



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE VIDRIO BIOACTIVO CONTENIENDO PARTÍCULAS MESOPOROSAS, CON CAPACIDAD DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales.

Estudiante: Manuela Matar Prior (Legajo número 10315| DNI 38497799|
manuelamatarprior@gmail.com)

Directores: Prof. Dra. Josefina Ballarre (*jballarre@fi.mdp.edu.ar*) - Prof. Dr. Aldo
R. Boccaccini



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE VIDRIO BIOACTIVO CONTENIENDO PARTÍCULAS MESOPOROSAS, CON CAPACIDAD DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales.

Estudiante: Manuela Matar Prior (Legajo número 10315| DNI 38497799|
manuelamatarprior@gmail.com)

Directores: Prof. Dra. Josefina Ballarre (*jballarre@fi.mdp.edu.ar*) - Prof. Dr. Aldo
R. Boccaccini

Agradecimientos

A mi directora Josefina Ballarre, por la motivación que me transmite con su inteligencia, dedicación y amor. Por su compromiso constante y enseñanza en el proyecto final y último tramo de la carrera.

A mi director Aldo Boccaccini, por permitirme formar parte del Instituto de Biomateriales en la Universidad Friedrich Alexander. Por sus buenos consejos en todo momento y su hospitalidad durante mi estadía en Alemania.

A Silvia Simison, Flavio Soldera y todos los que conforman el proyecto I.DEAR por darme la posibilidad de realizar el intercambio con la Universidad Friedrich Alexander.

A todos los integrantes del laboratorio WW7, por su ayuda y a Qaisar Nawaz, por su explicación en la metodología y por los ensayos antibacteriales.

A mi mamá Dora Prior y a mi papá Daniel Matar, por su paciencia y amor, por ser incondicionales conmigo en momentos buenos y malos.

A mis hermanos, Franco y Enzo, por su compañía y todo lo vivido juntos.

A mi abuela, por acompañarme en todos los momentos de mi vida.

A mis profesores de la universidad, todos dejaron su marca en mí.

A todos mis compañeros de la facultad por hacer más amena la carrera, especialmente a Pancho por todos los trabajos y tiempo compartido.

A Octa, por su amistad y siempre tener palabras precisas. A mis amigas Caro y Abril, por todas las risas, viajes y por su complicidad.

Resumen

En este trabajo se plantea la generación de andamios bioactivos cerámicos generados por el clásico método de réplica desarrollado por primera vez en 2006. Estos andamios son recubiertos con partículas mesoporosas de vidrio de sílice y óxido de calcio, dopadas con un antibiótico tipo (tetraciclina).

Las partículas MBG (por sus siglas en inglés *mesoporous Bioactive Glass*) fueron sintetizadas utilizando un proceso de Stöber modificado. Por otro lado, mediante el método de la réplica, se generaron matrices de vidrio bioactivo 45S5 comercial. Se sinterizaron las piezas de 0.5cm^3 aproximadamente a $1000\text{ }^\circ\text{C}$. Luego las matrices fueron embebidas en una suspensión de etanol conteniendo 200g/L de partículas MBG y se dejaron secar a 60 grados por al menos 12 horas. Para embeber las partículas mesoporosas con la droga modelo (tetraciclina), se utilizó una solución de tetraciclina de concentración 10g/L y las matrices se pusieron en inmersión en una suspensión de etanol conteniendo 200g/L de las partículas MBG previamente cargadas con tetraciclina por 10 segundos.

La caracterización de las matrices con y sin partículas MBG fue realizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*), cálculo de porosidad, difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR). Las muestras fueron analizadas a la compresión con una celda de carga de 1000N y velocidad de travesa constante de 0.5 mm/min. Los ensayos de compresión revelaron cargas de rotura de 0.08 ± 0.02 [MPa] y 0.14 ± 0.05 [MPa] para las matrices sin y con partículas MBG respectivamente. Se analizó la degradación y bioactividad de las matrices y las matrices con MBG mediante inmersión a 7 y 14 días en Solución Fisiológica simulada a través de SEM, DRX y FTIR. Las estructuras resultantes resultaron bioactivas a los 7 días de inmersión en solución fisiológica a 36,5

$\pm 0,5$ °C, mostrando características de formación de depósitos de hidroxiapatita carbonatada en su superficie.

Para analizar el comportamiento liberador de fármacos y antibacterial, las muestras con MBG con tetraciclina se sometieron a ensayos de liberación de drogas *in vitro* mediante espectroscopía UV-vis. Los ensayos antibacteriales se realizaron por el método de halo de inhibición, analizando el efecto de los materiales sintetizados ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Luego de 168 horas, se logró un porcentaje de liberación acumulado de 12% y mediante ensayos de halo de inhibición antibacteriales pudo observarse que dicha liberación actúa inhibiendo la producción de biofilms bacterianos en el área cercana al implante poroso, en las siguientes 24hs luego de estar en contacto con la cepa tanto gram negativa como positiva.

Índice de contenido

Agradecimientos	1
Resumen	2
Índice de contenido	4
1. Introducción	6
1.1 Ingeniería del tejido óseo	7
1.2 Vidrios bioactivos	8
1.2.1 Vidrios bioactivos convencionales	8
1.2.2 Vidrios bioactivos mesoporosos	13
1.3 Síntesis de vidrios bioactivos	17
1.3.1 Vidrios bioactivos derivados de fusión	17
1.3.2 Vidrios bioactivos derivados de proceso sol-gel	17
Método catalizado por base (método de Stöber)	21
1.4 Vidrios bioactivos como portadores de drogas terapéuticas.	22
2. Objetivos	24
2.1. Diseño	24
2.2. Evaluación	24
3. Materiales y métodos	25
3.1 Fabricación de andamios basados en Biovidrio 45S5	25
3.1.1 Materiales	25
3.1.2 Fabricación de andamios	25
3.2 Síntesis de nanopartículas mesoporosas de biovidrio con composición 65% en peso de SiO ₂ y 35% en peso de CaO.	26
3.2.1 Materiales	26
3.2.2 Procedimiento de síntesis	27
3.3 Recubrimiento de andamios de biovidrio con partículas mesoporosas	28

3.4 Recubrimiento de andamios con partículas mesoporosas cargadas con tetraciclina	28
3.4.1 Materiales	28
3.4.2 Procedimiento	29
3.5 Técnicas de caracterización	29
3.5.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM)	29
3.5.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	30
3.5.3 Difracción de rayos X (DRX)	30
3.5.4 Cálculo de porosidad	30
3.6 Evaluación de la bioactividad in vitro en solución fisiológica simulada	31
3.7 Estudios de liberación de la tetraciclina	32
3.7.1 Curva de calibración de tetraciclina	32
3.7.2 Curva acumulada de liberación de tetraciclina	33
3.8 Evaluación de la actividad antibacterial	33
4. Resultados y discusiones	34
4.1 Síntesis de partículas MBG, andamios de 45S5 Bioglass, andamios recubiertos con nanopartículas MBG y sus caracterizaciones.	34
4.2 Estudio de la respuesta in vitro inorgánica de los andamios sin y con recubrimiento de partículas mesoporosas mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF)	41
4.3 Estudio de la liberación de fármaco in vitro de los andamios de vidrio bioactivo con partículas mesoporosas embebidas en tetraciclina.	51
5. Conclusiones	56
6. Trabajo a Futuro	57
7. Referencias	58

1. Introducción

La ingeniería de tejidos (TE, por sus siglas en inglés *Tissue Engineering*) es conocida como una forma prometedora de reparar y regenerar tejidos como la piel y los huesos, que se dañaron o perdieron debido a enfermedades, lesiones traumáticas o envejecimiento [1]. Un material con el cual pueden sintetizarse andamios para regeneración ósea son los vidrios o cerámicos bioactivos. A partir de diferentes investigaciones, se sabe que los vidrios bioactivos (BG, por sus siglas en inglés *Bioactive glass*) son un material de andamio eficiente para la ingeniería de tejido óseo (BTE, por sus siglas en inglés *Bone Tissue Engineering*) debido a sus excelentes propiedades de osteoconductividad, osteoinductividad y regeneración ósea.

El primer vidrio bioactivo fue desarrollado por Larry L. Hench et al. en 1969 con el objetivo de reparar defectos óseos para el ejército de los EE. UU. Este vidrio bioactivo con una composición de (45% en peso de SiO_2 - 24,5% en peso de Na_2O - 24,5% en peso de CaO - 6% en peso de P_2O_5) se denominó 45S5 Bioglass®, que se ha introducido para uso clínico desde 1985 [2]. Después de casi 50 años de investigación, ahora existen varios tipos de vidrios bioactivos, como los vidrios bioactivos de borato y fosfato [3]. Una gran cantidad de investigaciones *in-vivo* e *in-vitro* han demostrado que los vidrios bioactivos tienen biodegradabilidad, osteoconductividad y osteoinductividad.

Existen dos mecanismos para el proceso de regeneración ósea del vidrio bioactivo [4]: el primero es la formación de la capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA, *hydroxycarbonate apatite*) en la superficie del vidrio bioactivo, que es similar al mineral óseo e interactúa con las fibrillas de colágeno para unión con el hueso defectuoso; otro mecanismo es menos claro que la formación de la capa de HCA. Los productos de disolución iónica como la sílice soluble y los iones de calcio pueden estimular a las células osteogénicas para que se adhieran a la capa de HCA, se diferencien y produzcan matriz ósea. A nivel celular, la bioactividad de un vidrio bioactivo depende de la velocidad de disolución iónica y formación de la capa de HCA, que está directamente relacionada con la composición química del vidrio [5].

Un desafío importante en el desarrollo de andamios para BTE es encontrar un equilibrio entre la porosidad del andamio y las propiedades mecánicas adecuadas [6]. Este desafío es problemático en el caso de 45S5 Bioglass® debido a su carácter frágil y su baja resistencia intrínseca a la fractura. Para aumentar las propiedades mecánicas del andamio de vidrios bioactivos se han realizado muchas investigaciones. Una de las formas eficientes es recubrir la superficie del andamio con otros materiales biocompatibles como polímeros biodegradables o nanopartículas, como nanodiamantes, hidroxiapatita, nanopartículas de vidrio bioactivo y nanopartículas de plata [7]. Recubrir el andamio con nanopartículas de vidrio bioactivo puede mejorar sus propiedades mecánicas y comportamiento biológico al mismo tiempo [8].

Los vidrios bioactivos mesoporosos han atraído cada vez más atención en los últimos años para la regeneración del tejido óseo debido a sus excelentes propiedades bioactivas y aplicaciones multifuncionales, como la carga de fármacos, etc. El MBG es más bioactivo en comparación con el vidrio bioactivo no mesoporoso, porque tiene una superficie específica superior. Una de las aplicaciones más importantes de MBG es la carga y liberación de iones funcionales, fármacos o factores de crecimiento con fines terapéuticos.

1.1 Ingeniería del tejido óseo

La teoría de la ingeniería del tejido óseo (BTE) se presentó hace casi 30 años. El objetivo principal es utilizar la teoría de la ingeniería y la biología en conjunto para la reparación de defectos óseos y la regeneración de tejidos. Para ello, se estudian conceptos tales como la estructura ósea, sus propiedades mecánicas y la formación de tejido, y a través de la ayuda de un andamio 3D biocompatible que imita la estructura ósea natural se induce la formación de nuevos tejidos óseos funcionales[9].

La estructura jerárquica del hueso se conforma por una capa externa de hueso cortical (compacto) y hueso trabecular (esponjoso) en el interior [10]. Las propiedades mecánicas de estos dos tipos de huesos se muestran en la Tabla 1. La porosidad del hueso cortical

está en el rango de 5 a 10 % y para el hueso trabecular es de 50 a 90 % [6]. Por lo tanto, se necesita un biomaterial tridimensional poroso con una estructura y propiedades mecánicas adecuadas, como un andamio, para la ingeniería de tejido óseo.

Tabla 1. Resumen de las propiedades mecánicas de los huesos humanos[6]

	Esfuerzo de compresión (MPa)	MOR (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Módulo elástico (GPa)	Tenacidad a la fractura (MPa.m ^{1/2})
Hueso cortical	100-150	135-193	50-151	10-20	2-12
Hueso trabecular	2-12	10-20	1-5	0.1-5	0.1-0.8

Los andamios utilizados en reconstrucción ósea deben fabricarse con materiales biocompatibles (que no liberen tóxicos en su degradación) como vidrios bioactivos, vitrocerámicas y polímeros biodegradables, los cuáles luego se cargan con factores de crecimiento, células, fármacos o en algunos casos proteínas morfogenéticas óseas. En general, las propiedades osteogénicas del andamio dependen principalmente de la composición química y la microestructura del material. Los vidrios bioactivos se han considerado como materiales de andamiaje ideales para la regeneración ósea debido a su excelente propiedad osteogénica dando como resultado una rápida regeneración del hueso. Sin embargo, tienen la desventaja de presentar baja resistencia y fragilidad por lo tanto su uso se ve limitado para la reparación ósea que soporta carga [11].

1.2 Vidrios bioactivos

1.2.1 Vidrios bioactivos convencionales

Los vidrios bioactivos (BG) son un material importante en BTE debido a su excelente osteoconductividad y osteoinductividad. El primer vidrio bioactivo, denominado 45S5

Bioglass® (45% en peso de SiO_2 , 24,5% en peso de Na_2O , 24,5% en peso de CaO y 6% en peso de P_2O_5), es un vidrio bioactivo derivado de fusión desarrollado por el método convencional de fusión a alta temperatura [2].

Las propiedades de BG se atribuyen a la composición química y la estructura atómica. Para los vidrios de silicato, el silicio es el átomo que forma la red de vidrio al formar enlaces Si-O-Si. Otros átomos, como el sodio y el calcio, son modificadores de la red y pueden interrumpir la red al formar enlaces de oxígeno no enlazante (NBO), como los enlaces Si-O-Na [12]. Generalmente el fósforo se aísla de la red de sílice con enlaces P-O-Si no enlazantes, como se muestra en la Figura 1, y elimina los cationes de sodio y calcio de su papel modificador de la red [13]. Esta es la razón por la cual el fosfato se pierde muy rápidamente del vidrio al exponerlo a ambientes acuosos [14]. Sin embargo en otros vidrios con un contenido de más del 50% molar de fosfato, el enlace P-O-Si forma parte de la red [15].

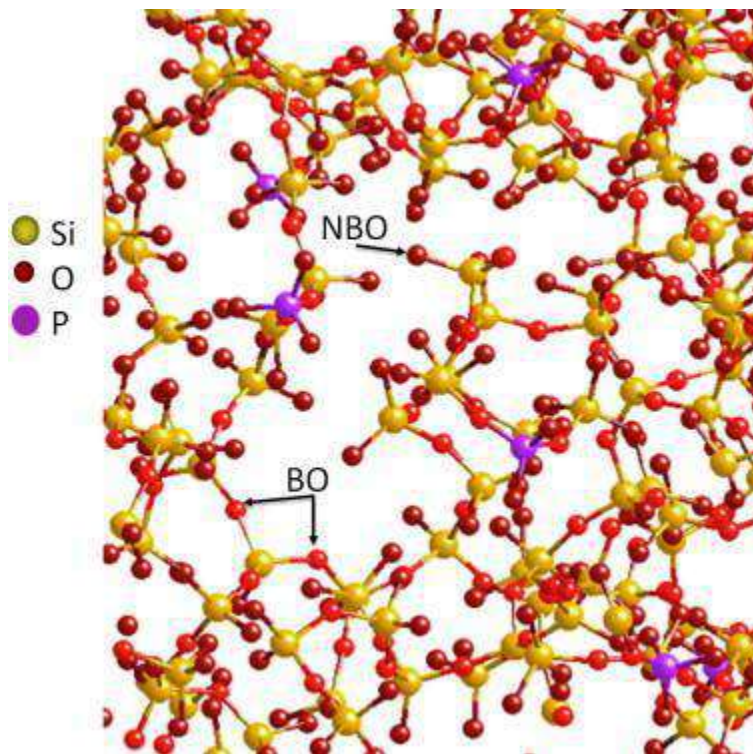


Figura 1. Modelo molecular de 45S5 Bioglass®, con los iones de Na y Ca eliminados para mayor claridad. (BO: oxígeno enlazante, NBO: oxígeno no enlazante.) [12].

