

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea**  
**Facultad de Química/Kimika fakultatea**

***Grado en Química***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**<Incorporación de simvastatina a recubrimientos sol-gel para implantes dentales>**

**Autora:** Irene Toledo Alday

**Dirigido por:** Isabel Goñi Echave e Iñaki García Arnáez

San Sebastián, Junio de 2023

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
2.1. TEJIDO ÓSEO Y REGENERACIÓN	5
2.2. OSTEOINTEGRACIÓN	6
2.3. IMPLANTES DENTALES DE TITANIO	8
2.4. MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN IMPLANTOLOGÍA DENTAL	10
2.4.1. MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS DE LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL	11
2.4.2. MODIFICACIONES FÍSICO-QUÍMICAS	11
2.4.3. MODIFICACIONES BIOQUÍMICAS	12
2.5. RECUBRIMIENTOS SOL-GEL	13
2.5.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO SOL-GEL	15
2.5.2. RECUBRIMIENTOS SOL-GEL SOBRE SUSTRATOS METÁLICOS	16
2.5.3. RECUBRIMIENTOS COMO MATRICES DE LIBERACIÓN DE AGENTES ACTIVOS	16
2.6. SIMVASTATINA COMO AGENTE ACTIVO	17
2.7. ANTECEDENTES DEL GRUPO	19
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIALES Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b>	<b>21</b>
4.1. MATERIALES	21
4.2. ACTIVACIÓN DE LA SIMVASTATINA	23
4.3. OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS	24
4.3.1. SÍNTESIS POR EL MÉTODO SOL-GEL	24
4.3.2. APLICACIÓN, SECADO Y CURADO DE LOS RECUBRIMIENTOS	25
4.4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	27
4.4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	27
4.4.1.1. Ensayo de adherencia	28
4.4.1.2. Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	28

4.4.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	29
4.4.2.1. FTIR/ATR	30
4.4.2.2. <sup>29</sup> Si-RMN	30
4.4.2.3. <sup>13</sup> C-RMN	31
4.4.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDROFILIA/HIDROFOBIA	31
4.4.4. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE SIMVASTATINA	32
4.4.5. ENSAYO DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>5.1. CARACATERIZACIÓN MORFOLÓGICA</b>	<b>35</b>
5.1.1. ENSAYO DE ADHERENCIA	35
5.1.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)	36
<b>5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA</b>	<b>36</b>
5.2.1. FTIR/ATR	36
5.2.2. <sup>29</sup> Si-RMN	38
5.2.3. <sup>13</sup> C-RMN	39
<b>5.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDROFILIA/HIDROFOBIA</b>	<b>40</b>
<b>5.4. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE SIMVASTATINA</b>	<b>41</b>
<b>5.5. ENSAYO DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSION</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se incorpora simvastatina como agente dopante en recubrimientos sol-gel de cara a desarrollar recubrimientos para implantes dentales de titanio con simvastatina en distintas proporciones. La simvastatina es un fármaco que se incorpora al sol-gel con el objetivo de conferir propiedades osteogénicas al implante para pacientes con una capacidad de regeneración ósea limitada como fumadores, personas de edad avanzada y diabéticos. Tras la caracterización físico-química de los recubrimientos sintetizados, y ensayos adicionales, con 0, 1, 3 y 5 % en peso de agente dopante, los resultados sugieren que el fármaco se integra correctamente en la red sol-gel y se liberan de forma controlada productos osteorregeneradores en un entorno acuoso, siendo factible la incorporación de hasta un 5 % en peso de simvastatina.

## 1. ABSTRACT

In the following study, simvastatin is incorporated as a doping agent in sol-gel coatings in order to develop coatings for titanium dental implants with simvastatin in different proportions. Simvastatin is a drug that is incorporated into the sol-gel with the aim of conferring osteogenic properties to the implant for patients with limited bone regeneration capacity such as smokers, the elderly and diabetics. After the physicochemical characterization of the synthesized coatings, and additional tests, with 0, 1, 3 and 5 % by weight of doping agent, the results suggest that the drug integrates correctly in the sol-gel network and osteoregenerative products are released in a controlled manner in an aqueous environment, being feasible the incorporation of up to 5 % by weight of simvastatin.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. TEJIDO ÓSEO Y REGENERACIÓN

En condiciones saludables, el tejido óseo presenta la propiedad de remodelación ósea dados los procesos de resorción y formación ósea (osteogénesis) regulados por la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, respectivamente. Sin embargo, ciertas lesiones o anomalías pueden dificultar la curación controlada por estos procesos naturales, provocando la necesidad de estrategias alternativas de regeneración ósea.

La pérdida de dientes es uno de los mayores problemas relacionados con la disminución de la calidad de vida. El éxito de los implantes dentales también depende de la correcta recuperación de los tejidos que rodean los dientes, incluyendo el hueso. Por ello, la regeneración ósea constituye uno de los principales focos en el campo de la odontología cuando hay que recurrir a la implantología dental (1).

Cuando surge un desequilibrio en la remodelación ósea por el incremento de la resorción, aparece la osteoporosis. Esta es una enfermedad ósea metabólica caracterizada por comprometer la densidad ósea y alterar su microarquitectura, lo que incrementa la fragilidad ósea y el riesgo de fractura (2). Cuando los osteoclastos se adhieren a los huesos, producen y secretan protones para reducir el pH del microentorno óseo y disuelven el mineral hidroxiapatita (3). La osteoporosis afecta a la mayoría de la población mundial, incluyendo todas las razas y sexos, siendo más frecuente en mujeres y edades avanzadas. La pérdida de estrógeno en mujeres menopáusicas causa osteoporosis como resultado de un aumento de la resorción del hueso trabecular (4). Entre los factores que aumentan las probabilidades de sufrir osteoporosis también se encuentran el bajo índice de masa corporal, la artritis reumatoide, la baja densidad mineral ósea (DMO), la deficiencia de vitamina D, el bajo consumo de calcio, la hipercifosis, el tabaquismo, el alcoholismo, el sedentarismo y el uso prolongado de ciertos medicamentos (5).

En este contexto, la osteoporosis es uno de los factores con más relevantes asociado al fracaso de los implantes dentales; otros factores son la edad del paciente, las características del implante, la calidad del hueso local, el procedimiento quirúrgico en sí mismo y otros factores posteriores a la curación incluyendo la peri-implantitis y la pérdida ósea progresiva (6).

## 2.2. OSTEOINTEGRACIÓN

La osteointegración en la intercara implante-hueso, es decir, la formación directa y estable de la conexión entre el hueso y el implante, juega un papel esencial en el éxito clínico de los implantes endoóseos. Este proceso conlleva tres etapas diferenciadas: la respuesta inflamatoria e inmunológica, la angiogénesis y osteogénesis.

En la figura 1 se esquematizan las diferentes etapas después de la implantación.

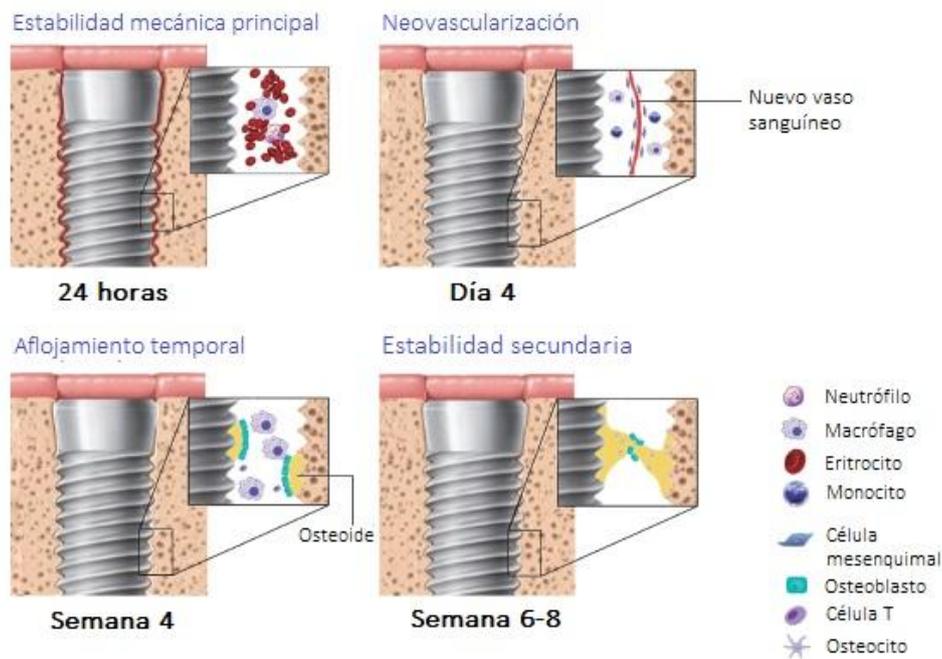


Figura 1. Evolución del proceso de osteointegración de un implante dental a lo largo del tiempo (7).

