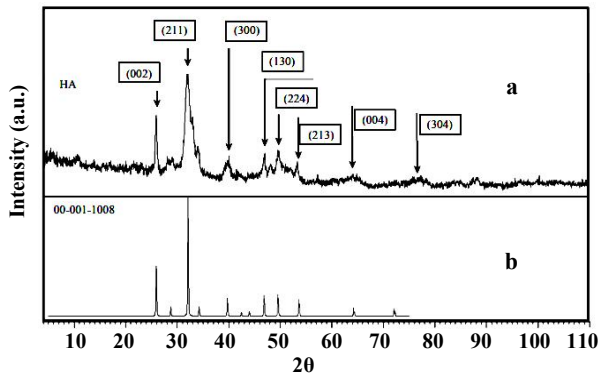


Figure 1. XRD pattern of a) synthesized HA and b) pure HA (JCPDS no.09-0432)

chloroform using a magnetic stirrer. Then 0.2 g HA was added into chloroform (2 ml) separately and placed at ultrasonic bath for 30 minutes. After achieving a uniform suspension, it was poured into PLA solution and placed over the magnetic stirrer. Stirring time and temperature were adjusted according to each sample. After the mixing process, the suspension was poured into a petri dish to lose solvent completely.

In order to evaluate the crystallographic structure of HA, chemical structure of the composites, and HA distribution in the polymer matrix, XRD, FTIR, and SEM analyzes were employed, respectively.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Crystallographic structure

The XRD pattern of HA (Figure 1) had all of the associated peaks compatible with JCPDS reference cards [7]. Scherrer equation was used to calculate the HA crystals size. Results showed that the average size of HA particles was approximately 9 nm.

#### 3.2 Chemical Structure Analysis

The corresponding wavenumbers of characteristic groups of HA and pure PLA were observed at FTIR spectra (Figure 2). FTIR spectra revealed that a new peak was appeared at  $1414\text{ cm}^{-1}$  after adding HA to the PLA. It can be assumed that carboxyl groups ( $-\text{COOH}$ ) of PLA were ionized to form  $-\text{COO}^-$  ions during the formation of the composites.  $\text{COO}^-$  ions would bind with  $\text{CA}^{2+}$  ions of HA, and a new carboxyl-calcium-carboxyl linkage may form that can influence composite mechanical properties [8].

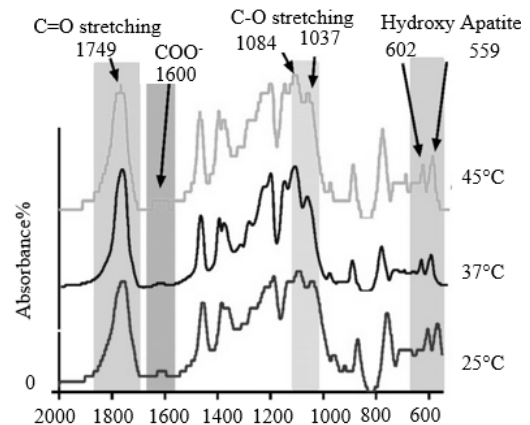


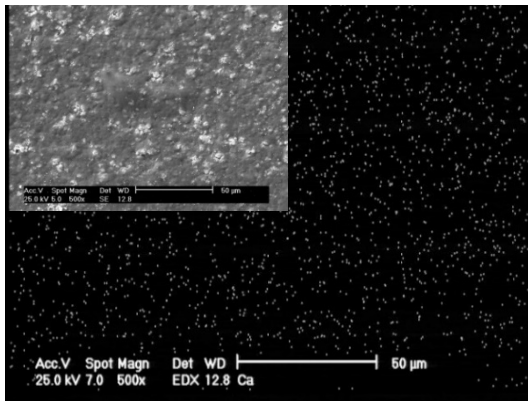
Figure 2. FTIR spectra of PLA/HA composites prepared at 48 h.