Después de analizar las estructuras atómicas de los vidrios bioactivos, es posible comprender sus propiedades. Un mayor contenido de sílice da como resultado una red altamente conectada con una gran proporción de enlaces de oxígenos enlazantes (BO), baja disolución y bajo grado de bioactividad [4]. La bioactividad está directamente relacionada con la disolución de la red de sílice en agua o en solución fisiológica simulada (SBF, por sus siglas en inglés *Simulated Body Fluid*) [16]. La conectividad de la red se puede reducir agregando algunos cationes que modifican la red [17]. La conectividad se puede cuantificar con la Ecuación (1) y también se puede usar para predecir la bioactividad de los vidrios [18, 19]. N_c es el número medio de enlaces de oxígenos enlazantes (BO) por átomo de silicio. Un valor más alto de N_c significa una bioactividad más baja, y su valor no debe ser superior a 2.6 para las aplicaciones biológicas efectivas [20].

$$N_c = \frac{4[\text{SiO}_2] - 2[\text{M}_2\text{O} + \text{M}^{\text{II}}\text{O}] + 6[\text{P}_2\text{O}_5]}{[\text{SiO}_2]} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Para 45S5 Bioglass®, el valor de N_c es 2.12, lo que significa que es bioactivo pero el grado no es demasiado alto. Algunas de las propiedades importantes del 45S5 Bioglass® se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades del 45S5 Bioglass® [4]

Propiedad	Valor
Densidad	2.7 g/cm^3
Conectividad de la red (N_c)	2.12
Temperatura de transición vítrea	538°C
Coefficiente de expansión térmica	$15.1 \times 10^{-6} \text{ C}^{-1}$
Módulo de Young	35 MPa

El requisito principal para que un material pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), similar al mineral óseo, en su superficie después de ser implantado en el cuerpo. El mecanismo de formación de la capa de HCA *in vivo* o en solución fisiológica simulada (SBF) *in vitro* tiene cinco etapas propuestas como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 2

Tabla 3. Etapas de formación de la capa HCA en la interfaz hueso-vidrio [5]

Etapas	Reacciones
1	<p>Intercambio catiónico rápido de Na^+ y/o Ca^{2+} con H^+ o H_3O^+ de la solución, creando enlaces silanol ($Si-OH$) en la superficie del vidrio y aumentos de pH ($pH > 7.4$):</p> $Si-O-Na^+ + H^+ + OH^- \rightarrow Si-OH + Na^+(ac) + OH^-$
2	<p>Un pH local alto conduce a un ataque a la red de sílice por la ruptura de los enlaces OH^- y $Si-O-Si$. La sílice soluble se pierde en la solución en forma de $Si(OH)_4$, lo que deja más grupos silanol en la interfase vidrio-solución: $Si-O-Si + H_2O \rightarrow Si-OH + OH-Si$</p>
3	<p>Condensación y repolimerización de grupos $Si-OH$ en la superficie del vidrio y formación de una capa de SiO_2:</p> $Si-OH + OH-Si \rightarrow Si-O-Si + H_2O$
4	<p>Migración de grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} de la solución a la superficie a través de la capa rica en SiO_2 y formación de una película amorfa rica en $CaO-P_2O_5$ sobre la capa rica en SiO_2</p>
5	<p>Incorporación de OH^- y CO_3^{2-} de la solución y cristalización de la película amorfa de $CaO-P_2O_5$ a la capa de HCA</p>

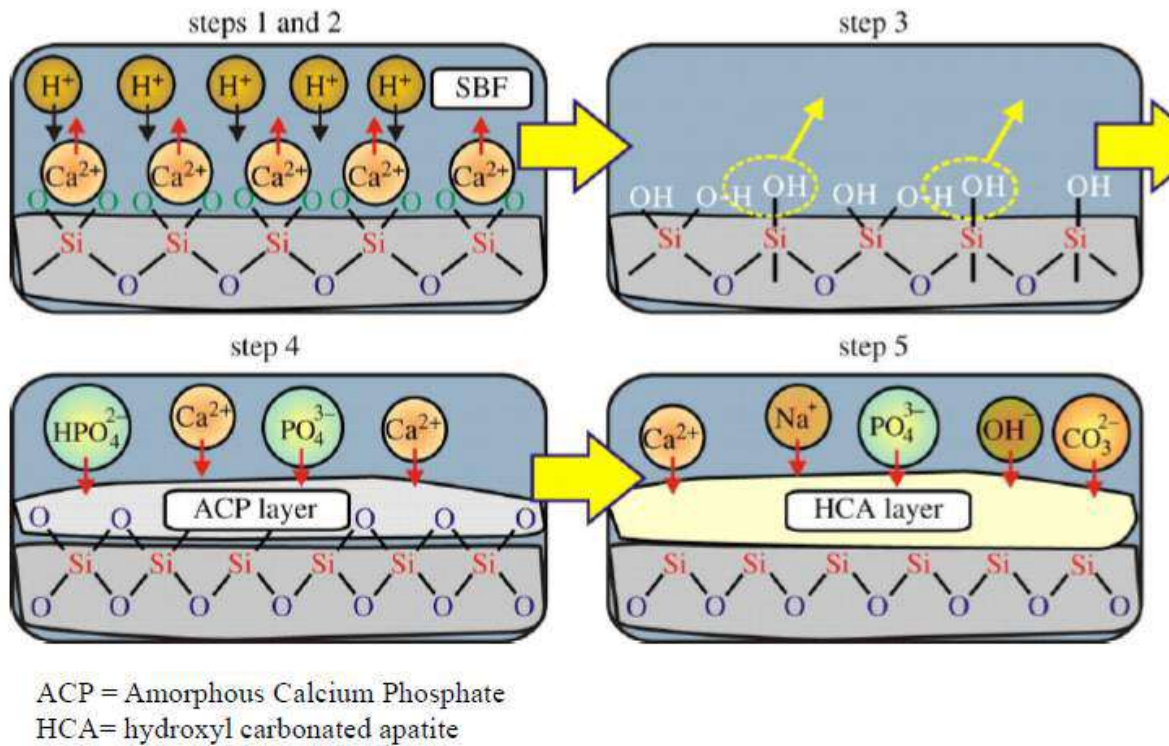


Figura 2. Representación gráfica de las etapas de formación de la capa HCA en la interfaz hueso-vidrio[21]

El 45S5 Bioglass® todavía se considera el estándar de oro para los vidrios bioactivos, aunque tiene muchas desventajas [22]: una de las desventajas es que debe fundirse a una temperatura muy alta ($> 1300^\circ C$), y esta es una ruta de procesamiento de alto costo de energía; la otra es que la partícula es densa y no tiene la estructura mesoporosa como los vidrios derivados de sol-gel, que tienen una nanoporosidad inherente y conducen a un área de superficie específica alta [23]. Y también tiene mayor conectividad de red que los vidrios sol-gel de la misma composición debido a que en los vidrios sol-gel, H^+ actúa como modificador de red y reduce la conectividad de la red [24]. Por lo tanto, la bioactividad de los vidrios bioactivos derivados de la fusión dependerá principalmente de la conectividad de la red (el contenido de SiO_2), y no puede superar los 60 % mol, mientras que en los vidrios sol-gel el contenido de Si puede ser superior a 90 % mol [25].

1.2.2 Vidrios bioactivos mesoporosos

Los vidrios bioactivos mesoporosos (MBG) han atraído cada vez más la atención en los últimos años para la regeneración del tejido óseo debido a sus excelentes propiedades bioactivas y aplicaciones multifuncionales, como la carga de fármacos, etc. La definición de mesoporoso se muestra en la Figura 3.

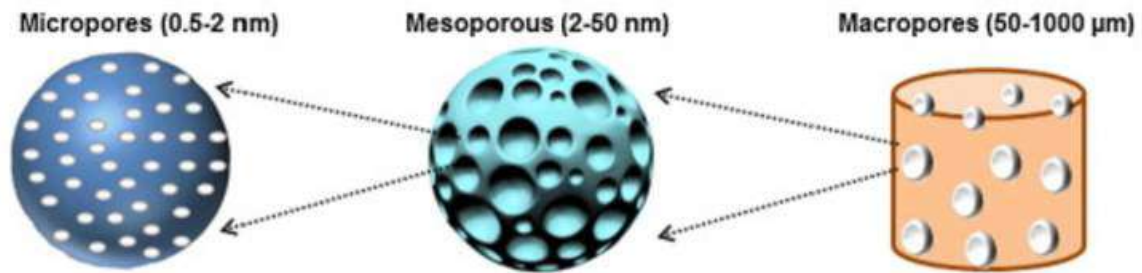


Figura 3. Diferentes tamaños de poros en partículas de vidrio bioactivo [26].

En comparación con el vidrio bioactivo no mesoporoso, el MBG es más bioactivo porque tiene mayor área superficial específica. Una de las aplicaciones más importantes de MBG es la carga y liberación de iones funcionales, fármacos o factores de crecimiento con fines terapéuticos, como puede apreciarse en la Figura 4.

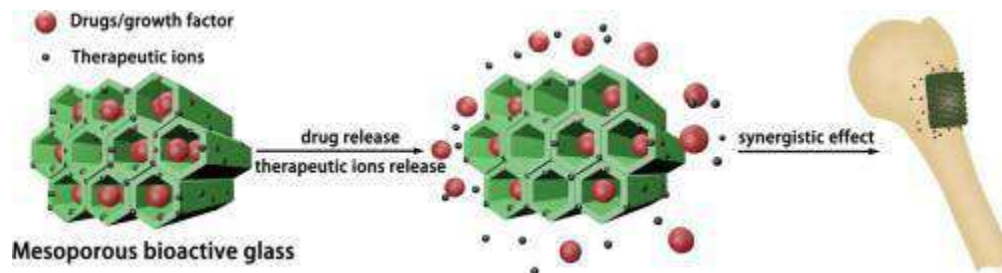


Figura 4. Efecto sinérgico de iones terapéuticos, fármacos y factores de crecimiento liberados de MBG para la reparación ósea [27].

Es posible sintetizar MBG por el método sol-gel o el método de Stöber modificado (los detalles del procesamiento se discutirán en la siguiente sección). Para obtener la estructura mesoporosa se requiere una plantilla (como el bromuro de cetiltrimetilamonio

(CTAB), F127 y P123), y según la técnica de preparación, se pueden producir diferentes formas de MBG [28].

La eficacia de la administración de fármacos de MBG depende principalmente de la microestructura y la composición de los materiales. Se encontró que las plantillas(template) o agentes surfactantes pueden determinar la estructura y el tamaño de los mesoporos, el área superficial y el volumen de poros de MBG. En general, el MBG inducido por CTAB tiene un tamaño de mesoporo más pequeño (2-3 nm) y un volumen de poro más alto que el MBG derivado de P123 o F127 (4-10 nm) [29]. Y como se muestra en las siguientes imágenes de microscopía electrónica de transmisión (Figura 5), el ordenamiento de los mesoporos en los materiales MBG inducidos por CTAB es más bajo que el de los materiales MBG inducidos por P123 [28]. También se encontró que el MBG derivado de CTAB tiene una carga de fármaco más eficiente (10,7 %) que los otros dos MBG (9,7 % para P123 y 9,1 % para F127) [30]. Por lo tanto, CTAB se puede utilizar como plantilla para mejorar la administración eficaz de fármacos de MBG.

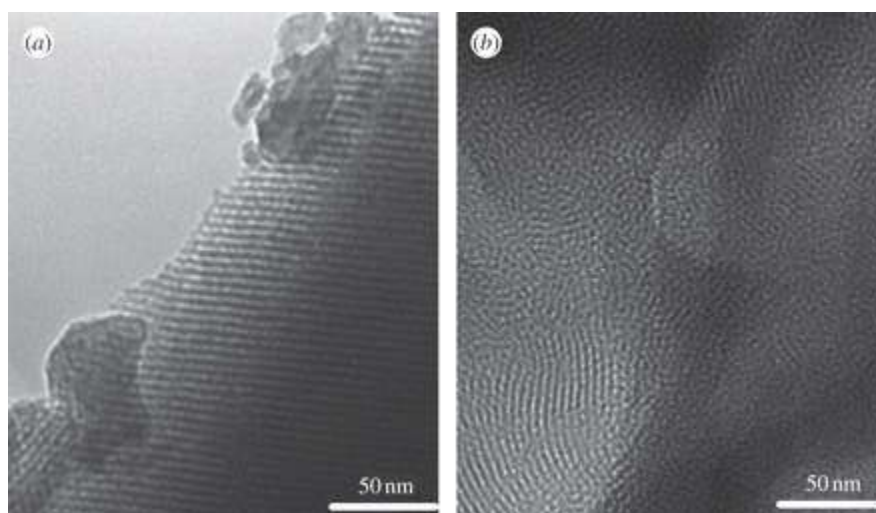


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de (a) MBG inducida por P123 y (b) MBG inducida por CTAB [28].

Por estas razones, en este proyecto se seleccionó CTAB como plantilla para la síntesis de nanopartículas de MBG. Es un surfactante de amonio cuaternario y puede formar micelas

CTA⁺ en soluciones acuosas. La estructura molecular de CTAB y el procedimiento de formación de micelas se muestra en las siguientes imágenes (Figuras 6 y 7).

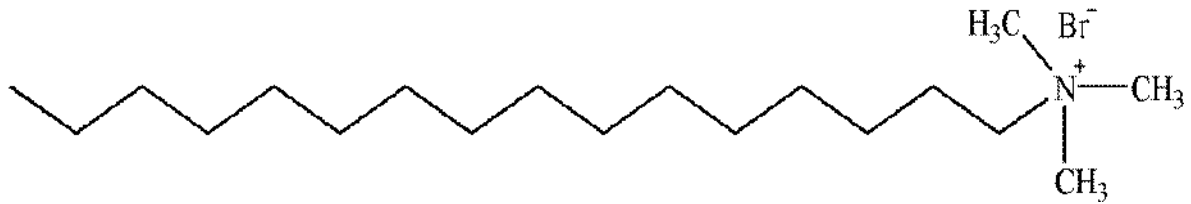


Figura 6. Estructura molecular de CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$).

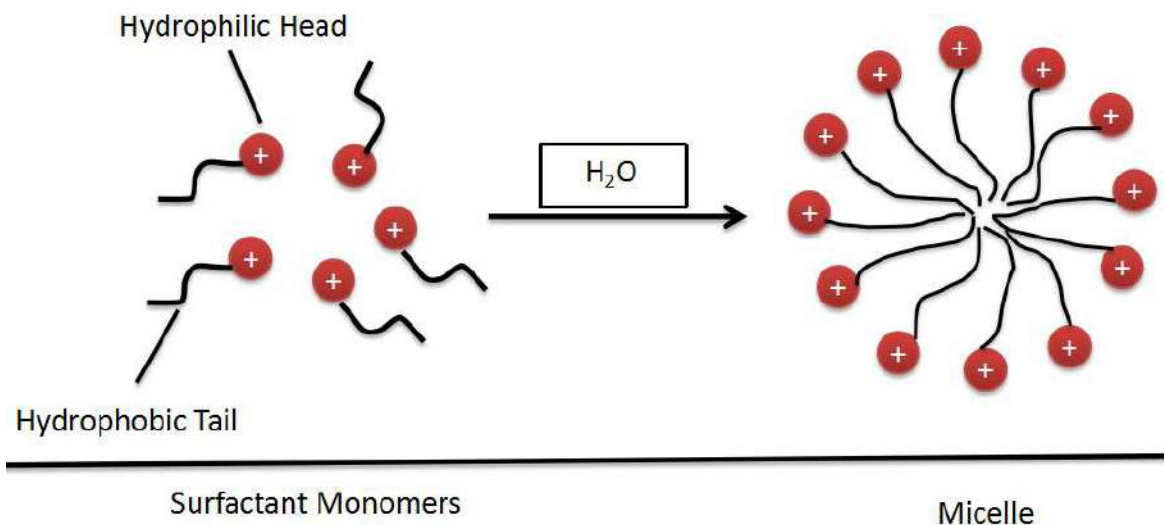


Figura 7. Estructura de los monómeros CTA⁺ y formación de micelas.

Además de por el efecto de las plantillas, la composición de la MBG también puede influir en las microestructuras. El MBG con un contenido más alto de SiO_2 tiene una estructura mesoporosa más ordenada, un área de superficie específica y un volumen de poros más altos que los que tienen un contenido más bajo de SiO_2 [28]. La incorporación de otros iones como Ca o P en MBG disminuirá el área de superficie específica y el volumen de poros. La razón de esto es que los iones adicionales pueden alterar la orientación ordenada de los tetraedros de Sílice SiO_4^{4-} durante la reacción de

autoensamblaje, alterar la estructura potencial en la matriz atómica y cambiar aún más las microestructuras [31]. Y también se encontró que el contenido creciente de Ca en el MBG puede aumentar la eficiencia de carga y luego disminuir la tasa de liberación del fármaco [32].

El MBG tiene muchas ventajas en diferentes aplicaciones. Las principales ventajas y limitaciones del Biovidrio según su tamaño de poros pueden verse en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales ventajas y limitaciones de MBG en comparación con BG microporoso y BG nanoporoso. [28]

Aplicaciones		Biovidrio mesoporoso	Biovidrio microporoso	Biovidrio nanoporoso
Microestructura	Ventajas	Canales mesoporosos, alta área superficial y volumen de poros	Ninguna	Partículas de tamaño nanométrico, área de superficie alta
	Limitaciones	Tamaño de poro limitado (<20 nm)	Baja área de superficie y volumen de poros	Bajo tamaño de poros
Liberación de fármacos	Ventajas	Alta eficiencia de carga, liberación sostenida	Ninguna	Cierta eficiencia de carga
	Limitaciones	Ninguna	Baja eficiencia de carga, liberación inicial rápida tipo "ráfaga"	Liberación incontrolable
Ingeniería de tejido óseo	Ventajas	Bioactividad superior	Buena bioactividad	Excelente bioactividad
	Limitaciones	Esfuerzo mecánico	Esfuerzo mecánico	Difícil formar andamios

1.3 Síntesis de vidrios bioactivos

1.3.1 Vidrios bioactivos derivados de fusión

En este método de procesamiento, todos los componentes de vidrio en forma de óxidos o carbonatos se mezclan, se funden a una temperatura superior a 1300°C y luego se vierten en un molde [33].

Para llevar a cabo la síntesis del 45S5 Bioglass®, se mezclan polvos de SiO_2 , Na_2CO_3 , $CaCO_3$ y P_2O_5 en concentraciones molares adecuadas (45 SiO_2 , 24.5 CaO, 24.5 Na_2O , 6 P_2O_5 en % en peso). Luego, se funden a una temperatura alrededor de los 1300°C seguido de un enfriamiento rápido en agua, obteniéndose un sólido con la estructura amorfa del fundido. Posteriormente, se separa mecánicamente para obtener un polvo. [34]

1.3.2 Vidrios bioactivos derivados de proceso sol-gel

El proceso sol-gel es un método de producción de materiales sólidos a través de la gelificación de soluciones. Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas, mientras que un gel es una red integrada de partículas en una fase secundaria (generalmente líquida). [35] Este proceso implica principalmente hidrólisis y condensación de precursores, secado y estabilización. Al controlar los parámetros de procesamiento, se pueden controlar las propiedades de los materiales, como la morfología y la composición [36]. El método sol-gel no es solo para la síntesis de partículas, también se puede utilizar en la producción de recubrimientos, fibras y material a granel simplemente cambiando la ruta de procesamiento, como muestra la Figura 8.