Una vez realizada la implantación, la superficie de titanio (cuando se emplean implantes de titanio) que contiene una capa de óxido, se pone en contacto con las proteínas plasmáticas, que absorbidas en la superficie del implante inmediatamente después de la implantación, forman una “película acondicionadora”. Existen diversos factores como la rugosidad superficial y la hidrofilia que son determinantes en lo que respecta a la adsorción de las proteínas y la subsecuente estimulación e inducción de la adherencia celular en la superficie del implante. La población celular que ocupa primero la superficie del implante está compuesta,

principalmente, por células inflamatorias. A esta fase de curación de los tejidos circundantes al implante se le conoce como la “respuesta inflamatoria inmunológica”.

Durante las 24 horas siguientes a la implantación, los neutrófilos abundan en el sitio del implante. De los 2 a 4 días siguientes, se incrementa el número de los macrófagos y monocitos que se infiltran en la separación alrededor del implante. Estos últimos son responsables de eliminar los residuos así como de secretar grandes cantidades de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan el reclutamiento de células mesenquimales, su proliferación, la angiogénesis y la deposición del colágeno.

Un proceso simultáneo e igualmente importante que tiene lugar durante la osteointegración es la formación de coágulos sanguíneos y estimulación de la futura angiogénesis. El primer día tras la implantación, se forman coágulos sanguíneos de forma adyacente a la superficie del implante, y la neovascularización se da durante las primeras 24 horas. Mientras los macrófagos y monocitos migran a la herida ósea hacia el cuarto día tras la implantación, los coágulos sanguíneos son gradualmente reemplazados alrededor de los recién desarrollados vasos sanguíneos por células mesenquimales en proceso de diferenciación, reclutadas desde la médula ósea. Estas células mesenquimales se diferencian en osteoblastos que, influenciados por factores de crecimiento y la topografía superficial, comienzan a adherirse a la superficie del implante y depositar matriz de colágeno. Al quinto o séptimo día tras la implantación, ya puede observarse la formación de hueso en el implante. Hacia la semana 4, se observa nueva formación de hueso sobre el implante (osteogénesis de contacto) que conecta con el hueso nuevo formado sobre el hueso del paciente (osteogénesis de distancia). Tras 8-12 semanas, la intercara alrededor del implante está completamente reemplazada por hueso lamelar maduro, completando así la fase inicial de la osteointegración (7).

Hay dos procesos a tener en cuenta para que se de la osteointegración: la osteoinducción y la osteoconducción. La osteoinducción (proceso mediante el cual se induce la osteogénesis) estimula las células indiferenciadas para desarrollar un linaje de células formadoras de hueso (8). Un material osteoconductor sirve como andamiaje para el crecimiento de los tejidos óseos. El potencial osteoconductor de una superficie depende de su rugosidad, microtopografía, nanotopografía y porosidad (9).

### 2.3. IMPLANTES DENTALES DE TITANIO

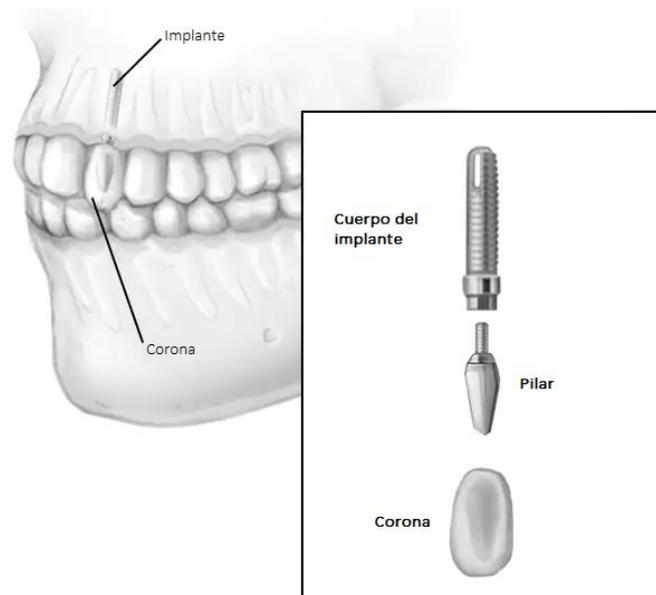
Como uno de los biomateriales más populares empleados para implantes, el titanio (Ti) ha sido ampliamente utilizado en ortopedia y odontología por sus excelentes propiedades mecánicas y su estabilidad bioquímica in vivo. Sin embargo, el principal problema de los implantes de titanio es su baja bioactividad o naturaleza bioinerte por la que carecen de la capacidad para promover el anclaje u osteogénesis en la intercara hueso-implante. No obstante, el resultado clínico del uso directo de implantes de Ti (sin introducir factores osteogénicos o de adhesión) parece ser aceptable. De hecho, los pacientes que gozan de una buena salud ósea ya disponen de los mecanismos para establecer la conexión que se requiere entre el implante y el hueso por procesos naturales de auto-reparación. Desafortunadamente, dichos implantes son más propensos al fracaso para pacientes fumadores o que sufren enfermedades metabólicas como la osteoporosis o diabetes, por ejemplo (10).

El éxito clínico de un implante dental está fuertemente relacionado con la osteointegración dentro de un corto período de tiempo. Para un éxito clínico temprano, es necesaria una buena velocidad de osteointegración de los implantes de titanio (11). Dichos implantes, además de ayudar a una correcta integración en los tejidos óseos, deberían promover la activación de los osteoblastos en estos tejidos, simulando la osteogénesis. Esto facilitaría la implantación quirúrgica en pacientes con una capacidad regenerativa limitada. Así, el diseño de los nuevos implantes dentales adaptados a pacientes con una capacidad de remodelación ósea limitada, deberían tener modificaciones superficiales que potencien la interacción biológica de los tejidos con el material del implante (12).

En ese contexto, los biomateriales juegan un papel muy importante. La definición de “biomaterial” se remonta al 1991, durante la segunda Conferencia de Consenso organizada por la Sociedad Europea de Biomateriales en Chester (UK). Concretamente, como resultado de la Conferencia de Consenso, un biomaterial se define como “un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”. Sin embargo, fue en el año 2009 cuando David F. Williams propuso definir esta palabra atendiendo a diferentes aspectos en función de los cuales se podrían asignar diferentes significados (13). Si bien el prefijo “bio” puede corresponder a algo que está vivo o que va a cobrar vida, también hay que reparar en el concepto de “material”, cuyo significado ha ido modificándose con el desarrollo de los materiales. De esta forma, Williams propuso definir

un biomaterial como una sustancia que ha sido diseñada para adoptar una forma que, sola o en un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier diagnóstico o procedimiento terapéutico, en la medicina humana o veterinaria. A pesar de la gran variedad de biomateriales de la que disponemos hoy en día, la validez de esta definición es aún innegable. No obstante, el creciente conocimiento de las interacciones interfaciales entre los biomateriales y sistemas biológicos y los continuos avances en procesos de síntesis y funcionalización de los biomateriales, han hecho del avance de los biomateriales uno de los desafíos clave en la investigación básica y avanzada en el sector de la biomedicina (14).

En cuanto a las modificaciones o tratamientos aplicados al implante para una mayor eficiencia en la osteointegración, conviene reparar primero en la estructura de un implante dental (figura 2).



*Figura 2. Estructura de un implante dental (15).*

Un implante dental está compuesto por las siguientes partes (15):

- **El tornillo de cobertura o cuerpo del implante:** Hace de raíz y sirve para sustentar la corona. Se integra en el hueso maxilar o mandibular, permaneciendo fijado y oculto.
- **Pilar transepitelial** (o de cicatrización): Es el fragmento que sobresale de la encía que hace que el implante y la corona se acoplen perfectamente, sosteniendo así la prótesis.
- **Corona dental o prótesis:** Es el componente que reviste el pilar y permanece visible en la cavidad oral, sustituyendo al diente perdido, realizando sus funciones, y adaptándose al implante osteointegrado. Generalmente, las coronas son de porcelana o zirconio.