Table 1. Samples Standard Deviation and  $\alpha$  Calculation

Sample name	Average number of particles	Standard deviation	$\alpha$
S-6-25	154.33	18.69	0.121
S-6-37	39	5.81	0.148
S-6-45	93.77	14.92	0.159
S-12-25	186.11	19.87	0.106
S-12-37	125.33	16.39	0.130
S-12-45	114.11	14.44	0.126
S-24-25	176	19.47	0.110
S-24-37	232.33	28.71	0.123
S-24-45	567.22	49.03	0.086
S-48-25	105.88	45.07	0.425
S-48-37	212.88	14.37	0.067
S-48-45	178.11	15.78	0.089

#### 3.3 Structural Analysis

Observing SEM image and EDS mapping for the calcium element showed that the stirring time and temperature directly affected HA distribution in the polymer matrix. In order to make the comparison easier, a new analysis method was defined. In this method, first, the EDS map was split into nine equal sections, and the number of spots in each section (which resembling calcium element) was counted. Then, the standard deviation was calculated. In order to diminish the effect of total particles number that influence homogeneity, a new index called dispersion factor " $\alpha$ " was defined, which was obtained by dividing the standard deviation by the total number of particles. The smaller  $\alpha$  means the larger homogeneity. The obtained standard deviation and  $\alpha$  for each sample have been presented in Table 1.



**Figure 3. SEM image and EDS mapping of calcium element in S-37-45 Composite**

Results showed that stirring temperature that influences polymer chain movements and suspension viscosity, affected the polymer ceramic interactions and eventually the particle distribution. However, increasing stirring time brought two results: 1) more interaction between PLA functional groups with HA particles (carboxyl-calcium-carboxyl bond) which made the ceramic suspension more stable and homogenous, and 2) HA particles agglomeration that reduced homogeneity.

Neither increase in temperature nor in time guarantees the uniform distribution of particles. As shown in Table 1, the sample prepared at 37°C and 48 h had better particle distribution compared to other samples. The SEM and EDS mapping of this sample are shown in Figure 3.

#### 4. CONCLUSION

This study investigated the impact of two parameters, including temperature and time, on the HA particle distribution at PLA/HA composites. After defining a new method to compare sample homogeneity, S-48-37 sample was selected as the optimum sample. Preparing samples based on these findings increased the homogeneity of PLA/HA filaments and improved the printing process and bone scaffolds function.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors appreciate ZistNegar Amirkabir Ltd. and Dr. Mitra Asadi for providing essential equipment and supporting this investigation.

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest in this research.

#### REFERENCES

1. Tariverdian, T., Sefat, F., Gelinsky, M., and Mozafari, M., "Scaffold for bone tissue engineering," in *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, Woodhead Publishing, pp. 189-209, 2019.
2. Kim, H. L., Jung, G. Y., Yoon, J. H., Han, J. S., Park, Y. J., Kim, D. G., Zhang, M., and Kim, D. J., "Preparation and Characterization of Nano-Sized Hydroxyapatite/Alginate/Chitosan Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Materials Science and Engineering: c*, Vol. 54, pp. 20-25, 2015.
3. Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J. D., Yoo, J., and Soker, S., "Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds", *Stem Cells Transl Med*, Vol. 1, No. 11, pp. 792-802, 2012.
4. Yakaboylu, G. A., and Sabolsky, E. M., "Determination of a Homogeneity Factor for Composite Materials by a Microstructural Image Analysis Method", *Journal of Microscopy*, Vol. 266, No. 3, pp. 263-272, 2017.
5. Laput, O., Vasenina, I., Salvadori, M. C., Savkin, K., Zuza, D., and Kurzina, I., "Low-Temperature Plasma Treatment of Poly(lactic Acid) and PLA/HA Composite Material", *Journal of Materials Science*, Vol. 54, No. 17, pp. 11726-11738, 2019.
6. Wei, G., and Ma, P. X., "Structure and Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 19, pp. 4749-57, 2004.
7. Nur, A., Jumari, A., Budiman, A. W., Wicaksono, A. H., Nurohmah, A. R., Nazriati, N., and Fajaroh, F., "Synthesis of Nickel - Hydroxyapatite by Electrochemical Method", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 543, p. 012026, 2019.
8. Supova, M., "Problem of Hydroxyapatite Dispersion in Polymer Matrices: A Review", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 6, pp. 1201-1213, 2009.