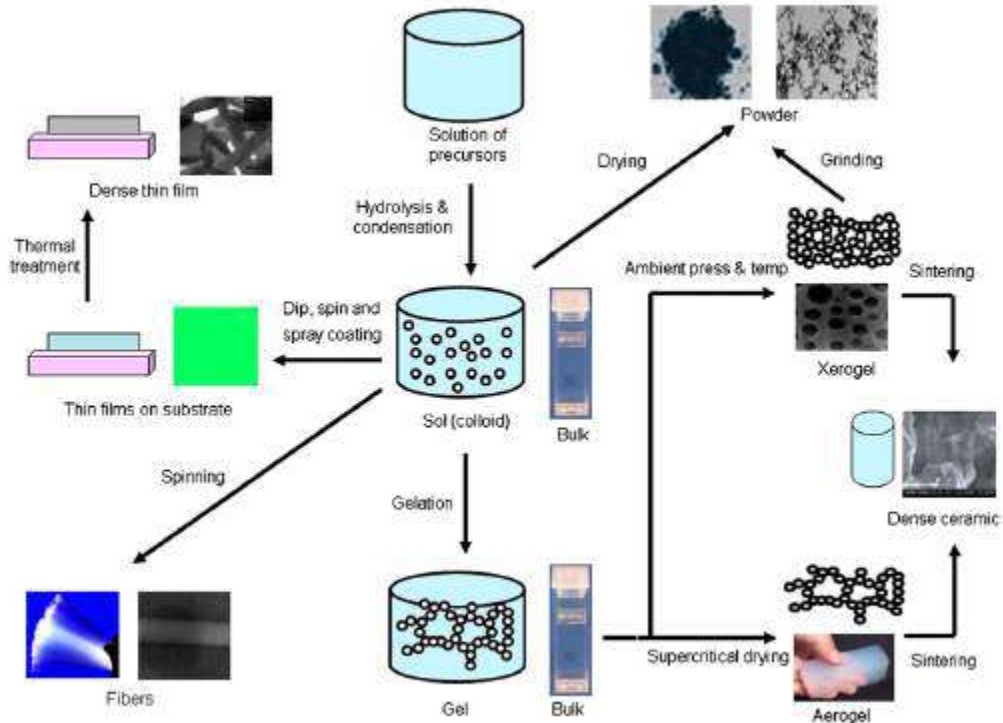


Figura 8. Diagrama esquemático del proceso sol-gel y sus diversos productos. [37]

Para la síntesis sol-gel de partículas de vidrio bioactivo (BG), el ortosilicato de tetraetilo (TEOS) es el precursor de silicato más utilizado, mientras que el agua y/o el etanol se utilizan como disolventes [38,36]. En un protocolo típico de procesamiento sol-gel para nBG, TEOS se somete primero a hidrólisis y condensación en presencia de catalizadores para formar nanopartículas de SiO_2 [36]. En la Figura 9 se puede observar las reacciones que tienen lugar en el proceso sol-gel.

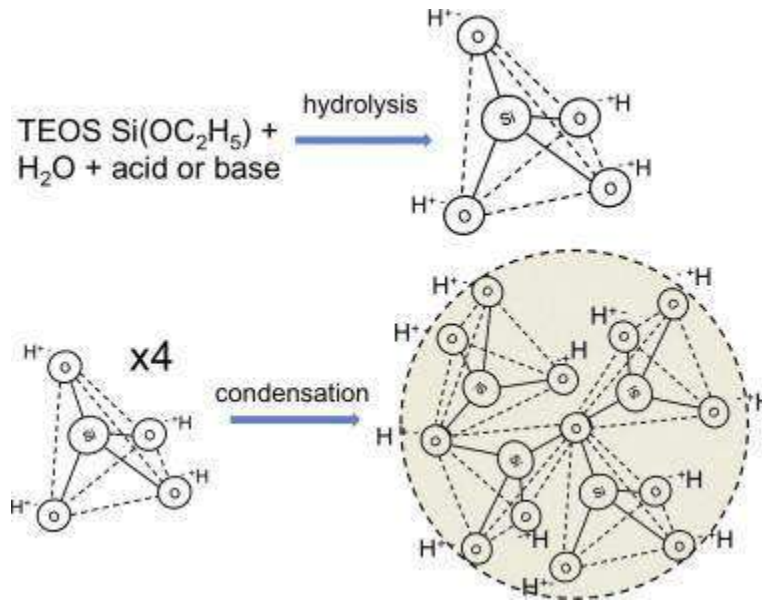


Figura 9. Esquema de reacciones en el proceso sol-gel: formación de sílice tetraédrica y nanopartícula a temperatura ambiente. [4]

Los precursores de iones metálicos se pueden agregar durante la hidrólisis y condensación de TEOS o después de la formación de partículas de SiO_2 [38]. Las nanopartículas resultantes luego se secan y calcinan para formar BG. Los pasos de la síntesis de un vidrio bioactivo $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ por el proceso sol-gel se muestran en la Figura 10.

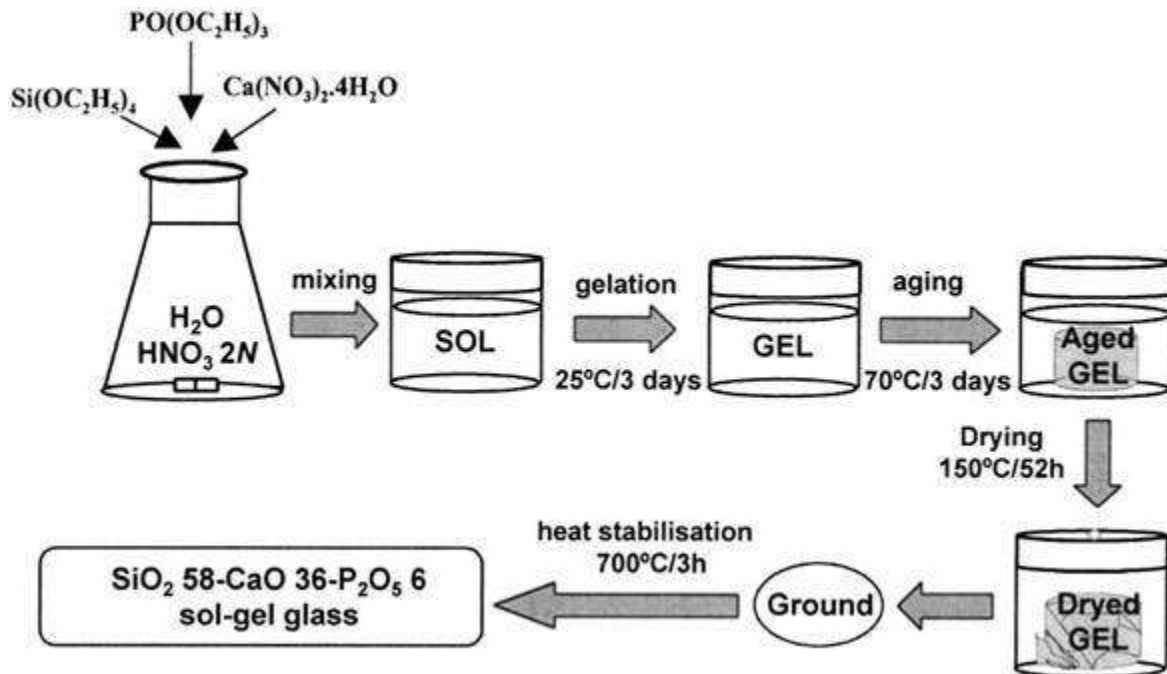


Figura 10. Esquema del proceso sol-gel utilizado para la obtención del vidrio bioactivo [39].

El proceso sol-gel puede tener lugar en condiciones ácidas o básicas, y tales condiciones afectan las propiedades de los materiales resultantes. Cambiando el pH del solvente, por ejemplo, se pueden lograr BG con diferentes morfologías [40].

Las tasas de hidrólisis y condensación están influenciadas por el valor del pH debido al cambio de densidad de carga. La relación entre la tasa de condensación, la densidad de carga y el valor de pH se muestran en la Figura 11. La tasa de condensación más baja se encuentra en el punto isoeléctrico de la sílice (IEP=2) porque no hay Si-O⁻. Esta es también la razón por la cual MBG se sintetiza principalmente bajo el valor de pH más alto respectivamente. Cuanto mayor sea el valor de pH, más rápida será la condensación de la sílice y las interacciones electrostáticas más fuertes entre la sílice y los tensioactivos catiónicos, lo que puede inducir el ensamblaje simultáneo más rápido de los núcleos de sílice-tensioactivo [41].

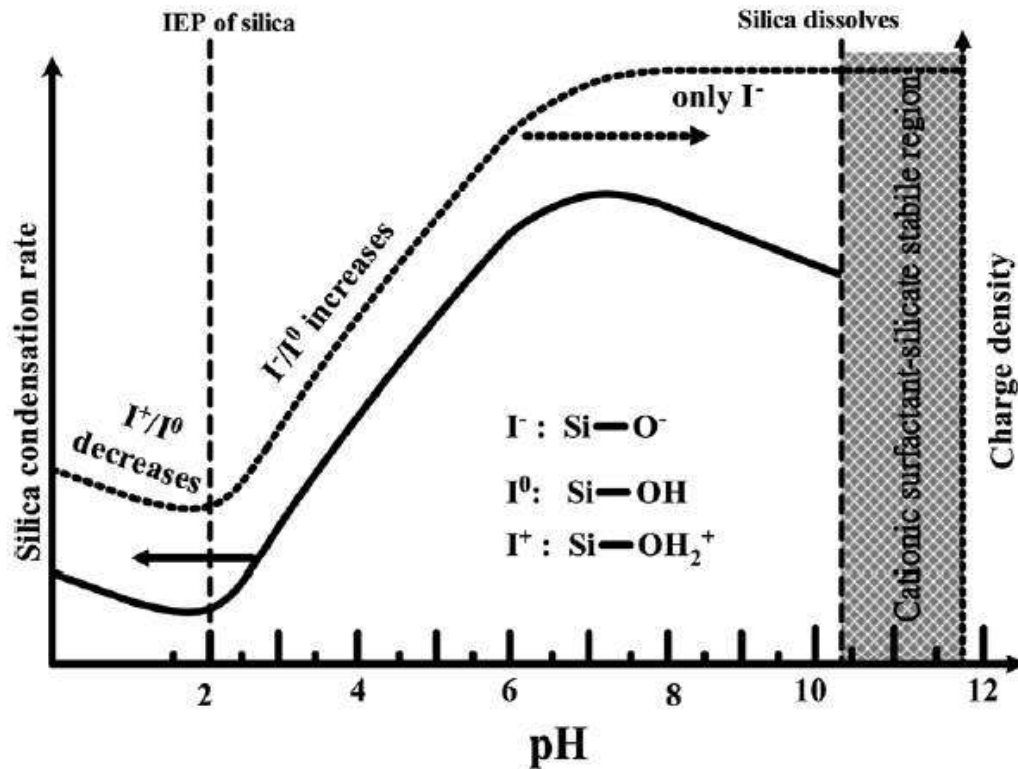


Figura 11. Efectos del valor de pH sobre la tasa de condensación de sílice, las propiedades de carga y la densidad de carga en la superficie de las especies de sílice [42].

Método catalizado por base (método de Stöber)

Este tipo de método de síntesis fue descubierto por primera vez por Stöber et al. en 1968. Se obtuvieron partículas esféricas de sílice en tamaño micro por hidrólisis de silicatos de alquilo y posterior condensación de ácido silícico en solución alcohólica, en la que se utilizó amoníaco como catalizador morfológico [43]. Después de eso, el método Stöber ha sido ampliamente investigado. Puede modificarse para sintetizar MBG en condiciones básicas agregando el tensioactivo o la plantilla como CTAB, P123 [44]. El fundamento químico de la misma es similar al proceso sol-gel. El procedimiento básico de síntesis se muestra a continuación (Figura 12). Como se discutió anteriormente, la microestructura

de la MBG está influenciada por el valor de pH, el tipo de plantilla, la composición química, etc.

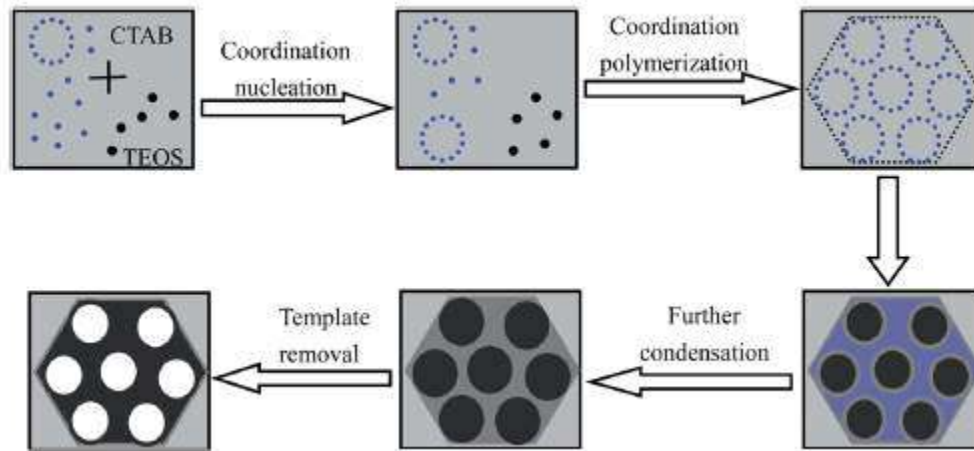


Figura 12. Ruta esquemática para la síntesis de MBG utilizando TEOS como precursor y CTAB como plantilla [45].

1.4 Vidrios bioactivos como portadores de drogas terapéuticas.

Las nanopartículas de vidrio bioactivo pueden ser utilizadas como vehículos para la encapsulación, administración y liberación controlada de moléculas bioactivas y fármacos terapéuticos.

Los vidrios bioactivos cargados con fármacos terapéuticos o moléculas bioactivas combinan las excelentes propiedades de estos tipos de vidrios para la regeneración ósea con el efecto terapéutico específico del fármaco cargado o molécula bioactiva.

El procedimiento de carga de fármaco se puede realizar de diferentes maneras. La incorporación se puede producir durante la fabricación de los vidrios bioactivos. Sin embargo, el proceso tradicional de fusión del vidrio no califica debido a las altas temperaturas involucradas. Por el contrario, la tecnología sol gel realizada a temperatura ambiente permite la introducción de proteínas, fármacos u otras moléculas bioactivas en el vidrio. Otro enfoque consiste en sumergir muestras de vidrio bioactivo (p. ej., MBG) en una solución de la molécula de carga deseada, que puede quedar atrapada dentro de los poros con o sin enlace químico [46]

En las cirugías de reconstrucción ósea, la osteomielitis por infección bacteriana es la principal complicación. Los tratamientos convencionales incluyen la administración de antibióticos sistémicos, el desbridamiento quirúrgico, el drenaje de heridas y la extracción de implantes. En estos casos se presenta la desventaja de que los pacientes sufrirían por cirugías adicionales. Un nuevo método para resolver este problema es introducir un sistema local de liberación de fármacos en el lugar del implante [29].

Si bien la administración local de antibióticos es muy interesante y es un método eficiente para reducir la cantidad de antibióticos necesarios después de la cirugía, la cinética de liberación del fármaco debe controlarse cuidadosamente para lograr efectividad sin producir toxicidad por una administración excesiva. [47]

En este trabajo se ha estudiado el potencial de los MBG como sistema de liberación controlada de tetraciclina. La tetraciclina (TCN) es un conocido antibiótico de amplio espectro cuya estructura química se muestra en la Figura 13

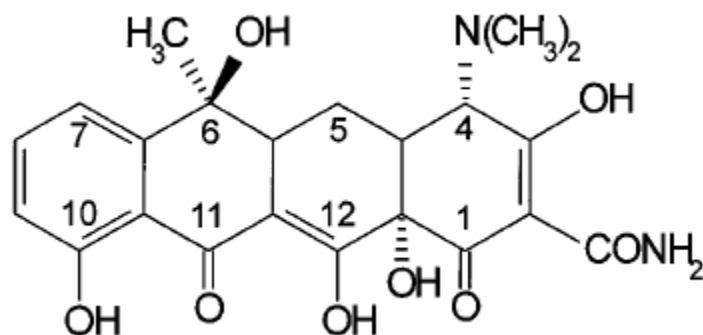


Figura 13. Estructura química de tetraciclina[48].

2. Objetivos

El siguiente trabajo tiene como objetivo general diseñar, optimizar y probar un sistema de andamios de vidrio bioactivo comercial (45S5 Bioglass), recubierto con partículas mesoporosas dopadas con un antibiótico modelo, con fines de regeneración en defectos óseos y capacidad de prevenir infecciones asociadas.

El proyecto se divide en dos grandes objetivos específicos: diseñar primero, y evaluar después.

2.1. Diseño

- Definir los parámetros morfológicos, químicos y físicos para generar andamios a partir de partículas de vidrio 45S5. Generarlos
- Estudiar la síntesis, optimizar parámetros y generar partículas mesoporosas de vidrio base sílice. Generarlas.
- Elegir un modelo de fármaco capaz de ser liberado por las partículas mesoporosas, definir método y dosificación de droga.

2.2. Evaluación

- Caracterizar la integridad, morfología y estructura de los andamios sin y con partículas mesoporosas, y sin y con el agregado de tetraciclina.
- Estudiar la porosidad real de los andamios, con y sin las partículas mesoporosas.
- Caracterizar las propiedades mecánicas macroscópicas de los andamios generados.
- Estudiar la respuesta *in vitro* inorgánica de los recubrimientos mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF), por técnicas ópticas, de microscopía electrónica, espectroscópicas y de difracción.
- Estudiar la liberación de fármaco *in vitro* de los andamios de vidrio bioactivo con partículas mesoporosas embebidas en tetraciclina.
- Evaluar la performance antibacteriana de los andamios logrados.

3. Materiales y métodos

3.1 Fabricación de andamios basados en Biovidrio 45S5

3.1.1 Materiales

Se utilizó Polvo de 45S5 Bioglass® para la fabricación de andamios de la compañía Schott Vitryxx® cuyo tamaño de partícula fue de alrededor de 4 µm, espuma de poliuretano (PU) como plantilla de sacrificio para el método de replicación (densidad= 45 poros por pulgada (ppi) y espesor=12 mm) y PVA (Mw=30000 g/mol)

3.1.2 Fabricación de andamios

Los andamios basados en 45S5 Bioglass® se fabricaron con el método de replicación de espuma, que se describe detalladamente por Q. Z. et al. [49]. Generalmente, el método incluye tres partes: preparación de la suspensión, fabricación del cuerpo verde y sinterización.