Si bien los implantes dentales pueden modificarse por los tres componentes mencionados, en este trabajo sólo se contemplan las modificaciones en el cuerpo del implante, la parte que se integra en el hueso.

#### 2.4. MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN IMPLANTOLOGÍA DENTAL

El éxito a largo plazo de la terapia con implantes dentales no solo depende de una mayor estabilidad ósea; también hay que prestar atención al implante transmucoso o a la intercara entre el implante y su pilar. La estabilidad mecánica y biológica derivada del diseño y las superficies en este entorno de tejido conectivo y epitelio de unión son fundamentales para mantener un volumen suficiente de tejido conectivo que tenga un infiltrado inflamatorio mínimo. La inflamación crónica en esta región transmucosa, ya sea por los diseños, los materiales o la rugosidad de la superficie, puede conducir a la recesión del tejido a largo plazo e incluso a la periimplantitis años después de completar la terapia de reemplazo dental. Se han realizado esfuerzos en el desarrollo de biomateriales para implantes con el objetivo de mejorar el éxito clínico. Estas tecnologías han evolucionado desde una simple modificación de la superficie del implante hasta tecnologías precisas de modificación a nanoescala que involucran la formación de una tecnología uniforme y consistente que conduce a una respuesta celular alterada. Además, se están desarrollando tecnologías para utilizar cambios en la química de la superficie o incluso agregar productos biológicos a la superficie del implante para ayudar a la estabilidad del entorno tanto óseo como transmucoso (16).

Para lograr este propósito, hay que tener en cuenta una serie de factores entre los que destacan los cuatro factores más relevantes que afectan al contacto directo entre el hueso y el implante: el tratamiento superficial del implante, la topografía, la energía superficial y la biofuncionalización con moléculas activas (17).

---

#### 2.4.1. MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS DE LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL

Los métodos que modifican la morfología superficial de un implante, varían la rugosidad de esta superficie aumentándola. En diversos estudios se ha demostrado que las superficies rugosas aumentan la velocidad de fijación primaria y la estabilidad mecánica a largo plazo de la prótesis, favorecen la adhesión osteoblástica primaria, y mejoran considerablemente la producción de factores osteogénicos locales que aumentan la diferenciación celular en la superficie. Las técnicas más utilizadas para este tipo de modificación reciben el nombre de proyección por plasma de titanio (TPS), proyección de partículas (Grit-Blasting), ataque ácido y, por último, anonizado (17).

---

#### 2.4.2. MODIFICACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

Las características físico-químicas de un implante, tales como la energía superficial, la hidrofilia/hidrofobia o la composición de la superficie, son parámetros fundamentales que influyen en el comportamiento celular. Al igual que la rugosidad superficial, estos parámetros pueden modificarse para mejorar la adhesión en la intercara hueso-implante, tanto en el proceso de producción del implante, como mediante la síntesis de recubrimientos para su deposición sobre la pieza.

Las técnicas más utilizadas para la modificación físico-química de los implantes son principalmente, la proyección por plasma (*plasma spraying*), la pulverización catódica (*sputter deposition*), la deposición electroforética (*electrophoretic deposition*), la precipitación biomimética que intenta simular el proceso natural y consiste en la precipitación de cristales de

apatita biológica sobre el metal, a partir de fluidos biológicos simulados (FBS), y la obtención de recubrimientos mediante el proceso sol-gel (17). De esta última técnica se hablará más adelante, ya que es la elegida para el desarrollo del presente trabajo.

---

#### 2.4.3. MODIFICACIONES BIOQUÍMICAS

Este tipo de modificaciones ofrecen una alternativa a los dos tipos anteriores, y se basan en el entendimiento de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar en la adhesión, diferenciación y remodelación celular. El objetivo principal de estas técnicas, es el de crear superficies que estimulen estas respuestas celulares favorables cuando se implanta una prótesis, y para ello se inmovilizan en la superficie del implante, péptidos, factores de crecimiento, proteínas, enzimas y moléculas activas (fármacos) que estimulen las respuestas celulares específicas para una correcta osteointegración.

La inmovilización de estas moléculas se puede dar por diferentes métodos siendo los más utilizados, la adsorción física, la unión covalente y la liberación de moléculas bioactivas directamente en la intercara implante-hueso.

La adsorción física de moléculas como proteínas y factores de crecimiento, ha demostrado un aumento de la actividad osteoblástica en cuanto a adhesión, proliferación y diferenciación, en comparación con superficies no tratadas (18). Esta adsorción física o fisorción depende de las características superficiales del material a implantar (rugosidad, hidrofilia, carga superficial). Sin embargo, su mayor inconveniente es la falta de control en la desorción de las moléculas (19) y la excesiva velocidad de la misma. Por este motivo, la unión covalente es una opción más atractiva, siendo la unión de las moléculas a la superficie mucho más estable e irreversible.

Uno de los métodos de unión covalente más comunes es la silanización, técnica en la que se recubre la superficie del titanio con un silano que actúa como molécula puente entre la superficie del titanio y la biomolécula.

Dentro de las modificaciones bioquímicas, se encuentra la liberación de moléculas activas mediante su introducción en un recubrimiento que actúa como matriz de liberación. Estas matrices de liberación pueden ser poliméricas e hidrogeles tipo sol-gel, por ejemplo. Dichas

matrices se pueden funcionalizar con moléculas bioactivas, factores de crecimiento o fármacos que promuevan la osteointegración (17).

## 2.5. RECUBRIMIENTOS SOL-GEL

En términos generales, el proceso *sol-gel* se puede describir como la creación de una red inorgánica o híbrida (inorgánica/orgánica) a través de reacciones químicas a baja temperatura. Se trata de reacciones de condensación de los precursores moleculares en un medio líquido y formación de un *sol*, la gelificación del mismo y el secado mediante reacciones de condensación y evaporación del medio para formar un recubrimiento sólido, también llamado *xerogel* (17).

La técnica sol-gel ha sido muy utilizada durante las dos últimas décadas para preparar materiales híbridos funcionales enfocados a aplicaciones biomédicas. Entre las características que lo hacen interesante para el campo de los biomateriales, destacan la versatilidad del proceso sol-gel para recubrir diferentes superficies con morfología compleja, buena adhesión a muchos tipos diferentes de superficie, su biodegradabilidad y biocompatibilidad (20).

En función de la estructura química de los precursores, se pueden obtener materiales inorgánicos puros o híbridos:

- **Recubrimientos inorgánicos o recubrimientos de óxido de silicio:** Se obtienen a partir de alcóxidos de silicio tipo  $\text{Si}(\text{OR})_4$ .
- **Recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos:** Se obtienen por la incorporación de grupos orgánicos a la red inorgánica. Los más comunes son los obtenidos a partir de organoalcóxidos silanos,  $[\text{R}'_n \text{Si}(\text{OR})_{4-n}]$ . El grupo R de es una molécula orgánica unida al silicio mediante un enlace tipo Silicio-Carbono (-Si-C-). De este modo, variando el sustituyente orgánico, se varían también las propiedades del material final. Estos materiales híbridos combinan propiedades de los materiales inorgánicos puros y de los materiales orgánicos. Así, es posible obtener fácilmente una capa más gruesa que protegerá en mayor medida al metal de la corrosión, resultando en una capa más flexible y menos frágil (sin grietas) (17).

El proceso sol-gel se fundamenta en la hidrólisis y condensación de precursores metálicos. Consiste en la preparación de un sol (dispersión de partículas coloidales en un fluido), la gelificación del mismo y el secado del gel (sistema que tiene una fase líquida atrapada en una fase sólida que forma una red) para formar un sólido también llamado xerogel.

El proceso sol-gel se basa en dos reacciones básicas de hidrólisis y condensación. Es un proceso compuesto por varias etapas, tal y como indica la siguiente figura:

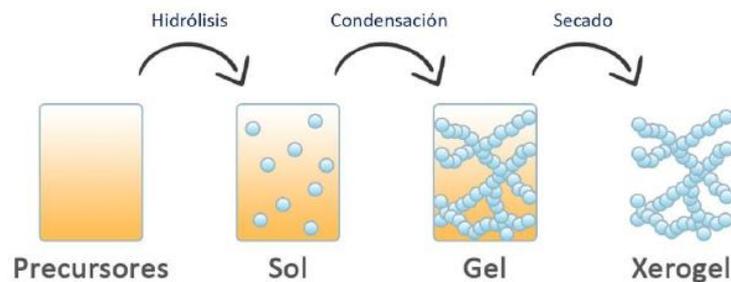
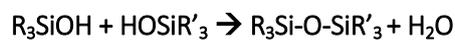


Figura 3. Etapas del proceso sol-gel (21).

- **Hidrólisis:** En esta reacción se hidroliza la cadena alcoxi de los alcóxidos de silicio en presencia de agua, generándose un silanol, con al menos un grupo OH.
- **Condensación:** Los grupos silanol se condensan, reaccionando unos con otros o con un grupo alcoxi, formando grupos siloxano (O-Si-O) y agua o alcohol como subproductos.

Las reacciones de hidrólisis y condensación se dan simultáneamente:



- **Gelificación:** Se produce la formación del gel o red tridimensional que atrapa el resto de la solución, aumentando considerablemente la viscosidad.
- **Envejecimiento:** Tras un determinado tiempo de reposo, se produce la evolución y contracción de la red (debido a la salida de líquido de sus poros)

mediante las reacciones de los grupos funcionales que permanecían en la misma.

- **Secado:** Se trata de la pérdida de agua, alcohol y otros componentes volátiles para dar lugar a una estructura porosa. Este proceso puede crear tensiones dentro del entramado por diferencia entre la velocidad de secado de las caras exteriores e interiores, produciéndose grietas superficiales en el material final.
- **Densificación:** Se obtiene tras la aplicación de un tratamiento térmico para favorecer el entrecruzamiento, mejorando las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural del material.

---

### 2.5.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO SOL-GEL

Los parámetros más importantes que influyen en el proceso sol-gel son el pH y la relación molar.

Las reacciones de hidrólisis y condensación anteriormente descritas, se dan utilizando un catalizador ácido o básico. Dependiendo de las condiciones de pH, el tipo de red que se forma puede variar. Con un catalizador ácido, la hidrólisis se da más lentamente, propiciando la formación de moléculas lineales que, entrecruzándose, resultan en una estructura compacta. Por otro lado, utilizando un catalizador básico, la hidrólisis se da rápidamente dando lugar a una red menos compacta, y por ende más porosa.

La relación agua:alcóxido es determinante en el proceso sol-gel, influyendo directamente en la velocidad de hidrólisis y condensación. Utilizando agua en mayor proporción a la necesaria, el alcóxido queda diluido y aumenta el tiempo de reacción. Por el contrario, con agua en menor proporción, la velocidad de hidrólisis es más baja y el sol no llega a gelificar. Además, en este último caso, el curado resulta complicado.

El ratio agua:alcóxido viene dado por el número de grupos hidrolizables presentes en el alcoxisilano utilizado como precursor. Así, para que la hidrólisis sea completa en el caso de utilizar un precursor con 4 grupos hidrolizables, la relación estequiométrica molar será 4 (21).

---

### 2.5.2. RECUBRIMIENTOS SOL-GEL SOBRE SUSTRATOS METÁLICOS

Como ya se ha mencionado previamente, una de las ventajas fundamentales de esta técnica es la capacidad de deposición de sol formado sobre sustratos con diferentes morfologías. En este trabajo se desarrolla un recubrimiento con la perspectiva de depositarlo sobre implantes dentales, por lo que su capacidad de adhesión sobre este tipo de sustrato metálico debe ser óptima.

Es así como la adhesión constituye un factor relevante a la hora de utilizar la reacción sol-gel para recubrir el sustrato metálico que compone el implante dental. Al recubrir el tornillo con la disolución sol-gel, se produce una interacción mediante puentes de hidrógeno entre los grupos silanol y el metal (los grupos hidroxilo MeOH de su superficie), que pasan a enlaces covalentes tras someter al material al tratamiento térmico de curado (17).

---

### 2.5.3. RECUBRIMIENTOS COMO MATRICES DE LIBERACIÓN DE AGENTES ACTIVOS

Otra de las estrategias más utilizadas, es la incorporación de biomoléculas en los recubrimientos sol-gel donde estos actúan como matriz de liberación. Dichos recubrimientos basan su actividad en la difusión de la molécula activa en el tiempo.

La difusión tiene lugar cuando los recubrimientos están en medio acuoso, mediante la degradación o erosión de la matriz que los contiene, o bien mediante la hidrólisis de los enlaces que lo unen a la matriz. Una de las ventajas de este tipo de recubrimientos, es su capacidad de liberación local. Estos materiales permiten también la incorporación de diferentes antibióticos para patógenos específicos asociados con las infecciones en implantes, disminuyendo los efectos adversos en otras zonas del organismo (17).

El método de síntesis sol-gel permite encapsular diferentes agentes activos que al ser liberados ejercen su acción de forma efectiva sin comprometer la biocompatibilidad y bioactividad del sistema. Es esta posibilidad de encapsulación la que se prueba en este trabajo, siendo el fármaco simvastatina el que se incorpora en un recubrimiento sol-gel, esperando que actúe como agente antirresortivo y osteogénico en el caso de colocar un implante dental sometido a esta modificación bioquímica.

## 2.6. SIMVASTATINA COMO AGENTE ACTIVO

La simvastatina pertenece al grupo de las estatinas, una clase farmacológica que se introdujo para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Actúan sobre la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG Co-A) reductasa, inhibiendo la síntesis de mevalonato y limitando su ruta metabólica e induciendo *upregulation* de los receptores LDL hepáticos, han demostrado que su eficacia bioquímica se acompañaba de una reducción en el desarrollo de episodios coronarios, tanto en prevención primaria como secundaria (22).

Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que su efecto no se limita a descender los niveles de lípidos plasmáticos, sino que como consecuencia de la inhibición de síntesis de ácido mevalónico, sustrato de otros compuestos isoprenoides, las estatinas tienen un amplio espectro de efectos pleiotrópicos, algunos no relacionados directamente con su efecto lipídico (23). Uno de los efectos que se ha puesto en evidencia es su acción sobre el hueso. Conociendo que las estatinas inhiben la HMG Co-A reductasa, disminuyendo la síntesis de mevalonato, por lo cual inhibiendo la formación de pirofosfato de geranilgeranilo (compuesto implicado en la biosíntesis del colesterol y necesario para la correcta función osteoclástica), son capaces de inducir la apoptosis en osteoclastos (24). Así, la apoptosis inducida por estatinas produce una intensa disminución de la resorción ósea.

Estableciendo de esta manera que no cabe duda sobre la existencia de una interrelación entre la resorción ósea y metabolismo lipídico, queda clara la aplicación de las estatinas como tratamiento antirresortivo. No obstante, en la búsqueda de tratamientos anabolizantes que aumenten de modo importante la masa ósea, las estatinas también cobran protagonismo. Casi secuencialmente a la descripción de su acción sobre los osteoclastos, Mundy describió que las estatinas producían un incremento de la transcripción del gen de la proteína ósea

morfogenética-2 (BMP-2) (25). Dicha proteína pertenece a la superfamilia del *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y es un factor de crecimiento que induce la proliferación, diferenciación y maduración de los osteoblastos (26).

En lo que respecta a la administración del fármaco en cuestión, ciertos investigadores señalan que la inyección subcutánea de estatinas en la región calvaria del ratón produce un incremento de un 30 %-60 % en la formación de hueso nuevo en menos de una semana de tratamiento. Por otro lado, la administración de simvastatina en la alimentación a ratas intactas, inmediatamente o bastante tiempo después de la ovariectomía, produce un incremento marcado del hueso cortical, trabecular (25 %-96 %) y perióstico asociado con aumentos en las tasas de formación ósea y aposición mineral, en paralelo con una marcada disminución del número de osteoclastos y la resorción ósea (25). De esta manera, dichos estudios señalarían una administración de la simvastatina, tanto oral como local, suficientemente eficaz en su acción osteorregeneradora. La baja solubilidad del fármaco en agua, de forma similar al resto de estatinas, limita su biodisponibilidad y por ello, considerar la administración local resulta una alternativa más atractiva. Con el objetivo de mejorar su absorción en el tracto gastrointestinal, otros estudios proponen el empleo de nanoemulsiones de simvastatina donde esta permanece encapsulada en nanoesferas hidrosolubles (27) o la utilización de microesferas de ácido poliláctico (PLA) como vehículo del fármaco (28).