En este trabajo se preparó la suspensión de BG de la siguiente manera: se disolvieron 0,06g de aglutinante de PVA en 10 ml de agua destilada a 80 °C. Después de una hora de agitación magnética, se añadieron 10 g de polvo de Bioglass® a la solución de PVA-agua seguido de 1 hora de agitación.

Para fabricar el cuerpo en verde, las espumas de PU con el tamaño deseado se sumergieron en la suspensión preparada. Luego de un minuto, las espumas se retiraron de la suspensión y se escurrió el excedente. Después de una hora de secado a 60 °C, las espumas se sumergieron de nuevo en la suspensión para un segundo recubrimiento. Luego, las espumas se secaron por una hora a 60°C en estufa, seguido de un tercer recubrimiento. Finalmente, las espumas de PU recubiertas se secaron a 60 °C en los desecadores durante 12 h.

Luego, los cuerpos verdes fueron sinterizados en un horno para obtener los andamios utilizando el tratamiento térmico descrito en la Figura 14. La tasa de calentamiento fue de

120 °C/h, y la tasa de enfriamiento fue de 300 °C/h. Las espumas de PU se quemaron durante 1 h a 400 ° C, y luego se aumentó la temperatura hasta 1000°C, dónde se mantuvo por una hora de modo de sinterizar y densificar los andamios finales de Bioglass®.

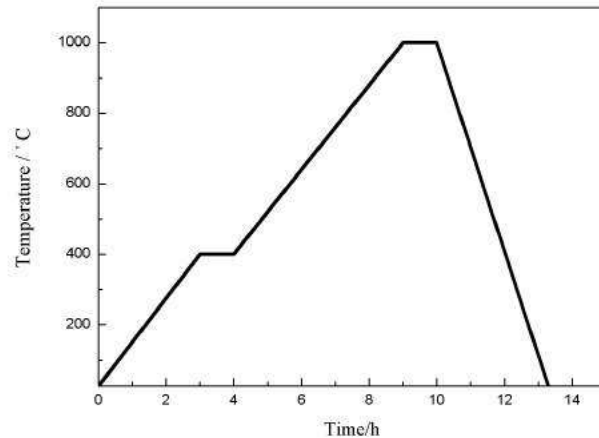


Figura 14. Tratamiento térmico diseñado para quemar espuma de PU y sinterizar el cuerpo verde en la fabricación de un andamio basado en 45S5 Bioglass® [49].

3.2 Síntesis de nanopartículas mesoporosas de biovidrio con composición 65% en peso de SiO₂ y 35% en peso de CaO.

3.2.1 Materiales

Se utilizó TEOS (líquido) de la compañía Merck Schuchardt OHG como precursor de silicatos, hidróxido de amonio líquido al 28% de VWR Chemicals Belgium como catalizador, CTAB y Acetato de etilo líquido de la compañía Merck KGaA como plantillas(template) o agentes surfactantes, agua destilada y nitrato de calcio de la compañía VWR Chemicals Belgium como precursor de calcio.

3.2.2 Procedimiento de síntesis

Se añadieron 26 ml de agua y 0,56 g de CTAB en frascos de precipitado de 250 ml a 37 °C. Se colocó un agitador en el interior y se revolvió durante 15 minutos. Luego de esperar hasta que la solución se aclare, se agregaron 8 ml de acetato de etilo y se apagó la temperatura del agitador magnético para mantenerlo a temperatura ambiente. Se mezcló durante 30 minutos.

Por otro lado, se preparó una segunda solución de hidróxido de amonio al 28% de pureza. Para ello se añadieron 0,7 g de amonio en agua destilada. El volumen total de agua e hidróxido de amonio debe ser de 11,2 ml, para ello inicialmente se colocaron 10 ml de agua destilada en una pipeta y con una pipeta de 1ml se pesaron los 0.7g de hidróxido de amonio en una campana de gases y luego se completó con agua destilada hasta 11.2ml.

Se añadió la segunda solución a la primera y se revolvió durante 15 minutos. Luego se añadieron 3 ml de TEOS y se agitó durante 30 minutos. Se agregaron 1,8 g de nitrato de calcio y se dejó en el agitador magnético por 2 horas.

Transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifugó a 7830 rpm (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Alemania) durante 10 minutos para separar las partículas de los solventes originales. Se desechó el sobrenadante, y se completó con agua para lavar las partículas. Este procedimiento se repitió 3 veces: 2 veces con agua y 1 con etanol al 99.5%.

Las partículas se secaron en la estufa a 60 °C durante 12 horas. Finalmente, las partículas se sometieron a un proceso mecánico para mejorar su separación evitando aglomerados y sinterizaron a una temperatura de 700 °C (velocidad de calentamiento de 2 °C/min) durante 5 horas. La Figura 15. resume el procedimiento de síntesis.

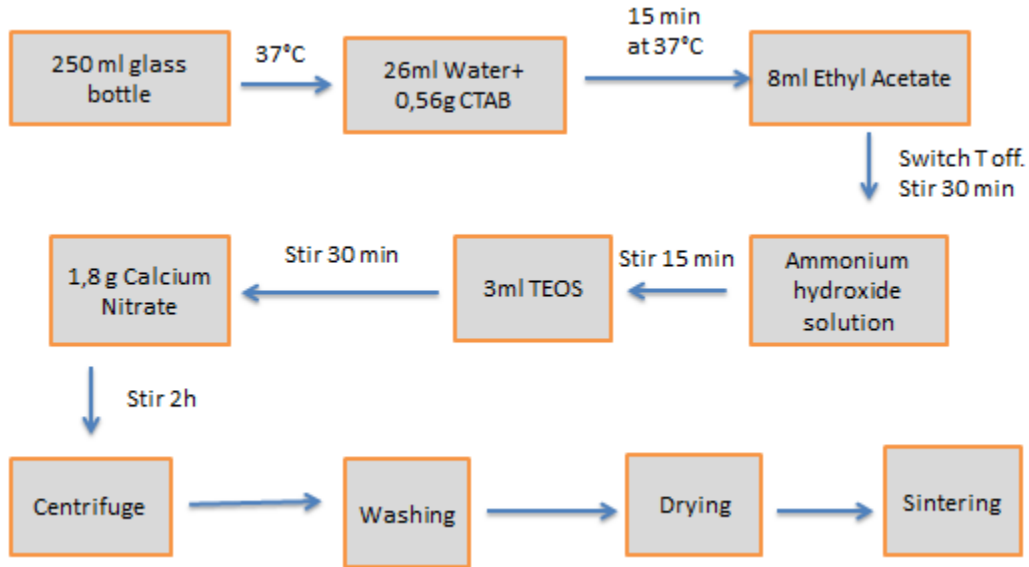


Figura 15. Procedimiento de síntesis de nanopartículas mesoporosas de vidrio bioactivo

3.3 Recubrimiento de andamios de biovidrio con partículas mesoporosas

Los andamios basados en 45S5 Bioglass® se recubrieron con nanopartículas MBG utilizando una técnica de inmersión en suspensión. Se agregaron 3 g de nanopartículas de MBG en 15 ml de etanol (99 %) y se agitaron en el mezclador magnético durante una hora. Luego, el andamio basado en Bioglass® producido con el método de réplica de espuma anterior se sumergió en la suspensión durante 10 segundos. La suspensión extra en los poros del andamio se eliminó inmediatamente soplando con aire comprimido. Luego los andamios revestidos se secaron a 60 °C en las secadoras por al menos 12 h.

3.4 Recubrimiento de andamios con partículas mesoporosas cargadas con tetraciclina[50]

3.4.1 Materiales

Se utilizó Tetraciclina clorhidrato sólido de la compañía AppliChem.

3.4.2 Procedimiento

Para preparar la solución de tetraciclina, se disolvieron 1000 mg de tetraciclina (TCN) en 100 ml de agua destilada bajo agitación. Se obtuvo una solución de concentración 10mg/ml.

Para dopar o cargar las partículas MBG, por cada 1000 mg de MBG, se usaron 50 ml de solución de TCN. Se colocaron varios vasos de precipitado bajo agitación constante al mismo tiempo, para evitar que las partículas se aglomeren. Se agitó por al menos 24 hs a temperatura ambiente.

Luego, se centrifugaron las soluciones resultantes a 4800 RPM por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. Y se colocaron en una caja de Petri en estufa de secado a 60°C por al menos 12 horas.

Para recubrir los andamios de 45S5 Bioglass®, se utilizó la técnica de inmersión en solución. Se colocaron 3g de partículas mesoporosas en 15 ml de etanol, se agitó por 1 hora, después se sumergieron los scaffolds por 10 s, se retiró el excedente en el grifo de aire comprimido y se secaron a 60° C en estufa por 12 horas.

3.5 Técnicas de caracterización

3.5.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para determinar la morfología superficial y la microestructura de los andamios y las partículas de MBG preparadas, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (FESEM, LEO 435VP, Carl Zeiss™ AG) a una energía de 5 kV. Para la preparación de las muestras SEM de andamios, los andamios se fijaron en los porta-muestras limpios utilizando pintura plateada conductora (Silver DAG Plano GmbH). Luego se recubrieron con oro mediante un dispositivo de pulverización (Q150T S) para evitar el efecto de carga.

3.5.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (espectrómetro Nicolet 6700 FTIR, Thermo Scientific™, EE. UU.) se realizó en modo de transmisión que va desde 4000 a 400 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . El número de escaneos fue 40. Para la preparación de las muestras, se molieron los andamios en polvos finos y luego se analizó una pequeña cantidad mediante FTIR.

3.5.3 Difracción de rayos X (DRX)

Se realizó un análisis DRX utilizando un difractómetro de rayos X (D8 Advance, Bruker™) en el rango de 10° a 60° con un tamaño de paso de 0,015° y un tiempo de permanencia de 1° por minuto. Se utilizó radiación Cu K α . Las muestras se prepararon moliendo los andamios en polvos y luego fueron dispersaron en una oblea de silicio de fondo bajo (Bruker AXS).

3.5.4 Cálculo de porosidad

La porosidad de tres andamios de 45S5 Bioglass® y tres andamios de 45S5 Bioglass® con partículas mesoporosas fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$P\% = \left(1 - \frac{\rho_{\text{espuma}}}{\rho_{\text{sólido}}}\right) \times 100$$

dónde $\rho_{\text{espuma}} = \frac{m_{\text{andamio}}}{v_{\text{andamio}}}$ y $\rho_{\text{sólido}} = 2.7 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ es la densidad teórica del 45S5 Bioglass® [51].

3.5.5 Ensayos de compresión

Se realizaron ensayos mecánicos de compresión (Instron EMIC 23-50) en diez andamios

de de 45S5 Bioglass® y diez andamios de 45S5 Bioglass® con partículas mesoporosas a una velocidad de travesa constante de 0.5 mm/min. Se utilizó una celda de carga de 1000 N.

3.6 Evaluación de la bioactividad *in vitro* en solución fisiológica simulada

Se preparó la solución fisiológica simulada (SBF) de acuerdo con el procedimiento estándar propuesto por Kokubo et al [52]. La solución fue preparada a $36,5 \pm 0,5$ °C en agua destilada. El orden de adición y la cantidad de cada tipo de reactivo se muestran en la Tabla 5. Después de agregar 39 ml de HCl en el paso 6, el pH de la solución debe ser inferior a 2. Los reactivos de los pasos 9 y 10 deben agregarse de modo tal de garantizar que el pH de la solución final se mantenga en el rango de 7,42 a 7,45.

Tabla 5. Orden de adición y cantidad de cada tipo de reactivo para la preparación de 1L y 2L de SBF.

Orden	Reactivo	Pureza	Cantidad para 1 L de SBF	Cantidad para 2 L de SBF
1	$NaCl$	99.0	8.0756 g	16.152 g
2	$NaHCO_3$	100.0	0.3532 g	0.7064 g
3	KCl	99.5	0.2250 g	0.4500 g
4	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	99.0	0.2310 g	0.4620 g
5	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	100.5	0.3033 g	0.6066 g
6	HCl	1 mol/L	39 ml	78 ml
7	$CaCl_2 \cdot H_2O$	101.0	0.3638 g	0.7276 g
8	Na_2SO_4	99.6	0.0716 g	0.1432 g
9	<i>Tris</i>	100.0	6.0568 g	12.1136 g
10	HCl	1 mol/L	0-5 ml	0-10 ml

Seis andamios de 45S5 Bioglass®, seis andamios de 45S5 Bioglass® cubiertos con partículas mesoporosas y seis andamios de 45S5 Bioglass® cubiertos con partículas mesoporosas conteniendo tetraciclina fueron inmersos en tubos plásticos con 50 ml de SBF. Los tubos se colocaron en una incubadora a una temperatura de 37°C. Dos andamios de cada uno de los tipos mencionados anteriormente fueron retirados de la solución cada 0, 7 y 14 días. El SBF fue renovado cada dos días para garantizar una concentración de cationes estables en la solución.

3.7 Estudios de liberación de la tetraciclina

3.7.1 Curva de calibración de tetraciclina

Para este ensayo se realizaron medidas de intensidad relativa en solución mediante espectroscopía UV-Vis. Se utilizó el equipo Analytik, Jena SPECORD 40, Germany para construir la curva de calibración de TCN en solución de buffer de fosfatos o PBS (por sus siglas en inglés, *Phosphate-buffered saline*) de la compañía Gibco,UK.

Se partió de una solución concentrada (SC) de TCN con 20 mg de TCN y 20 ml de PBS.

Se hicieron las siguientes diluciones a partir de la SC:

1. 1 ml de SC
2. 0.7ml de SC y 0.3 ml de PBS
3. 0.5ml de SC y 0.5 ml de PBS
4. 0.3 ml de SC y 0.7 ml de PBS
5. 0.15 ml de SC y 0.85 ml de PBS
6. 0.1 ml de SC y 0.9 ml de PBS
7. 0.05 ml de SC y 0.95 ml de PBS
8. 1 ml de PBS

Se realizaron las medidas del UV-Vis alrededor de 360 nm (pico característico de la tetraciclina) para cada concentración.

3.7.2 Curva acumulada de liberación de tetraciclina

Dos andamios con partículas mesoporosas cargadas con tetraciclina se sumergieron en tubos de 10 ml de PBS y se incubaron a 37°C. Se tomaron alícuotas de 1ml de cada tubo cada 1h y se midió la concentración de tetraciclina liberada mediante UV-VIS Analytik, Jena SPECORD 40, Germany a $\lambda=360$ nm. Luego se completó el volumen con 1ml de PBS fresco. El procedimiento se repitió para 2h, 4h y 7 días por duplicado y se promediaron las lecturas para cada punto de tiempo.

3.8 Evaluación de la actividad antibacterial

Se investigó el efecto antibacteriano de los scaffolds con tetraciclina contra *Escherichia coli* (*E. coli*) C600 y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) DSM20231. Los cultivos de bacterias se prepararon inoculando 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) con cada cepa bacteriana, seguido de incubación a 37 °C durante 16 h. Se transfirieron alícuotas de 20 μ l a las placas de cultivo celular estéril (Greiner, Frickenhausen, Alemania) y se completó con 1980 μ l de medio LB fresco. Finalmente, se sumergieron 4 scaffolds de MBG+TCN (2 gram+ y 2 gram-) y 4 scaffolds con MBG (muestra de control) en las placas. Las placas preparadas se incubaron durante 24 hs a 37 °C.

4. Resultados y discusiones

4.1 Síntesis de partículas MBG, andamios de 45S5 Bioglass, andamios recubiertos con nanopartículas MBG y sus caracterizaciones.

En la siguiente sección se analizarán las partículas MBG generadas, los andamios de 45S5 Bioglass® fabricados por el método de réplica mencionado en la sección 3.1, y andamios de 45S5 Bioglass® recubiertos según 3.3 con nanopartículas mesoporosas de vidrio bioactivo sintetizadas por el método descrito en la sección 3.2. Se analizará su porosidad, microestructura y propiedades mecánicas.