En el intento de esclarecer si los efectos de la simvastatina son primarios o mediados por su acción sobre el metabolismo lipídico, investigadores de la Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford señalan sus efectos beneficiosos en el tratamiento contra la esclerosis múltiple demostrando que su acción es independiente del colesterol (29). Poniendo así en evidencia la versatilidad de la simvastatina, este fármaco abre una infinidad de líneas de investigación con prometedoras aplicaciones. Entre ellas, es su función antirresortiva y osteorregeneradora la protagonista en este trabajo, utilizando este fármaco como molécula activa que se libera desde una matriz constituida por un hidrogel tipo sol-gel. De esta forma, recubriendo un implante dental con este sol-gel conteniendo la simvastatina, dicho fármaco actuaría de forma local influyendo positivamente en la osteointegración.

Desde que se comenzaron a explorar las diferentes vías que abrió la simvastatina como un fármaco con efectos pleitrópicos aún por determinar, numerosos estudios han incorporado este agente activo en recubrimientos con el objetivo de sacar partido a su acción sobre el hueso, de forma similar al estudio aquí expuesto.

Un estudio sobre aplicaciones para implantes ortopédicos determinó que integrando simvastatina en un composite de hidroxiapatita y  $\epsilon$ -caprolactona para recubrir una aleación de magnesio por electrohilado, se consigue una excelente bioactividad, induciendo biomineralización observada *in vitro*. La simvastatina jugó un papel determinante en esta investigación por el que demostró retrasar la degradación de la superficie metálica y mejorar la proliferación de los osteoblastos (30).

En otra aplicación de la simvastatina, se probó que dicho fármaco inducía una diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano como agente dopante de un hidrogel de alginato en andamiajes cerámicos de  $\text{TiO}_2$  (31).

## 2.7. ANTECEDENTES DEL GRUPO

Nuestro grupo de investigación ha trabajado durante los últimos 10 años en aspectos relacionados con la regeneración ósea en el entorno de implantes, específicamente implantes dentales. La actividad investigadora se ha centrado en la obtención de recubrimientos a partir de la técnica sol-gel para ser aplicados sobre los implantes dentales y poder lograr una mejora en su osteointegración. Así destacan los trabajos publicados con distintos tipos de alcoxisilanos: recubrimientos híbridos a partir de tetraetoxisilano (TEOS) y viniltrietoxisilano (VTES), y de metiltrimetoxisilano (MTMOS) y TEOS. Entre los recubrimientos utilizados es reseñable el uso de formulaciones que incorporaban el 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS): aquellos sintetizados a partir de MTMOS y GPTMS, y otros basados en MTMOS, TEOS y GPTMS. Este último, el GPTMS, es uno de los más empleados en el desarrollo de materiales híbridos y se utiliza cada vez más en la ingeniería de tejidos óseos ya que tiene un anillo epoxi en su estructura que permite funcionalizar el biomaterial y modificar sus propiedades fisicoquímicas. Además, este anillo susceptible a un ataque nucleófilo facilita la incorporación de moléculas orgánicas, como pueden ser los principios activos osteogénicos, en la red mediante enlaces covalentes. No obstante, a pesar de los prometedores resultados *in vitro* obtenidos en nuestro grupo y tras haber dopado el recubrimiento con sales de Sr y Ca, investigaciones realizadas posteriormente concluyeron que altas concentraciones de GPTMS mostraban un efecto inflamatorio que podría perjudicar la biocompatibilidad de los recubrimientos. En el estudio proteómico se observó una mayor afinidad de las proteínas relacionadas con el sistema del complemento cuanto mayor era el porcentaje de GPTMS. La adsorción significativamente

mayor de la ficolina-2 (FCN2) y de la proteína C-reactiva (CRP), dos activadores principales de distintas vías del complemento (de lectinas y clásica, respectivamente), muestra que esta formulación tiene un mayor potencial para desencadenar una mayor respuesta inflamatoria. En un intento de evitar la señalización de inflamación de los recubrimientos base utilizados para realizar la liberación controlada de distintos iones y moléculas, se probó la formulación con una relación molar de MTMOS del 70 % y de TEOS del 30 %, que mostró resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vitro* presentaron una mayor proliferación y mineralización para este recubrimiento, mientras que los ensayos *in vivo* manifestaron que dicho recubrimiento parece mejorar la capacidad de regeneración ósea ya que se da una formación más temprana de nuevas espículas óseas. Además, los parámetros de respuesta del organismo frente a un cuerpo extraño estudiados, como el estado de la médula ósea, la presencia de células gigantes y la evolución de la cápsula fibrosa, demostraron la biocompatibilidad de los materiales desarrollados y su potencial uso en terapia dental (21).

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar nuevos recubrimientos sol-gel, que incorporen diferentes porcentajes de simvastatina.

Para conseguir este objetivo, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

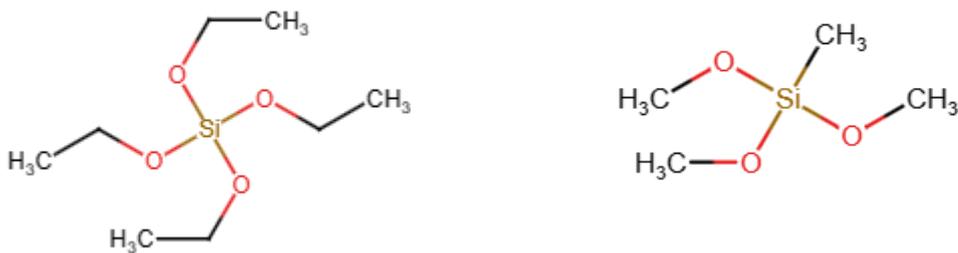
- Sintetizar recubrimientos híbridos sol-gel 7M:3T (formulación con la relación molar de MTMOS del 70 % y de TEOS del 30 %) con porcentajes de 1, 3 y 5 % de simvastatina respecto a los precursores.
- Comprobar la correcta integración del fármaco en la red sintetizada mediante las siguientes técnicas experimentales:
  - Caracterización morfológica
    - Ensayo de adherencia
    - Caracterización mediante Espectroscópica Electrónica de Barrido (SEM)
  - Caracterización química
    - Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio ( $^{29}\text{Si}$ -RMN)
    - Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN)
    - Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

- Caracterizar los recubrimientos mediante las siguientes técnicas experimentales:
  - Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia
  - Ensayo de liberación de simvastatina
  - Ensayo de degradación hidrolítica

## 4. MATERIALES Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

### 4.1. MATERIALES

Los precursores seleccionados para formar la red polisiloxánica son el metiltrimetoxisilano (MTMOS, Sigma-Aldrich) y el tetraetoxisilano (TEOS, Sigma-Aldrich). En la figura 4 se muestra la estructura molecular de cada uno de ellos.



*Figura 4. Estructura molecular del precursor TEOS (izquierda) y MTMOS (derecha).*

El MTMOS es un silicato orgánicamente modificado con tres grupos alcoxi y un grupo funcional orgánico (metilo) que permanece intacto tras la síntesis. La importancia de éste radica en que mejora la biocompatibilidad del sistema. Por otro lado, el TEOS es un ortosilicato altamente hidrófilo con cuatro grupos alcoxi que favorecen la degradación de la red siloxánica creada y, por tanto, la liberación de silicio del material.

Se selecciona el recubrimiento con una relación molar de MTMOS del 70 % y de TEOS del 30 % porque en estudios previos, como se ha mencionado anteriormente, se ha comprobado que promueve el proceso de osteointegración, ya que es en este recubrimiento donde se observa mayor diferenciación de las células madre mesenquimales a células óseas (32). Se añade

simvastatina (Sigma-Aldrich) a las formulaciones en distintas proporciones, como se ha comentado anteriormente.

Se han sintetizado recubrimientos híbridos cargados con 1, 3 y 5 % en peso de simvastatina (figura 5).

Nomenclatura	% Simvastatina
7M:3T	-
7M:3T-1SIM	1
7M:3T-3SIM	3
7M:3T-5SIM	5

*Figura 5. Formulaciones utilizadas y nomenclatura de las mismas.*

Los materiales se han obtenido como recubrimientos sobre distintos sustratos o como film libre, en función del tipo de ensayo de caracterización a realizar. Los sustratos utilizados fueron los siguientes:

- Placas de acero inoxidable 316L (50 mm x 50 mm), suministradas por Ramón Navarrete Soria S.A.
- Moldes de teflón ( $\varnothing = 50$  mm y 2.2 mm de profundidad), proporcionados por Mecanizados Suguz S.L.U.
- Discos de titanio cpTi, grado IV ( $\varnothing = 12$  mm, y 1.2 mm de espesor), suministrados por GMI-Ilerimplant S.L.

## 4.2. ACTIVACIÓN DE LA SIMVASTATINA

La simvastatina es un tipo de estatina que existe en dos formas: hidroxilácido o lactona. *In vivo*, la forma hidroxilácida constituye una droga activa que reduce los niveles de colesterol plasmático, mientras que la forma lactona permanece inactiva (profármaco). La forma lactona de las estatinas puede absorberse en el tracto gastrointestinal y ser transformada a su forma activa.

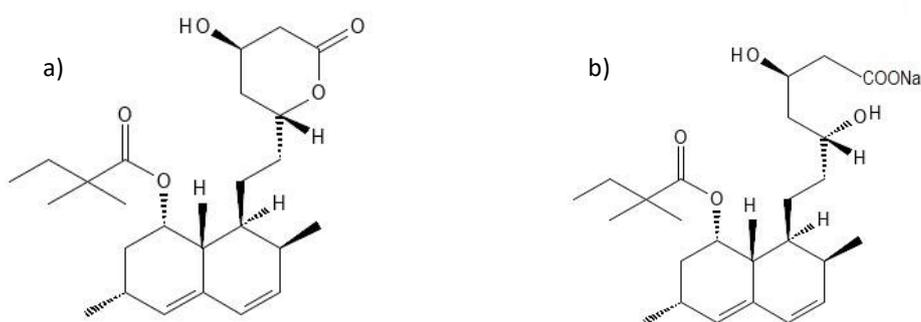
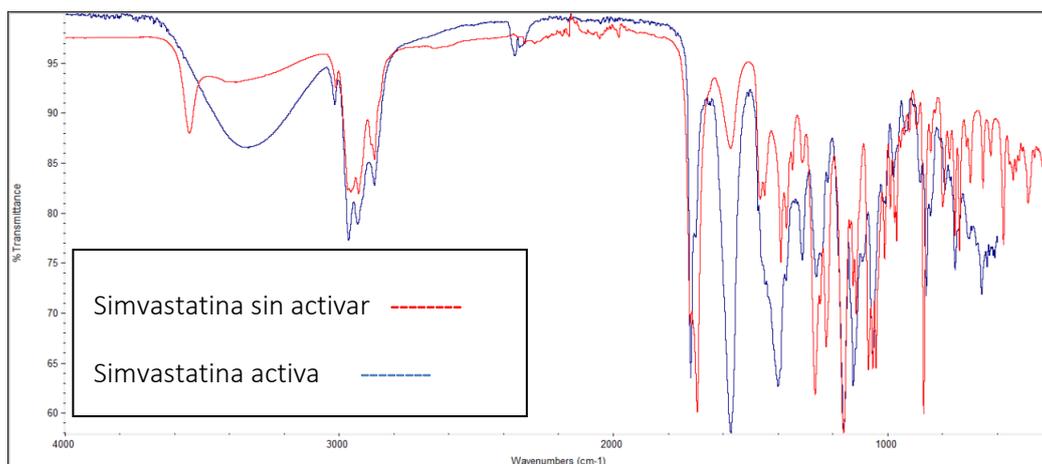


Figura 6. Estructura química de la simvastatina inactiva a) y activa b).

La simvastatina incorporada al recubrimiento debe estar en su forma activa para ejercer su función regenerativa. Para ello, se requiere un procedimiento de activación farmacológico (33) detallado a continuación:

1. Se mezclan un gramo de simvastatina, 20 mL de una disolución de etanol (50 mg/mL) y 16,26 mL de una disolución de NaOH (1N). Con agitación, se calienta la mezcla a 50°C durante 2 horas. En este paso, la disolución pasa de ser opaca y blanca a transparente e incolora.
2. La disolución se acidifica con HCl (1N) hasta un pH de 7.3, aproximadamente. Luego, la muestra se liofiliza tras congelarla previamente con nitrógeno líquido. Una vez liofilizada, se obtiene una esponja blanca quebradiza.
3. Se añaden 30 mL de etanol puro y se lleva al rotavapor a 120 r.p.m. a 45-50°C.
4. Conservar en viales dentro de un desecador.

La comprobación de dicha activación se realiza mediante espectroscopía infrarroja.



**Figura 7. Espectros de simvastatina inactiva y simvastatina activa.**

En el espectro de la simvastatina inactiva se puede observar la presencia de una banda a  $3553\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de tensión del enlace O-H, bandas a  $3011$ ,  $2959$  y  $2872\text{ cm}^{-1}$  asociadas a las vibraciones de tensión del grupo éster y grupo carbonilo de la lactona. La diferencia fundamental con el espectro de la simvastatina activa se encuentra en la banda que aparece a  $1580\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde al carboxilo del grupo ácido formado tras la apertura del anillo y la intensificación y desplazamiento de la banda del enlace O-H (34).

### 4.3. OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS

#### 4.3.1. SÍNTESIS POR EL MÉTODO SOL-GEL

Para obtener el recubrimiento base se ha preparado una disolución de los precursores en isopropanol (Sigma-Aldrich) con una relación en volumen alcohol: precursor 1:1. La elección de este disolvente se debe a que se mejora la miscibilidad entre los precursores ya que estos son insolubles en agua.

Esta mezcla se mantiene en agitación constante (300 r.p.m.) mientras se le añade, gota a gota, la cantidad estequiométrica necesaria de agua para que se produzca la hidrólisis de los grupos alcoxi presentes en los precursores empleados. El agua se añade acidificada hasta pH 1, mediante la adición de  $\text{HNO}_3$  (Sigma-Aldrich), con el fin de catalizar la reacción. En el caso de los recubrimientos que incorporan simvastatina, debido a que esta molécula puede captar

protones, se aumenta la cantidad de agua acidificada, hasta el doble de la cantidad estequiométrica, para asegurar la hidrólisis de los precursores.

La agitación se mantiene durante 1 h para permitir la completa hidrólisis de todos los grupos y, a su vez, comienzan a darse las diferentes reacciones de condensación. Transcurrido este tiempo, se detiene la agitación y se mantiene 1 h en reposo para que el sistema se estabilice, continúen las reacciones de condensación y se dé la gelificación. Estos tiempos de reacción, así como los de reposo han sido fijados en base a estudios previos (35).

Los recubrimientos dopados con simvastatina se sintetizan siguiendo la metodología descrita anteriormente, pero con un paso previo. En este caso, la cantidad requerida (1, 3 y 5 % en peso de simvastatina respecto a los silanos) se disuelve en el isopropanol, en agitación durante 15 minutos.

---

#### 4.3.2. APLICACIÓN, SECADO Y CURADO DE LOS RECUBRIMIENTOS

Una vez realizada la síntesis, el sol obtenido bien se deposita sobre el sustrato seleccionado para poder obtener el recubrimiento o bien se vierte sobre un molde de teflón para la obtención de la película libre.