Se sintetizaron las partículas de MBG y antes de recubrir los andamios de 45S5 Bioglass® se estudió su estructura mediante FTIR (Figura 16)

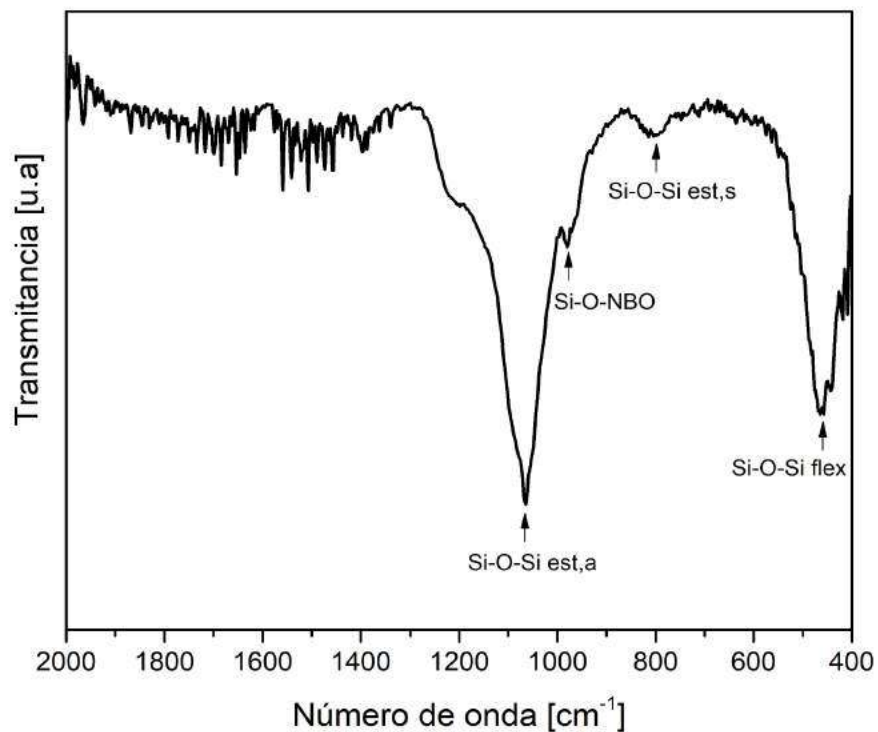


Figura 16. Espectro FTIR de partículas MBG

El pico de transmitancia en la región de 400-500 cm^{-1} está relacionado con la vibración

de flexión del enlace Si-O-Si, el pico alrededor de 800 cm^{-1} a la vibración de estiramiento simétrico del enlace Si-O, y la banda entre 1000 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} se suele asignar a la vibración de estiramiento asimétrica del Si-O-Si. El pequeño pico en el rango de $900\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con el enlace Si-O con oxígeno no enlazante (Si-O-NBO) por tetraedro SiO_4 [53]. La presencia de Si-O-NBO se debe al Ca que actúa como modificador de red, pudiendo reducir el grado de conectividad de la red de sílice y aumentando la bioactividad [54,55]

La morfología de las partículas MBG fue analizada mediante SEM (Figura 17)

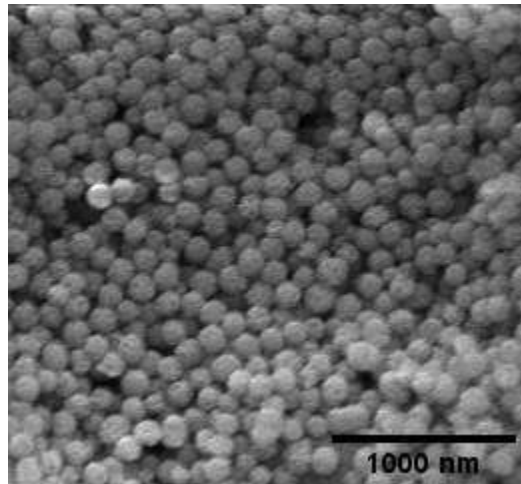


Figura 17. Imagen SEM de partículas MBG.

Se pudo observar que las partículas son esféricas y tienen una distribución de tamaño uniforme. Las partículas presentaron un tamaño promedio de $126 \pm 10\text{ nm}$, resultado acorde a lo reportado en estudios previos para partículas mesoporosas de similar composición y técnica de procesamiento [56].

La imagen SEM de gran aumento de las nanopartículas de MBG muestra una estructura mesoporosa desordenada (Figura 18). Los mesoporos no están muy ordenados debido al agente surfactante utilizado. Los órdenes de los mesoporos en las partículas MBG inducidas por CTAB son más bajos que los de los materiales MBG inducidos por P123 o

F127. Otra razón podría ser la concentración de sílice en el sistema. Se sabe de bibliografía que MBG con mayor contenido de sílice que el utilizado en este trabajo tiene una estructura mesoporosa más ordenada [33,14].

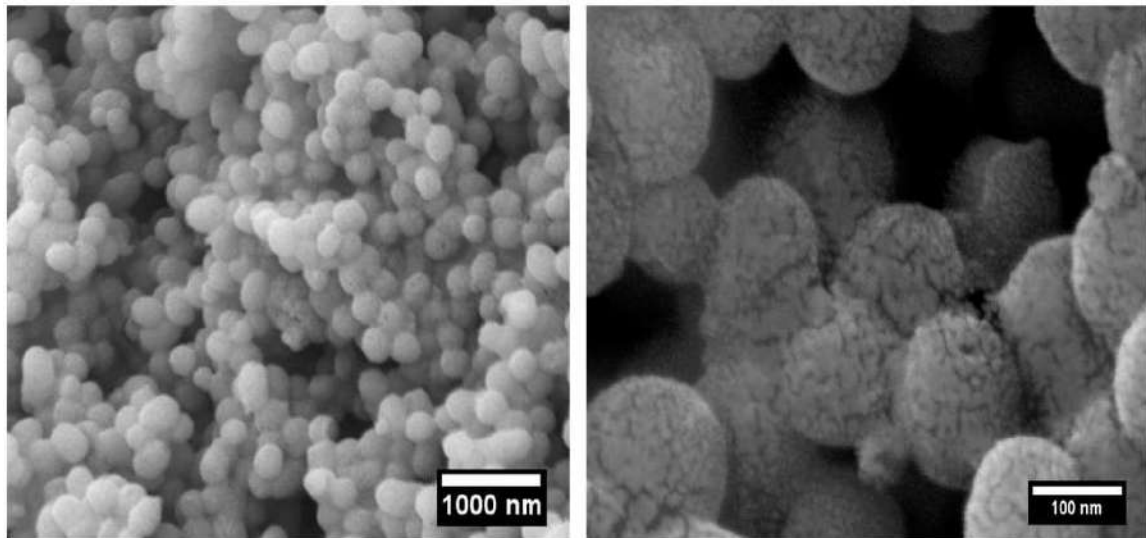


Figura 18. Imágenes SEM de nanopartículas MBG a bajas(izquierda) y altas(derecha) magnificaciones. [56]

Los andamios fueron generados a partir del método de la réplica, con espumas de PU de tamaño de 4 micrones. Parte de esas estructuras fueron recubiertas con las partículas MBG. Una vez obtenidas las estructuras celulares, su morfología y tamaño de poros fueron analizados por SEM. En las Figuras 19 y 20 se pueden apreciar estructuras de poros interconectados y trabéculas uniformes. Se analizó el tamaño medio de poros de cada tipo de andamio mediante ImageJ. Para los andamios sin recubrir con MBG se observaron poros de tamaño en el rango de 280 a 600 μm , mientras que en los andamios recubiertos de 210 a 600 μm . Según los primeros estudios de ingeniería de tejidos óseos, se considera que el requisito mínimo para el tamaño de poro es de alrededor de 100 μm debido al tamaño de las células, la migración y transporte de nutrientes. Sin embargo, diversos estudios recomiendan tamaños de poro $> 300\mu\text{m}$, debido a la mejora en la formación de hueso y formación de capilares, ya que se produce una correcta vascularización que conduce a osteogénesis directa [57]. Los dos andamos logrados en

este trabajo, están dentro de las recomendaciones de tamaño de poro de las citadas referencias.

La Figura 20 muestra que el tamaño de poros se redujo luego del recubrimiento con partículas mesoporosas. Se puede observar un recubrimiento mayoritariamente uniforme y algunos poros bloqueados por las partículas.

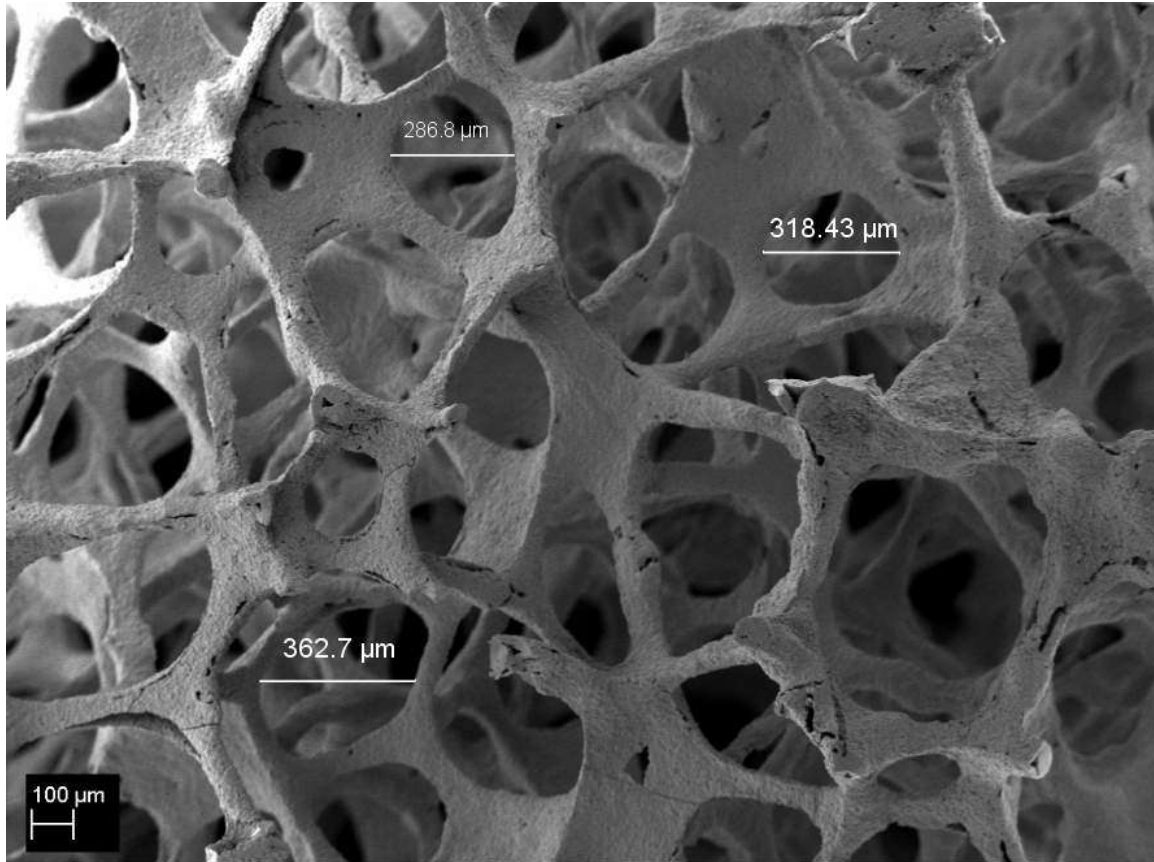


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido de andamio 45S5 Bioglass®

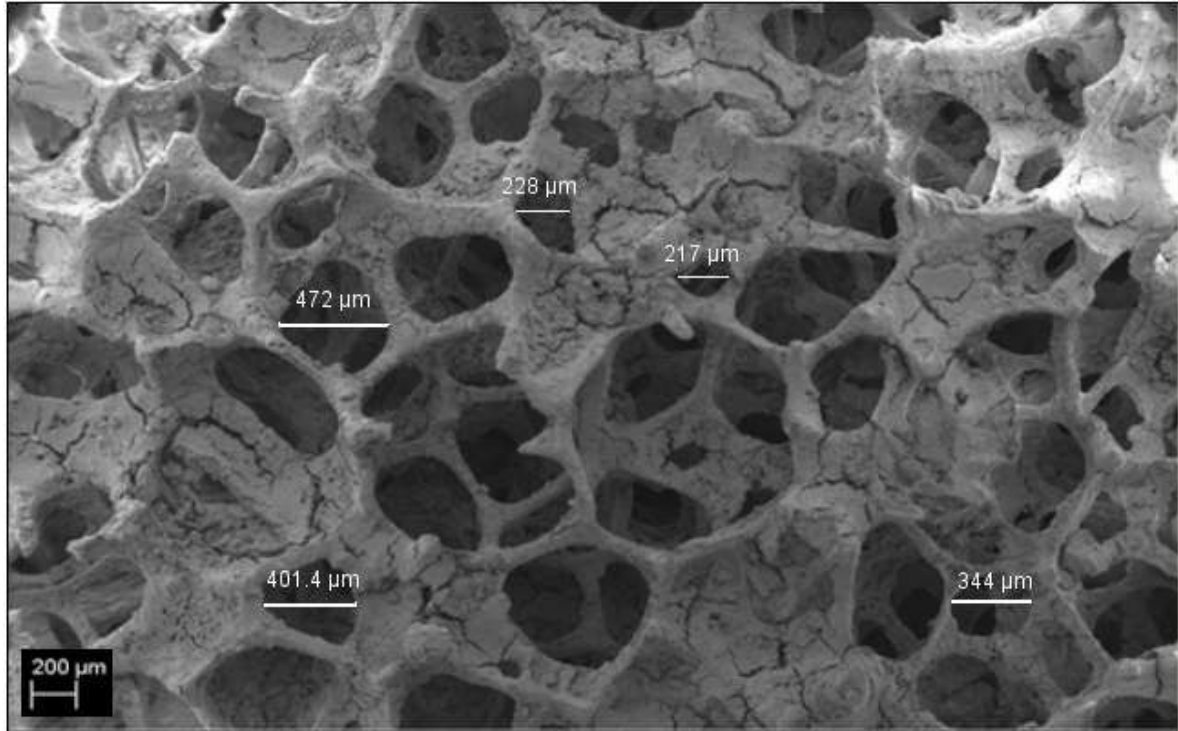


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de andamio 45S5 Bioglass® + MBG

Se pudo verificar mediante microscopía electrónica de barrido que el tamaño de los poros es el adecuado para la correcta vascularización y generación de tejido óseo, que la estructura porosa interconectada se pudo lograr con éxito y que el recubrimiento con partículas resultó uniforme.

También mediante la examinación de las muestras con MBG con microscopía electrónica de barrido, pudo observarse la presencia de fisuras e imperfecciones en los depósitos enter-trabeculares, lo que estaría relacionado con el secado de las muestras. Esto no estaría afectando la integridad y resistencia de los andamios generados, como pudo comprobarse con los ensayos mecánicos.

La porosidad de tres andamios 45S5 Bioglass® y tres andamios de 45S5 Bioglass® con MBG fue calculada a partir de la siguiente ecuación

$$P\% = \left(1 - \frac{\rho_{\text{espuma}}}{\rho_{\text{sólido}}}\right) \times 100$$

Se obtuvieron los resultados de la Tabla 6

Tabla 6. valores de porosidad para dos tipos de andamios

Andamio 45S5 BG	sin MBG	con MBG
Porosidad [%]	92.47 ± 0.72	89.41 ± 0.68

Mediante el cálculo de la porosidad de los andamios de 45S5 Bioglass® se pudo corroborar que la misma cumple con el criterio de porosidad cercana al 90 % utilizado en la ingeniería de tejido óseo para los andamios ideales [58].

Se llevaron a cabo ensayos de resistencia a la compresión para ambos tipos de muestras y se obtuvo una típica curva tensión-deformación (Figura 21). La curva es irregular y tiene tres regímenes distintos. Las espumas tienden a fisurarse primero en las trabéculas delgadas en los sitios de concentración de tensión, lo que hace que la tensión aparente disminuya temporalmente. Pero la espuma, en su conjunto, todavía tenía la capacidad de soportar cargas más altas, lo que provoca que la tensión vuelva a aumentar. [7]

En la etapa I (Figura 21), la curva tensión-deformación tiene una pendiente positiva hasta que se alcanza una tensión máxima. Este esfuerzo máximo provoca la fractura de los tirantes de la espuma y, como resultado, la curva esfuerzo-deformación tiene una pendiente negativa en la etapa II. En la Etapa III, la densificación de las espumas fracturadas ocurre a medida que aumenta la tensión, que es el comportamiento típico de las espumas bajo compresión [59].

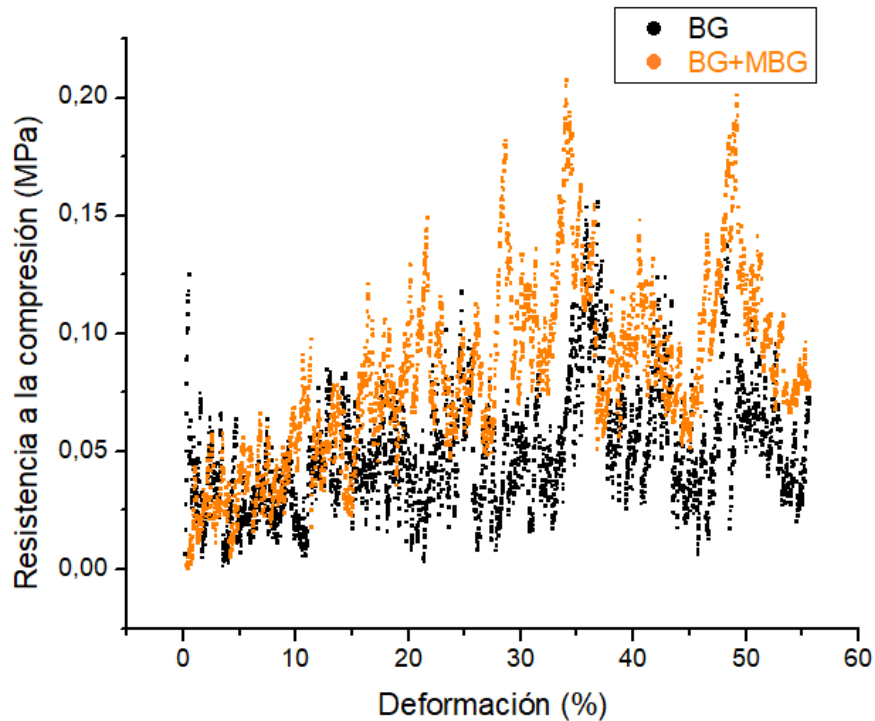


Figura 21. Curva resistencia a la compresión vs deformación para andamios 45S5 Bioglass® y andamios de 45S5 Bioglass® con MBG.

Se obtuvo una resistencia a la compresión máxima de 0.08 ± 0.02 MPa para andamios sin MBG y de 0.14 ± 0.05 MPa para andamios con agregado de MBG. La resistencia a la compresión aumentó después de recubrir con partículas de MBG, demostrado anteriormente en distintos estudios [60,61,62], a pesar que la porosidad de las estructuras disminuyó ligeramente. Se ha demostrado que el módulo de Young y las propiedades mecánicas de los implantes utilizados en regeneración ósea deben ser similares a las del hueso. Un implante con módulo de Young inferior no sería capaz de soportar carga, mientras que un implante con un módulo superior puede provocar stress shielding [63]. La resistencia a la compresión del hueso cortical se encuentra entre 100-150 MPa y la del hueso trabecular entre 2-12 MPa. Si bien la resistencia a la compresión aumentó al recubrir los andamios con MBG, los andamios generados son un orden de magnitud más débiles que el hueso trabecular y tres órdenes de magnitud menores al hueso cortical, como pudo observarse en estudios similares [64].

4.2 Estudio de la respuesta *in vitro* inorgánica de los andamios sin y con recubrimiento de partículas mesoporosas mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF)

En esta sección se analizarán tres tipos de andamios detallados en la Tabla 7.

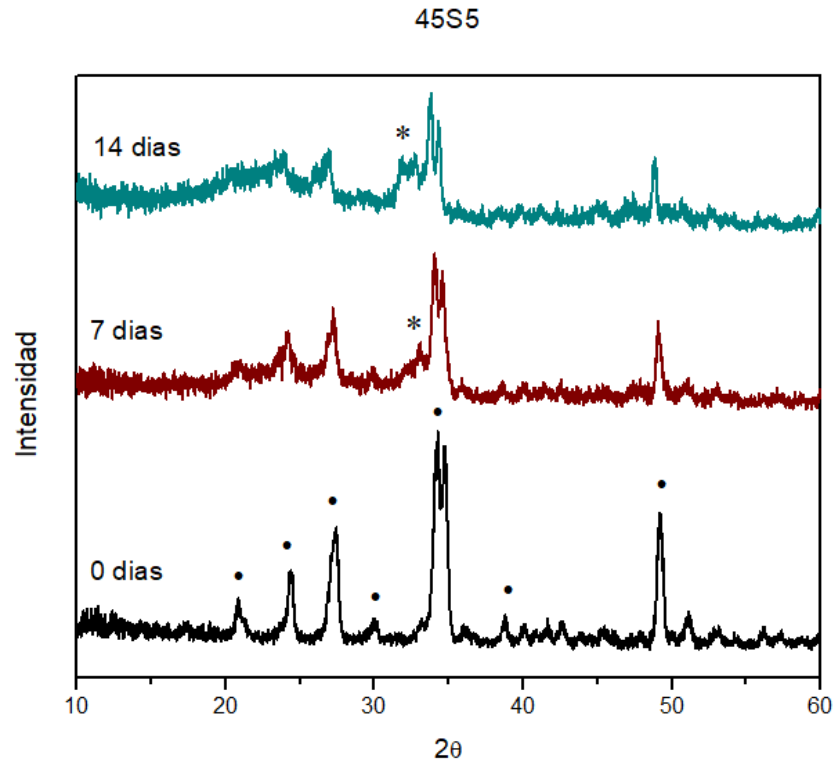
Tabla 7. Tipos de andamios analizados

Nombre	Descripción
45S5	Andamio de 45S5 Bioglass®
45S5 + MBG	Andamio de 45S5 Bioglass® recubierto con nanopartículas mesoporosas de vidrio bioactivo
45S5 + MBG + TCN	Andamio de 45S5 Bioglass® recubierto con nanopartículas mesoporosas de vidrio bioactivo cargadas con tetraciclina

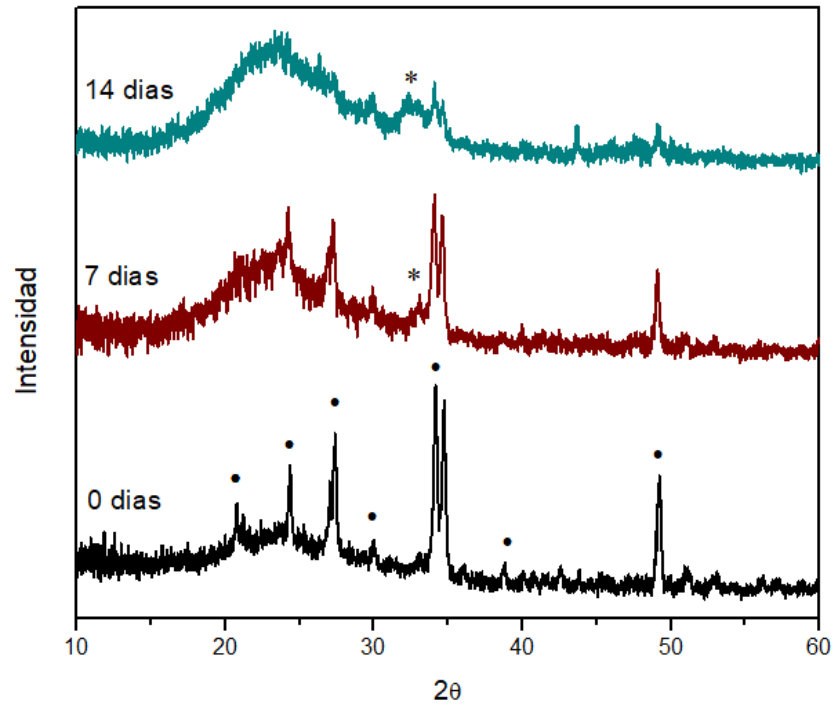
Los andamios 45S5 fueron fabricados por el método de réplica mencionado en la sección 3.1 y los andamios 45S5+MBG y 45S5+MBG+TCN según los métodos de recubrimiento de las secciones 3.3 y 3.4 respectivamente. Se realizaron ensayos de inmersión en solución fisiológica simulada a $36,5 \pm 0,5$ °C por diferentes períodos de tiempo, para evaluar la degradación de los andamios, así como la generación de compuestos relacionados con la apatita, depositados en su superficie.

En la Figura 22 se pueden apreciar los espectros de DRX para los tres tipos de andamios mencionados anteriormente. Antes de la inmersión, se pueden observar los picos correspondientes a la fase $Na_2Ca_2Si_3O_9$, característica del Bioglass® [49]. Estos picos se pueden apreciar en los tres tipos de andamios por lo que se podría decir que el agregado de partículas mesoporosas y tetraciclina no generó un cambio significativo en la estructura cristalina del BG de la matriz. Luego de la inmersión en SBF por 7 días, se observan picos en $2\theta = 26^\circ, 32^\circ, 33^\circ$ y 40° correspondientes a la difracción de los

planos (002), (211), (300) y (310) respectivamente, los cuales corresponden a la formación de hidroxiapatita. [65,66]. Luego de 14 días, se puede observar que los picos de hidroxiapatita aumentan mientras que los correspondientes a la fase $Na_2Ca_2Si_3O_9$ disminuyen en el tiempo debido a su degradación.



45S5 + MBG



45S5 + MBG + TCN

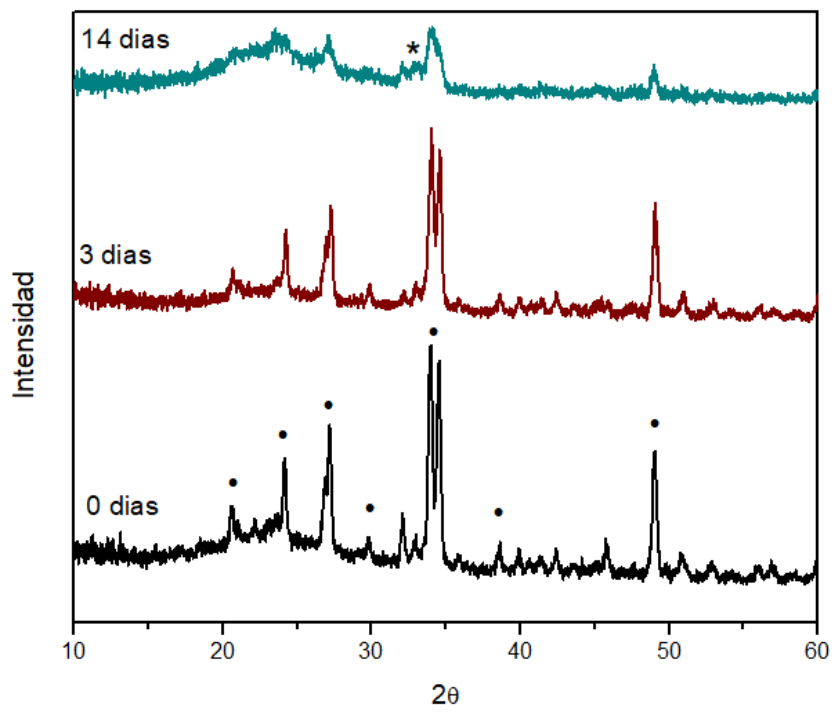


Figura 22. DRX para Bioglass® 45S5, Bioglass® 45S5 con partículas mesoporosas y Bioglass® 45S5 con partículas mesoporosas y tetraciclina en SBF a distintos tiempos. Los picos principales de la fase $Na_2Ca_2Si_3O_9$ e hidroxiapatita están marcados con (•) y (*), respectivamente.

En la Figura 23, se muestra el espectro FTIR del vidrio bioactivo 45S5 antes (0 días) y después de su inmersión en SBF (7, 14 días).

Antes de realizar la prueba *in vitro*, se aprecian los enlaces Si-O-Si característicos de estos vidrios, los cuales aparecen entre las bandas 1040 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} (en modo estiramiento) y alrededor de 460 cm^{-1} (en modo flexión). El enlace P-O se reporta en las bandas entre 570 cm^{-1} y 600 cm^{-1} correspondiente a los fosfatos cristalinos. Alrededor de 950 cm^{-1} se presenta una banda correspondiente a los oxígenos no enlazantes (NBO) del Si-O-Ca. [67,68].

Luego de la inmersión en SBF, se pudo apreciar la presencia de bandas que indican la formación de hidroxiapatita carbonatada (HCA). La banda ancha entre 1000 y 1050 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces P-O del tetraedro PO_4^{3-} en HCA [69]. Los picos en el rango de 570 y 600 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión del enlace P-O [70]. Normalmente, la formación de la capa de hidroxiapatita cristalina (HA) se indica con la aparición de los picos de flexión del enlace P-O ya que la banda de estiramiento del enlace se superpone a la banda de estiramiento del Si-O entre 1000 y 1200 cm^{-1} [71]. El pico en $800-890\text{ cm}^{-1}$ se asigna a la vibración de estiramiento C-O, indicando que la hidroxiapatita se encuentra carbonatada HCA[72,73].

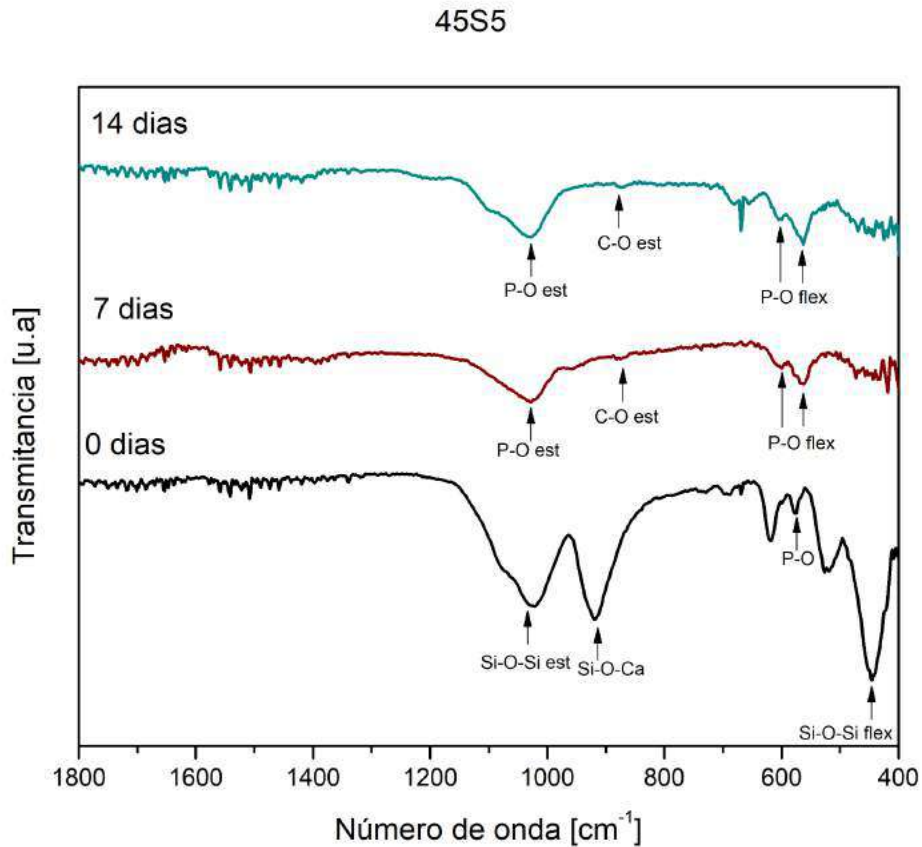


Figura 23. FTIR Bioglass 45S5 en SBF a distintos tiempos

En la Figura 24 se muestra el espectro FTIR del vidrio bioactivo 45S5 con nanopartículas MBG antes (0 días) y después de su inmersión en SBF (7, 14 días).

Al igual que en el caso anterior, se pueden observar los picos típicos correspondientes a vidrios bioactivos en el espectro antes de la inmersión. Luego de la inmersión, se observan picos característicos de HCA confirmando su presencia.

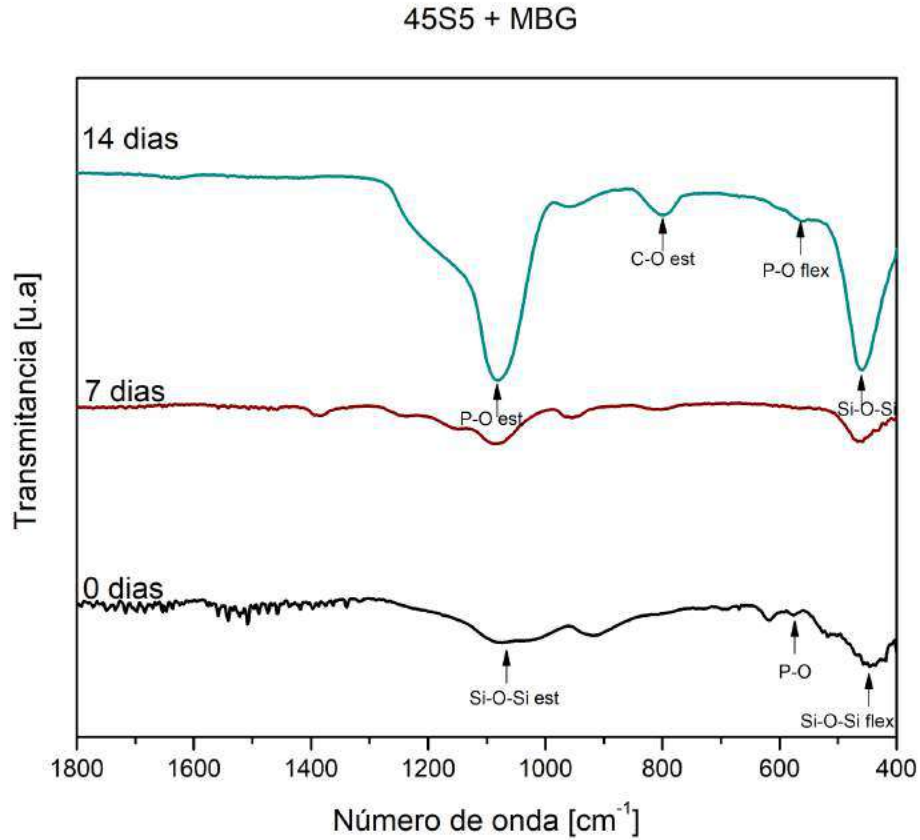


Figura 24. FTIR Bioglass 45S5 con partículas mesoporosas en SBF a distintos tiempos.

En la Figura 25 se muestra el espectro FTIR del vidrio bioactivo 45S5 con nanopartículas MBG cargadas con tetraciclina antes (0 días) y después de su inmersión en SBF(7, 14 días).

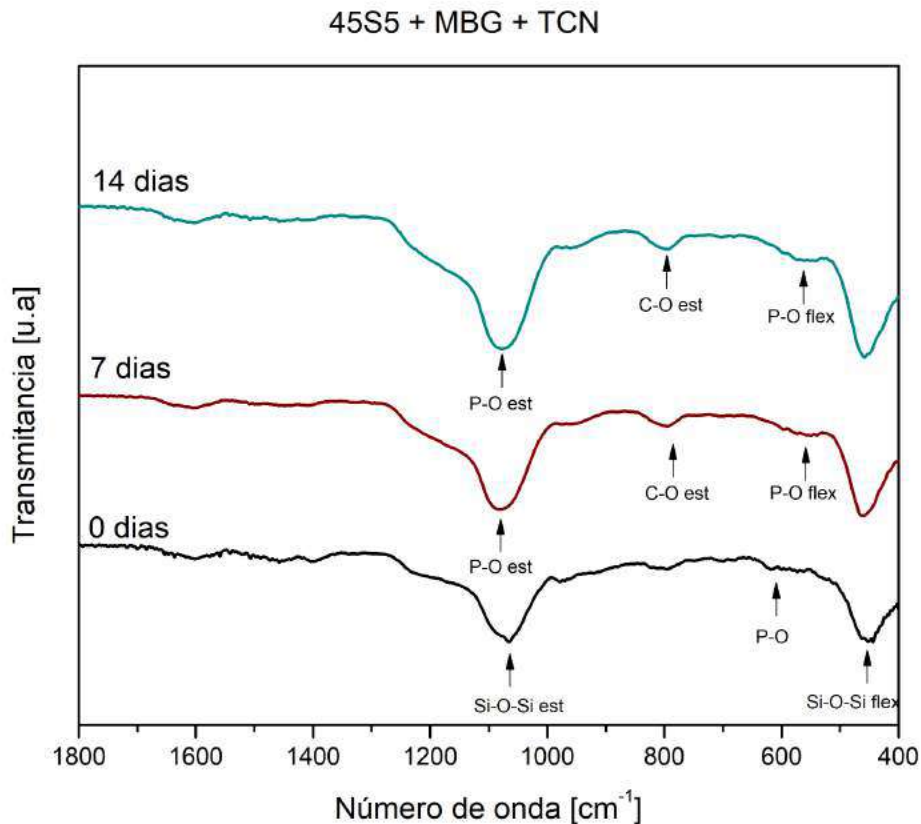


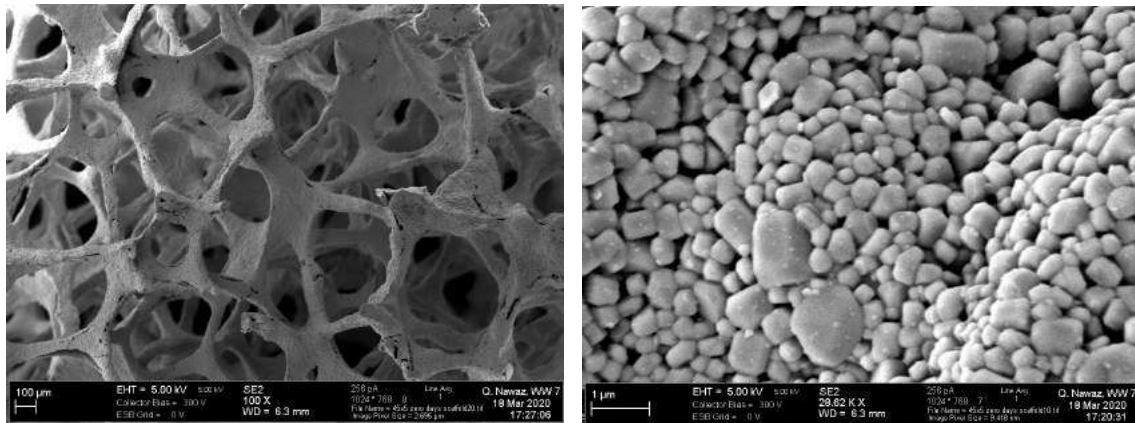
Figura 25. FTIR Bioglass 45S5 con partículas mesoporosas y tetraciclina en SBF a distintos tiempos

Antes de la inmersión en SBF, se puede observar que los picos característicos de Bioglass no cambiaron después de cargar con TCN, lo que indica que las moléculas de TCN cargadas no iniciaron una reacción química con Bioglass. Este resultado sugiere que las moléculas de TCN cargadas en los andamios de Bioglass no perdieron su actividad [67]. Luego de la inmersión, se puede inferir la incipiente formación de HCA, por la presencia del pico P-O en flexión alrededor de 600 cm^{-1} , aunque este es de muy baja intensidad y poco pronunciado.