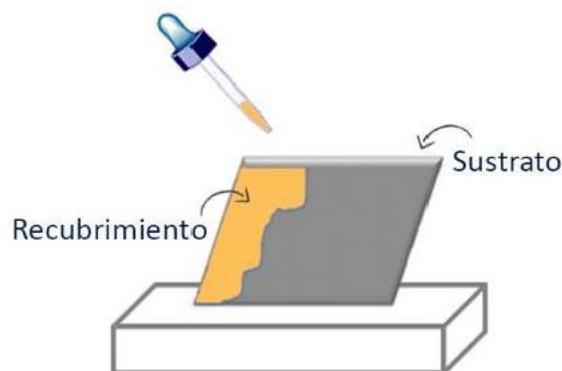
Todos los sustratos requieren un pretratamiento antes de depositar el sol sobre ellos. Cada uno de ellos se basa en un protocolo diferente:

- A las placas de acero inoxidable 316L se les realiza un tratamiento superficial mediante desbastado con papel de lija de grano 220, en cuatro direcciones en forma de cruz y aspa, con el fin de aumentar la adherencia del recubrimiento. Posteriormente, se limpian en repetidas ocasiones, primero con agua destilada y jabón y por último con acetona para eliminar los posibles restos orgánicos. Se secan al aire y se guardan en un lugar limpio y seco hasta su uso.
- Los moldes de teflón se limpian con agua destilada y acetona para eliminar posibles impurezas.
- Los discos de titanio fueron proporcionados libres de impurezas y esterilizados por radiación UV. Estos tienen una topografía heterogénea como resultado de un

pretratamiento de la superficie con la técnica combinada de granallado con partículas de óxido de aluminio de 4  $\mu\text{m}$  y un ataque ácido sumergiendo los discos en ácido sulfúrico durante 1 h, con el objetivo de simular los tratamientos aplicados sobre implantes dentales. Todos los discos fueron posteriormente lavados con ultrasonidos en acetona, etanol y agua purificada (18.2  $\Omega$ ) sucesivamente (20 min en cada baño); y finalmente secados a vacío. Están dispuestos en un embalaje de 10 unidades y se mantienen así hasta el momento de recubrirlos.

Tras preparar la superficie de los diferentes sustratos, se procede a depositar el sol sobre ellos utilizando la técnica “flow-coating” para recubrir las placas y “dip-coating” para los discos.

- En la técnica de “flow-coating” el sol se vierte con una pipeta Pasteur de forma continua sobre la superficie que se encuentra inclinada 45° respecto a la horizontal, tal y como se muestra en la figura 7. El proceso se repite 3 veces para asegurar que toda la superficie ha sido recubierta.

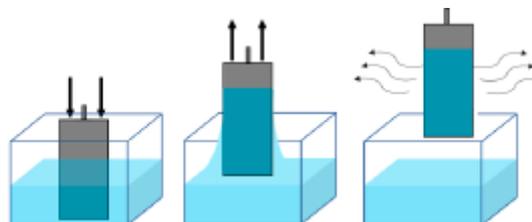


*Figura 1. Técnica de deposición “flow-coating” (21).*

El espesor del recubrimiento depende de la inclinación del sustrato, de la viscosidad del sol y de la velocidad de evaporación del disolvente. Una ventaja de este método es que se pueden recubrir sustratos grandes fácilmente, sean planos o no. Por otra parte, un inconveniente es que el espesor del recubrimiento no es uniforme (36).

- La técnica “dip coating” consiste en sumergir el sustrato en un recipiente conteniendo un líquido, controlando la velocidad con la que se sumerge, el tiempo que permanece sumergido y la velocidad de retirada (figura 8). En este caso se ha utilizado un dip-coater ND-DC 11/1 150 (Nadetech Innovations S.L.). Esta técnica se ha utilizado para recubrir los discos. Estos sustratos se introdujeron en el sol a una velocidad de

inmersión de 60 mm/min, se mantuvieron en la solución durante 1 minuto y finalmente se retiraron a una velocidad de extracción de 100 mm/min.



*Figura 8. Técnica de deposición "dip-coating" (37).*

- Para obtener una película libre, se vierten 3 mL de sol-gel sobre un molde de teflón antiadherente, obteniéndose films de bajo espesor.

Una vez depositado el sol sobre el sustrato seleccionado o vertido sobre el molde de teflón, se hace un tratamiento térmico de curado en estufa con el objetivo de promover las reacciones de condensación y la eliminación de los disolventes de la red (agua, alcohol...), dándose las etapas de secado y densificación. Los sustratos se introducen en la estufa a 80 °C, durante 2 h. De esta manera, la red se hace más densa y solidifica.

## 4.4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

### 4.4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La morfología de un recubrimiento sol-gel juega un papel crucial en el que se ven involucrados la adherencia, rugosidad y uniformidad del recubrimiento. Es por ello que se caracteriza la morfología de cada recubrimiento (7M:3T, 7M:3T-1sim, 7M:3T-3sim y 7M:3T-5sim) mediante ensayos de adherencia y caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

#### 4.4.1.1. ENSAYO DE ADHERENCIA

El ensayo de adherencia llevado a cabo consiste en medir el grado en que cada recubrimiento se desprende de una placa de acero inoxidable, cuya superficie ha sido previamente tratada, al retirar una porción de cinta adhesiva.

La técnica empleada para llevar a cabo este ensayo recibe el nombre de “corte por enrejado”. La norma ISO 2409 determina que hay que colocar la placa recubierta sobre una superficie plana y rígida, y realizar 2 cortes en cuadrícula, empleando una cuchilla, y ejerciendo una presión uniforme que sea necesaria y suficiente para alcanzar el material del soporte sin dañarlo excesivamente. En este caso se ha utilizado una cuchilla de paso de 2 mm con 6 cortes (Neurtek Instruments S.A.). Posteriormente, se cepilla la zona ensayada con una brocha suave 5 veces en cada sentido de cada diagonal de la cuadrícula. A continuación, se pega una tira de cinta adhesiva sobre la cuadrícula, presionando firmemente sobre ella, se despega después de 90 s tirando rápidamente del extremo no adherido con un ángulo lo más aproximado a 180°. Finalmente, se observa la superficie y se compara su aspecto con el esquema de la figura 9 para determinar el grado de adherencia.

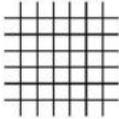
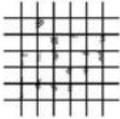
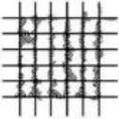
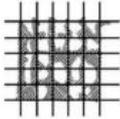
Apariencia					
Desprendimiento	0 %	<5 %	<15 %	<35 %	<65 %
Clasificación	0	1	2	3	4

Figura 9. Clasificación según la norma ISO 2409 (21).

#### 4.4.1.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

En términos generales, un equipo de SEM (figura 10) es capaz de tomar una “imagen” de la muestra aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones llamados primarios), en vez de registrar fotones propiamente dichos (como en la microscopía óptica). Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales que son registradas en los diferentes detectores del

equipo, en donde cada una de dichas señales ofrece independientemente información acerca de la topografía, composición y hasta conductividad eléctrica de la muestra. En términos de lo que se puede estudiar con SEM, se resume en información topográfica, morfológica, de composición química, de cristalografía (estructura y orientación de grano) y de dinámica de reacciones (experimentos in situ) (38).

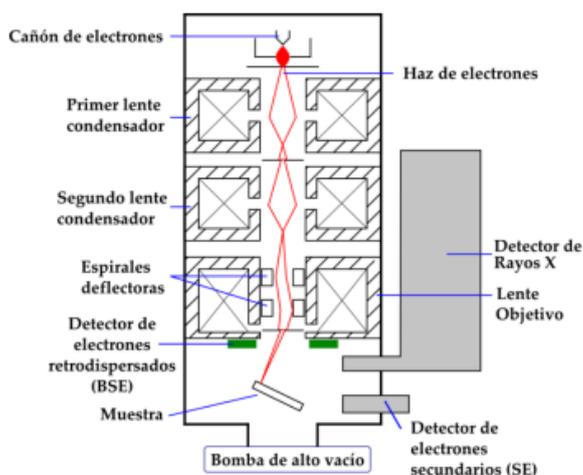


Figura 10. Esquema de un equipo SEM (38).

En el caso de los materiales no conductores, como los polímeros, se precisa recubrir la muestra a analizar con un material conductor (etapa de dorado). En este pretratamiento se generan muestras conductoras depositando sobre ellas una fina capa de oro utilizando un Sputter Coater (BALTEC SCD500).

Se utiliza un Microscopio de Barrido Electrónico (Leica-Zeiss LEO 440) adquiriendo las imágenes a un voltaje de 15 kV.

#### 4.4.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los materiales se caracterizaron químicamente mediante dos técnicas: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR) y Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio ( $^{29}\text{Si}$ -RMN) y del átomo de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) en estado sólido. Para la FTIR/ATR y para la RMN en estado sólido, se ha utilizado el film libre pulverizado.