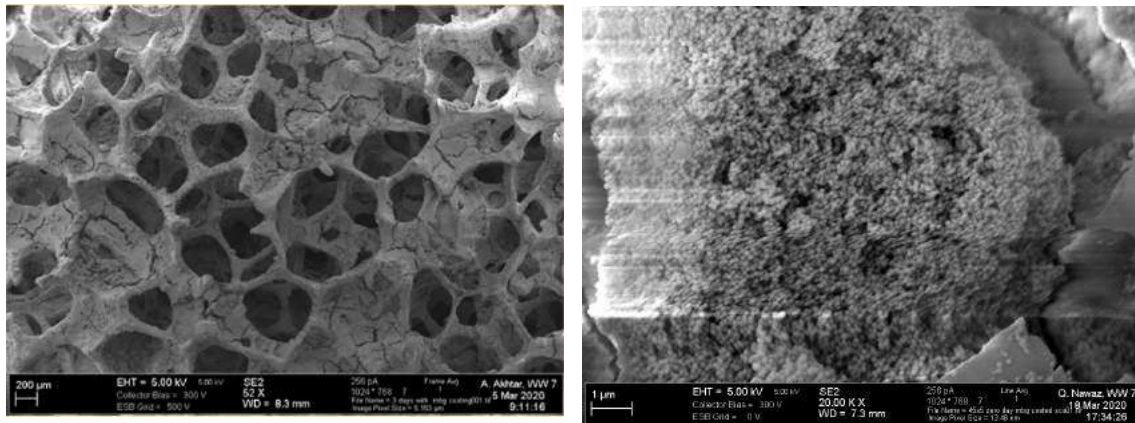
La Figura 27 muestra imágenes SEM de la superficie de los tres tipos de andamios de vidrio bioactivo luego de la inmersión en SBF por 14 días. Se puede observar luego de comparar con la Figura 26, la cual muestra las mismas superficies antes de la inmersión

en SBF, la aparición de una capa uniforme de HCA en las trabéculas de los andamios (imágenes de menor magnificación) así como la morfología de los cristales de HCA(imágenes de mayor magnificación). Los cristales de HCA presentan una morfología globular y de coliflor. La formación de cristales de HCA se da tanto la superficie de 45S5 Bioglass como en los recubrimientos de nanopartículas MBG y en los recubrimientos de nanopartículas MBG cargadas con tetraciclina, por lo que se puede deducir que estos tipos de recubrimientos con partículas cargadas con fármacos, no obstaculizan la bioactividad. [72]

(A)



(B)



(C)

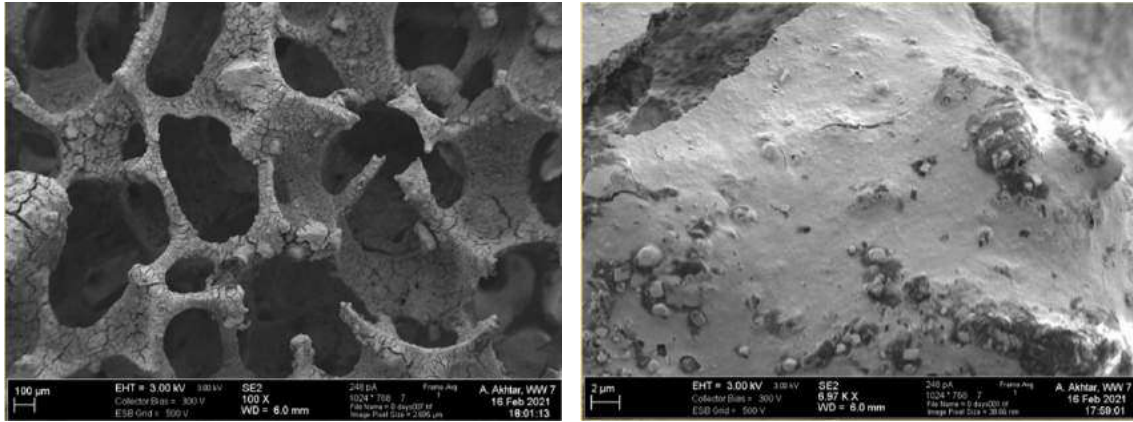
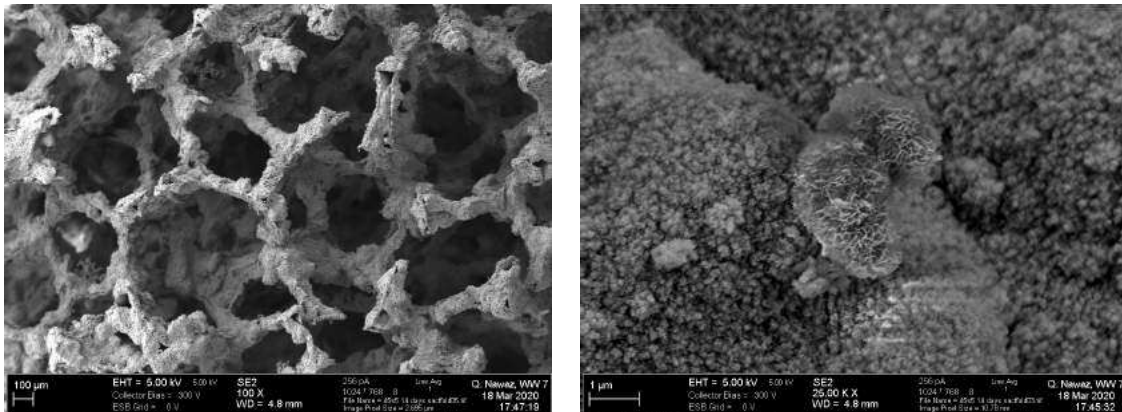


Figura 26. Imágenes SEM de la superficie de un andamio de vidrio antes de la inmersión en SBF (A)45S5 (B)45S5+MBG (C)45S5+MBG+TCL: imagen de menor aumento(izquierda) e imagen de mayor aumento(derecha).

(A)



4.3 Estudio de la liberación de fármaco *in vitro* de los andamios de vidrio bioactivo con partículas mesoporosas embebidas en tetraciclina.

En la siguiente sección se analizarán andamios de 45S5 Bioglass® recubiertos con nanopartículas mesoporosas de vidrio bioactivo embebidas en tetraciclina según el procedimiento descrito en la sección 3.4. Se analizará la estructura de las partículas MBG con TCN mediante FTIR. Se estudiará la cinética de liberación de la droga elegida, tetraciclina, dentro de las partículas mesoporosas que recubren los andamios. Se analizará la respuesta antibacterial de los andamios con y sin la droga elegida, mediante ensayos con bacterias gram+ y gram- (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*).

La Figura 28 muestra el espectro FTIR de partículas MBG cargadas con TCN. Se observan los enlaces Si-O-Si característicos de MBG los cuales aparecen entre las bandas 1040 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} (en modo estiramiento) y alrededor de 460 cm^{-1} (en modo flexión) marcados con “*”. Se observa un pico a 1200 cm^{-1} marcado con “•” característico de TCN. Las bandas en 1672 cm^{-1} y 1528 cm^{-1} marcadas con “•” se debieron al estiramiento C=O, la flexión NH₂ y el estiramiento C-N, lo que muestra que el TCN se adsorbió en MBG a través de la interacción entre el grupo amida de TCN y el Ca²⁺ superficial de MBG.[74]

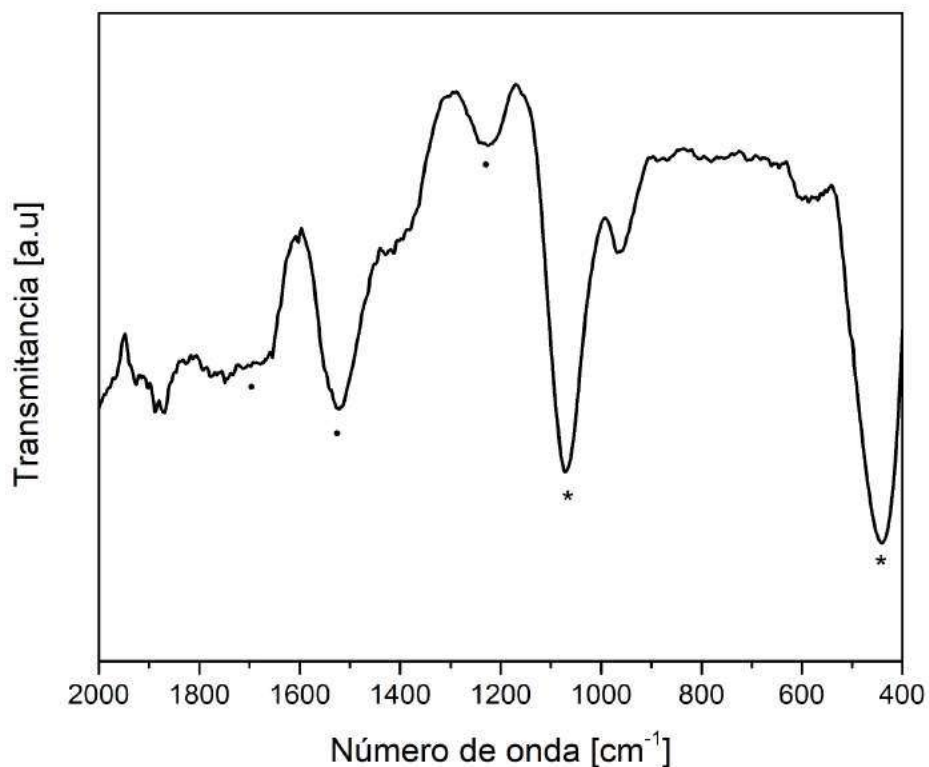


Figura 28. FTIR nanopartículas mesoporosas de biovidrio cargadas con tetraciclina. Los picos principales correspondientes a MBG y TCN están marcados con (*) y (•), respectivamente.

En cuanto a los perfiles de liberación de la droga propuesta, Tetraciclina, se analizó mediante inmersión en solución de buffer de fosfatos, PBS, ya que la composición de éste no interfiere en la medida de la droga en la espectroscopía UV-vis. En la Figura 29 se puede observar el perfil de liberación acumulativo y la cantidad de fármaco liberada. La liberación de tetraciclina se estudió hasta los 7 días alcanzando una liberación acumulada del 12%. Se observó una liberación inicial repentina: transcurridas las primeras 4 horas la liberación acumulada fue aproximadamente del 7%. Esto podría deberse a la existencia de moléculas de tetraciclina en la superficie de las partículas mesoporosas que difunden rápidamente a la solución de PBS.

En general, las curvas de liberación se pueden dividir en dos partes: una liberación rápida inicial seguida de un patrón de liberación lenta [75]. La liberación rápida se debe principalmente a la disolución del fármaco que se adsorbe físicamente en las nanopartículas de MBG, y la liberación lenta puede atribuirse a los fármacos adsorbidos químicamente [76]. Existen dos tipos de moléculas de TCN adsorbidas en los mesoporos de MBG: las TCN adsorbidas físicamente (tipo I) y las TNC adsorbidas químicamente (tipo II) a través de la quelación con especies de calcio en la pared del poro de las MBG. [76]. En el período de liberación inicial (<4 h) de MBG-TCN en PBS, la cinética de liberación rápida puede asociarse predominantemente con TCN tipo I. Mientras la liberación lenta se debe a las moléculas de TCN de tipo II en MBG que son mucho más difíciles de liberar en comparación con las moléculas de TCN de tipo I.

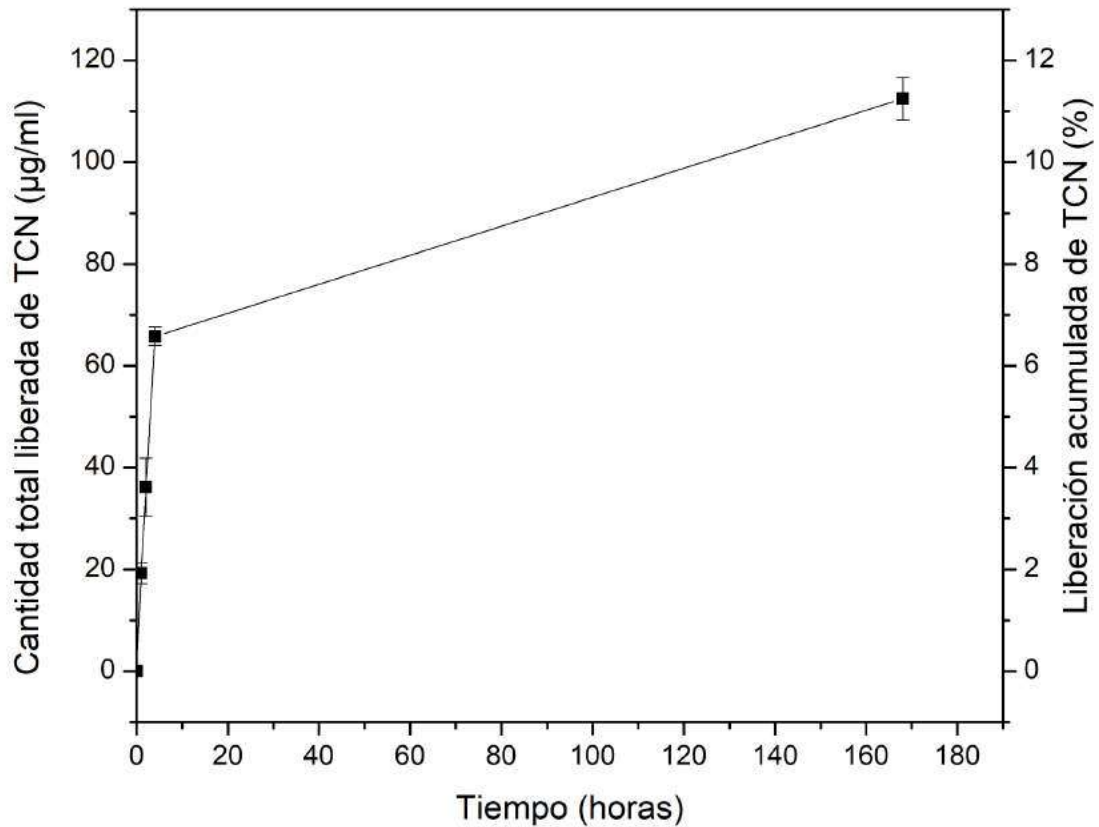


Figura 29. Liberación acumulada de tetraciclina en PBS para andamios de 45S5 Bioglass

recubiertos de nanopartículas MBG-TCN.

Con el objeto de analizar el efecto de la liberación de tetraciclina efectivamente contra bacterias, se realizaron ensayos anti-bacteriales típicos de halo de inhibición, donde las muestras se ponen en contacto por 24 hs con una concentración estándar de bacterias en placas de agar.

Se utilizaron andamios recubiertos con partículas mesoporosas no cargados con fármaco como control para dos cepas de bacterias *Escherichia coli* (gram -) y *Staphylococcus aureus* (gram +) (Figura 30). En estos casos, no se observó halo de inhibición.

Luego, se utilizaron andamios recubiertos con partículas mesoporosas cargadas con tetraciclina y se determinó el halo de inhibición para ambas cepas de bacterias por duplicado (Figura 31). Se pudo observar la inhibición en la producción de biofilms bacterianos en el área cercana al implante poroso para ambas bacterias en las muestras que contenían tetraciclina.

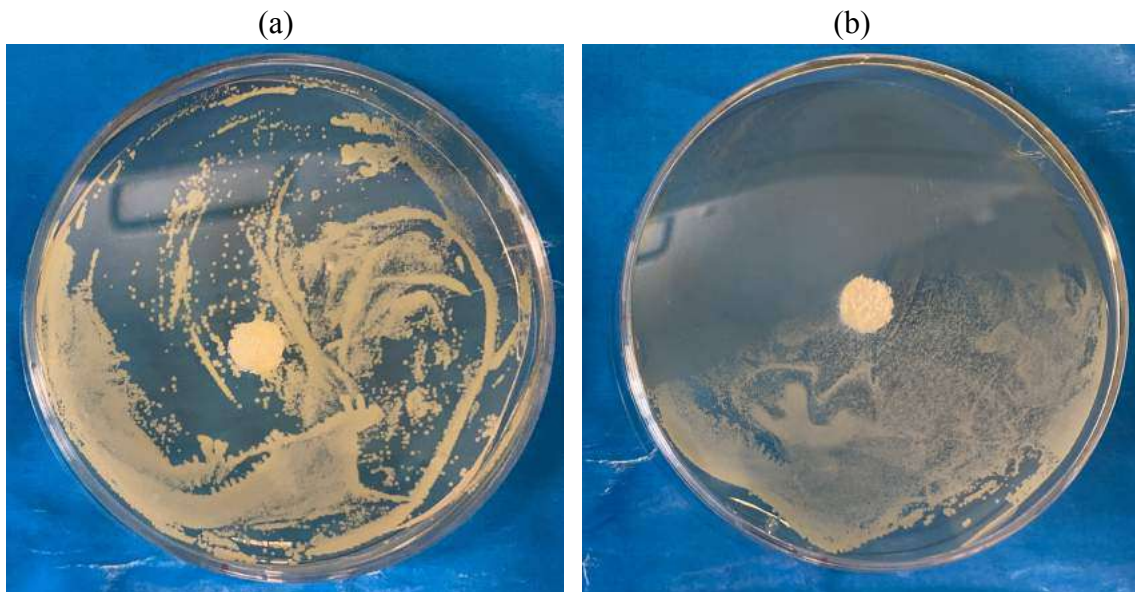


Figura 30. Imágenes de ensayos antibacteriales para andamios de tipo 45S5+MBG como control, utilizando dos cepas (a) gram- y (b) gram+.

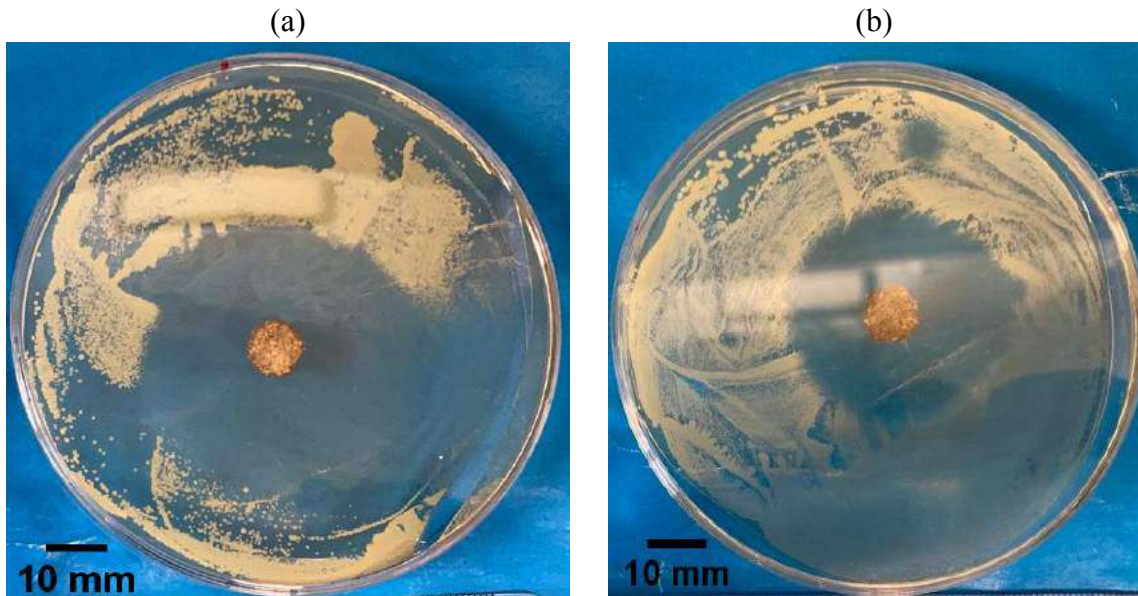


Figura 31. Imágenes de ensayos antibacteriales para andamios tipo 45S5+MBG+TCN utilizando dos cepas (a) gram- y (b) gram+.

Se utilizó ImageJ para medir el diámetro del halo, donde se encontró un diámetro de inhibición presente de $43.19 \pm 2.15 \text{ mm}$ en *Escherichia coli* y de $36.58 \pm 2.62 \text{ mm}$ en *Staphylococcus aureus*, para las muestras de andamios de BG con partículas MBG cargadas con TCN. Estos ensayos antibacteriales llamados “directos” confirman la presencia de TCN en las partículas MBG en la cantidad adecuada para inhibir el crecimiento bacterial a tiempos cortos (24hs).

5. Conclusiones

- Se logró fabricar adecuadamente andamios de vidrio bioactivo comercial (45S5 Bioglass). El tamaño de poros y la estructura porosa interconectada fueron los adecuados para utilizar en BTE.
- Luego del recubrimiento con partículas mesoporosas de vidrio bioactivo, se redujo la porosidad aproximadamente un 3% pero la resistencia a la compresión aumentó de 0.08 ± 0.02 MPa a 0.14 ± 0.05 MPa y se pudo verificar mediante SEM que el recubrimiento resultó uniforme conservando la estructura porosa interconectada y el tamaño de poros adecuado. Por lo que el proceso de impregnación de los andamios de BG con las partículas MBG no perjudica la performance mecánica de los mismos.
- Al evaluar las partículas mesoporosas con tetraciclina, se pudo comprobar que el fármaco se adsorbió química y físicamente mediante FTIR. Al recubrir los andamios con las partículas MBG con TCN se pudo observar también la correcta liberación de la droga (12% en 168 hs). Se pudo verificar que la incorporación del fármaco tuvo efectos antibacteriales e inhibió la formación de biofilms bacterianos tanto de bacterias gram + como gram -.
- Además se pudo observar que todos los tipos de andamios presentaron formación de hidroxiapatita carbonatada luego de 14 días de inmersión en SBF.

6. Trabajo a Futuro

Para continuar con la investigación y desarrollo de andamios para reconstrucción ósea se propone:

- Estudiar en detalle la morfología de las partículas de MBG sin y con TCN, para analizar su estructura y posibilidad de liberación de sustancias.
- Recubrir los andamios con materiales biocompatibles tales como polímeros biodegradables para optimizar las propiedades mecánicas y lograr propiedades similares a las del hueso.
- Estudiar el efecto de utilizar partículas mesoporosas con distintas composiciones químicas: aumentar el contenido de Ca y/o agregar iones modificadores de red como Mn. Evaluar el cambio en la bioactividad y propiedades mecánicas.
- Realizar una evaluación celular *in vitro* de modo de determinar si la concentración de fármaco utilizada es la correcta o si la misma es demasiado elevada y puede provocar citotoxicidad.
- Evaluar el efecto de incorporar el fármaco durante el proceso sol-gel de fabricación de MBG.

7. Referencias

- [1] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. *Science*, 260 (1993), pp. 920-926.
- [2] Hench L L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006, 17(11): 967-978.
- [3] Rahaman M N, Day D E, Bal B S, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(6): 2355-2373.
- [4] Jones J R Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 2015, 23: S53-S82.
- [5] Hench L L. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*, 74 (1991), pp. 1487-1510.
- [6] Fu Q, Saiz E, Rahaman M N, et al. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 2011, 31(7): 1245-1256.
- [7] Corona-Gomez J, Chen X, Yang Q. Effect of Nanoparticle Incorporation and Surface Coating on Mechanical Properties of Bone Scaffolds: A Brief Review. *Journal of Functional Biomaterials*, 2016, 7(3): 18.
- [8] Roohani-Esfahani S I, Nouri-Khorasani S, Lu Z F, et al. Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behaviour of composite coated scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(3): 1307-1318.
- [9] Amini A R, Laurencin C T, Nukavarapu S P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges[J]. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 2012, 40(5).

[10] Fratzl P, Gupta H S, Paschalis E P, et al. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone[J]. *Journal of materials chemistry*, 2004, 14(14): 2115-2123.

[11] Rahaman M N, Brown R F, Bal B S, et al. Bioactive glasses for nonbearing applications in total joint replacement[C]//*Seminars in Arthroplasty*. WB Saunders, 2006, 17(3): 102-112.

[12] Cormack A N. The structure of bioactive glasses and their surfaces[J]. *Bio-Glasses: An Introduction*, 2012: 65-74.

[13] Pedone A, Charpentier T, Malavasi G, et al. New insights into the atomic structure of 45S5 bioglass by means of solid-state NMR spectroscopy and accurate first-principles simulations[J]. *Chemistry of Materials*, 2010, 22(19): 5644-5652.

[14] Sepulveda P, Jones J R, Hench L L. *In vitro* dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2002, 61(2): 301-311.

[15] Li A, Wang D, Xiang J, et al. Insights into new calcium phosphosilicate xerogels using an advanced characterization methodology[J]. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2011, 357(19): 3548-3555.

[16] Arcos D, Greenspan D C, Vallet-Regí M. A new quantitative method to evaluate the *in vitro* bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65(3): 344-351.

[17] Mercier C, Follet-Houttemane C, Pardini A, et al. Influence of P 2 O 5 content on the

structure of SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ bioglasses by ²⁹Si and ³¹P MAS-NMR[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011, 357(24): 3901-3909.

[18] Hill R G, Brauer D S. Predicting the bioactivity of glasses using the network connectivity or split network models[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011, 357(24): 3884-3887.

[19] Hill R. An alternative view of the degradation of bioglass[J]. Journal of Materials Science Letters, 1996, 15(13): 1122-1125.

[20] Edén M. The split network analysis for exploring composition–structure correlations in multi-component glasses: I. Rationalizing bioactivity-composition trends of bioglasses[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011, 357(6): 1595-1602

[21] Yu, Y., Bacsik, Z., & Edén, M. (2018). Contrasting *In Vitro* Apatite Growth from Bioactive Glass Surfaces with that of Spontaneous Precipitation. Materials, 11(9), 1690.

[22] Wu C, Chang J, Xiao Y. Mesoporous bioactive glasses as drug delivery and bone tissue regeneration platforms[J]. 2011.

[23] Sepulveda P, Jones J R, Hench L L. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2001, 58(6): 734-740.

[24] Lin S, Ionescu C, Pike K J, et al. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass[J]. Journal of Materials Chemistry, 2009, 19(9): 1276-1282.

[25] Pereira M M, Clark A E, Hench L L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface[J]. Journal of the American Ceramic Society, 1995, 78(9):

2463-2468.

[26] Owens G J, Singh R K, Foroutan F, et al. Sol-gel based materials for biomedical applications[J]. *Progress in Materials Science*, 2016, 77: 1-79.

[27] Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 193: 282-295.

[28] Wu C, Chang J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application[J]. *Interface Focus*, 2012: rsfs20110121.

[29] Yan X, Yu C, Zhou X, et al. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(44): 5980-5984.

[30] Arcos D, Lopez-Noriega A, Ruiz-Hernandez E, et al. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery[J]. *Chemistry of Materials*, 2009, 21(6): 1000-1009.

[31] Wu C, Fan W, Zhu Y, et al. Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure[J]. *Acta biomaterialia*, 2011, 7(10): 3563-3572.

[32] Zhao L, Yan X, Zhou X, et al. Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, 109(1): 210-215.

[33] Li R, Clark A E, Hench L L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing[J]. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991, 2(4): 231-239.

- [34] Francesco Baino and Elisa Fiume, Elastic Mechanical Properties of 45S5-Based Bioactive Glass–Ceramic Scaffolds, *Materials* 2019, 12, 3244.
- [35] Owens, G., Singh, R.K., Foroutan, F., Alqaysi, M., Han, C-M., Mahapatra, C., Kim, H[1]W., Knowles, J.C., Sol-gel Based Materials for Biomedical Applications, *Progress in Materials Science* (2016).
- [36] Hench LL, West JK. The sol-gel process. *Chem Rev*, 1990;90:33–72.
- [37] Radha Gupta and Ashok Kumar, Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology, *Biomed. Mater.* 3 (2008) 034005 (15pp)
- [38] Vichery C, Nedelec J-M. Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications. *Materials (Basel)*, 2016;9:288–95.
- [39] Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolás M J, Clavel-Sainz M, et al. Biocompatibility and *in vivo* gentamicin release from bioactive sol–gel glass implants[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2002, 61(3): 458-465.
- [40] Brinker CJ, Scherer GW: *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. Academic Press; 1990.
- [41] Wu S H, Mou C Y, Lin H P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(9): 3862-3875.
- [42] Iler R K. *The Chemistry of Silica, Solubility, Polymerization[J]. Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, 1979, 866.
- [43] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the

micron size range[J]. *Journal of colloid and interface science*, 1968, 26(1): 62-69.

[44] Grün M, Lauer I, Unger K K. The synthesis of micrometer- and submicrometer-size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41[J]. *Advanced Materials*, 1997, 9(3): 254-257.

[45] Huang Y, Zhou D, Xie Y, et al. Tunable sound absorption of silicone rubber materials via mesoporous silica[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(29): 15171-15179.

[46] Hum, J., & Boccaccini, A. R. (2012). Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(10), 2317–2333.

[47] Tamjid, E., Bohlouli, M., Mohammadi, S., Alipour, H., & Nikkhah, M. (2020). Sustainable drug release from highly-porous and architecturally-engineered composite scaffolds prepared by 3D printing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.

[48] Schnappinger, D., & Hillen, W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, 165(6), 359–369.

[49] Chen, Q. Z., Thompson, I. D., & Boccaccini, A. R. (2006). 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2414–2425.

[50] Shiao-Wen Tsai et al, Preparation of Nanofibrous Structure of Mesoporous Bioactive Glass Microbeads for Biomedical Applications, *Materials* (2016), 9, 487.

[51] Boccardi et al, Bioactivity and Mechanical Stability of 45S5 Bioactive Glass Scaffolds Based on Natural Marine Sponges, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 44, No. 6, June 2016 (2016) pp. 1881–1893.

- [52] Kokubo T, et al., Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3[J], Journal of Biomedical Materials Research Part A (1990) 721-734.
- [53] Barrioni B R, Oliveira A C, de Fátima Leite M, et al. Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering[J]. Journal of Materials Science, 2017, 52(15): 8904-8927.
- [54] Jones J R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids[J]. Acta biomaterialia, 2015, 23: S53-S82
- [55] Serra J, González P, Liste S, Serra C, Chiussi S, León B, Pérez-Amor M, Ylänen HO, Hupa M (2003) FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses. J Non Cryst Solids 332:20–27.
- [56] Nawaz, Q., Fuentes-Chandía, M., Tharmalingam, V., Ur Rehman, M. A., Leal-Egaña, A., & Boccaccini, A. R. (2020). Silibinin releasing mesoporous bioactive glass nanoparticles with potential for breast cancer therapy. Ceramics International.
- [57] Vassilis Karageorgiou; David Kaplan (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. , 26(27), 5474–5491.
- [58] Freyman T M, Yannas I V, Gibson L J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering[J]. Progress in Materials Science, 2001, 46(3): 273-282.
- [59] Gibson L J, Ashby M F. Cellular solids: structure and properties, (2nd ed), Pergamon, Oxford (1999), pp. 117–118 and 209–212
- [60] Roohani-Esfahani S I, Nouri-Khorasani S, Lu Z F, et al. Effects of bioactive glass

nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds [J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(3): 1307-1318.

[61] S.I. Roohani Esfahani; F. Tavangarian; R. Emadi (2008). Nanostructured bioactive glass coating on porous hydroxyapatite scaffold for strength enhancement. , 62(19), 3428–3430.

[62] In-Kook Jun; Ju-Ha Song; Won-Young Choi; Young-Hag Koh; Hyoun-Ee Kim; Hae-Won Kim (2007). Porous Hydroxyapatite Scaffolds Coated With Bioactive Apatite–Wollastonite Glass–Ceramics., 90(9), 2703–2708.

[63]Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., ... Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 3(3), 278–314.

[64] 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.

[65] Kwon, Kyung-Ah & Juhasz, Judith & Brooks, Roger & Best, Serena. (2018). Bioactive conformable hydrogel-carbonated hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti-6Al-4V substrates. *Materials Technology*. 35. 1-7. 10.1080/10667857.2018.1475143.

[66] Salha Boulila. Hassane Oudadesse¹, Rim Kallel² et al (2017). *In vivo* study of hybrid biomaterial scaffold bioactive glass–chitosan after incorporation of Ciprofloxacin. *Polym. Bull*.

[67] Patcharakamon Nooeaid, Wei Li, Judith A. Roether, Viviana Mouriño, Ourania-Menti Goudouri, Dirk W. Schubert, and Aldo R. Boccaccini, Development of bioactive glass

based scaffolds for controlled antibiotic release in bone tissue engineering via biodegradable polymer layered coating

[68] Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Meng, X. G., & Shi, J. Z. (2010). Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol–gel derived SiO₂–CaO–P₂O₅ bioglass. *Ceramics International*, 36(6), 1911–1916.

[69] Vallet-Regí M, Romero A M, Ragel C V, et al. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of *in vitro* growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1999, 44(4): 416-421.

[70] Jones J R, Ehrenfried L M, Hench L L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(7): 964-973

[71] Notingher I, Jones J R, Verrier S, et al. Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells[J]. *Journal of Spectroscopy*, 2003, 17(2-3): 275-288

[72] Li, W., Garmendia, N., Pérez de Larraya, U., Ding, Y., Detsch, R., Grünewald, A., Boccaccini, A. R. (2014). 45S5 bioactive glass-based scaffolds coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering. *RSC Adv.*, 4(99), 56156–56164.

[73] Filho, O. P., La Torre, G. P., & Hench, L. L. (1996). Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(4), 509–514.

[74] Huaizhi Zhang et al 2017 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 182 012052

[75] Hum, J., & Boccaccini, A. R. (2012). Bioactive glasses as carriers for bioactive

molecules and therapeutic drugs: a review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(10), 2317–2333.

[76] Zhao, L., Yan, X., Zhou, X., Zhou, L., Wang, H., Tang, J., & Yu, C. (2008). Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. *Microporous and Mesoporous Materials*, 109(1-3), 210–215.