---

#### 4.4.2.1. FTIR/ATR

Con la espectroscopia FTIR/ATR se puede estudiar la red siloxánica formada en los recubrimientos base y en los dopados. Aquí, el recubrimiento hecho polvo se coloca en el accesorio de ATR del equipo (Nicolet 6700 FT-IR). Los espectros se obtienen por transmisión en el intervalo 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  (correspondiente a la región del infrarrojo medio).

---

#### 4.4.2.2. $^{29}\text{Si}$ -RMN

La espectroscopia de RMN del átomo de silicio se emplea para estudiar el grado de entrecruzamiento de la película final.

Mediante  $^{29}\text{Si}$ -RMN en estado sólido se caracteriza la estructura final del recubrimiento tras el curado. El análisis se realizó en espectrómetro Bruker AVANCE NEO 500 equipado con una sonda BBOF con gradientes en el eje Z. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente, empleando una secuencia CPMG con un filtro de T2 de 5 ms, para poder eliminar las señales provenientes del tubo. La frecuencia de  $^{29}\text{Si}$  empleada fue 99.362 MHz. Se registraron 71K puntos con una ventana espectral de 17857 Hz, tiempo de adquisición de 1 s y tiempo de espera de 20 s.

Para la identificación de las diferentes especies que se forman, se emplea el sistema de anotación desarrollado por Lippmaa *et al* (39). A los átomos de silicio se les denomina Q o T en función del número de átomos de oxígeno a los que estén unidos, esto es, Q si está unido a cuatro (como en el caso del TEOS) y T si lo está a tres (MTMOS). Del mismo modo, a cada letra (Q o T) se le añade un subíndice que indica el número de átomos de oxígeno que a su vez están unidos a otro átomo de silicio, por lo tanto, este muestra el número de formaciones siloxano respecto de cada átomo de silicio. Por consiguiente, las especies con un grado mayor de condensación serán aquellas con el subíndice más alto.

Para las estructuras  $T_n$  se esperan desplazamientos químicos entre -40 y -80 ppm y para las estructuras  $Q_n$  entre -80 y -120 ppm. Las especies con mayor grado de condensación presentan un desplazamiento químico a valores más negativos (40).

Dada la estructura química de los precursores empleados (figura 4), las posibles estructuras que pueden coexistir durante el proceso sol-gel son las siguientes:

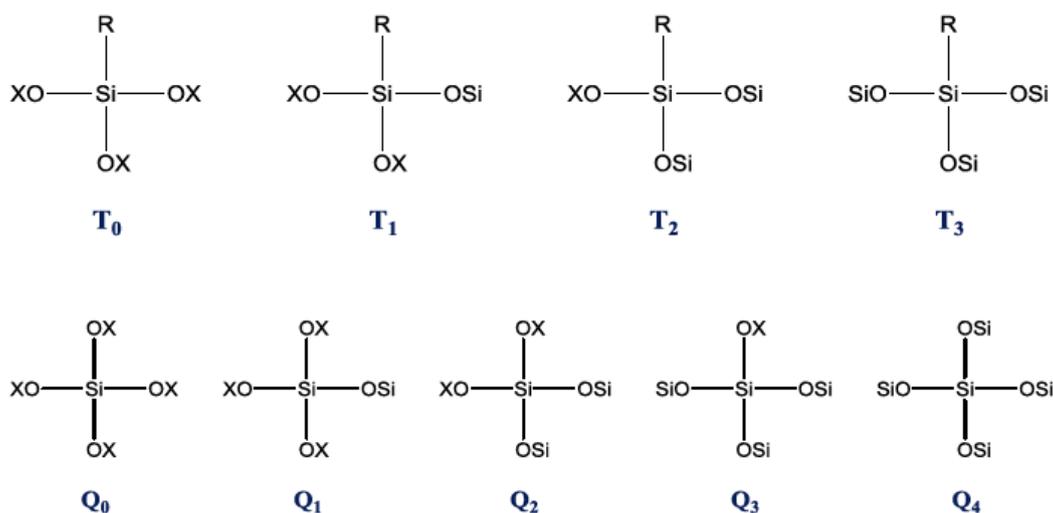


Figura 11. Estructuras que pueden coexistir durante el proceso sol-gel (21).

#### 4.4.2.3. <sup>13</sup>C-RMN

Al igual que la técnica de <sup>29</sup>Si-RMN en sólido nos da información acerca de los enlaces con silicio existentes en los recubrimientos, el <sup>13</sup>C-RMN aporta información sobre los enlaces que hay establecidos con el átomo de carbono.

#### 4.4.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDROFILIA/HIDROFOBIA

Algunos estudios afirman que las superficies hidrófilas dan mejores resultados en la adsorción de proteínas, adhesión y diferenciación celular que las hidrófobas (41). No obstante, esta afirmación se contradice con los resultados obtenidos en otras investigaciones donde la proliferación de los osteoblastos se ve favorecida en superficies hidrófobas (42).

La medida comparativa de la hidrofilia/hidrofobia de los distintos films obtenidos se determina mediante la medida del ángulo de contacto que se forma entre una gota de agua ultrapura y el recubrimiento estudiado. Una superficie hidrófoba es aquella donde el ángulo de contacto

entre la gota y la superficie del sustrato es mayor de 65°. Por el contrario, si el ángulo de contacto es menor de 65°, se considera una superficie hidrófila (43).

Para ello se recubren discos de titanio de 12 mm con cada una de las formulaciones. Se emplea un goniómetro (Dataphysics OCA 20) que cuantifica el ángulo formado entre el perímetro de la gota dispensada y el recubrimiento. Como líquido se utiliza agua milli-Q y las gotas se forman aplicando una dosificación media de 1 µL/s y un volumen de gota de 10 µL. Las medidas se realizan con ayuda del software SCA20 a temperatura ambiente y exactamente 10 s después de la deposición de la gota sobre el recubrimiento. Se emplean 5 discos por recubrimiento depositando 2 gotas en cada uno. Se mide tanto el ángulo derecho como el izquierdo (figura 12), de forma que para cada recubrimiento se obtienen 20 medidas.

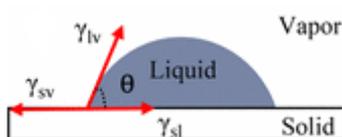
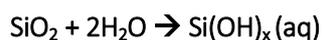


Figura 12. Esquema del ángulo de contacto entre una gota y una superficie (44).

#### 4.4.4. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE SIMVASTATINA

Mediante el estudio de liberación se cuantifica la simvastatina liberada de los recubrimientos dopados en un entorno acuoso. El objetivo es determinar si dicha liberación se produce de manera controlada en los recubrimientos 7M:3T-1SIM, 7M:3T-3SIM y 7M:3T-5SIM depositados en unos discos de titanio.

En entorno acuoso, se produce la degradación hidrolítica del recubrimiento según la siguiente reacción de hidrólisis:



Con esta reacción, la simvastatina que permanecía integrada en la red se libera y pasa de formar parte del recubrimiento depositado en el sustrato a estar disuelta en la disolución, pudiéndose detectar mediante el proceso detallado a continuación.

El ensayo se realiza utilizando tres discos de titanio de 12 mm con cada una de las formulaciones. Los discos se introducen individualmente en un bote con 4 mL de *buffer* fosfato salino (PBS), una solución acuosa y salina muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Se recogen muestras a las 2, 4, 8, 24, 48, 72, 168, 336, 504 y 672 horas desde que se introducen los discos en la disolución, manteniéndolos siempre a una temperatura constante de 37°C (simulando la temperatura fisiológica). Las muestras se llevan a un espectrofotómetro de único haz Helios Omega UV-vis (Thermo Scientific) donde se mide la absorción a 238 nm, longitud de absorción máxima de la simvastatina (45).

La técnica experimental empleada para la cuantificación de la simvastatina es la espectrofotometría UV-vis y consiste en determinar la concentración mediante su absorbancia en el rango de 190-400 nm que abarca el espectro UV. El cálculo se realiza siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc$$

donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (unidades:  $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $b$  es la longitud de la sección que atraviesa la luz (unidades: cm) y  $c$  es la concentración de la molécula que absorbe la luz a la longitud de onda que se haya establecido (46).

Previamente a realizar este estudio, se realiza un calibrado con disoluciones patrón de simvastatina en PBS a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Estableciendo la longitud de onda a 238 nm, se obtiene la siguiente curva de calibrado:

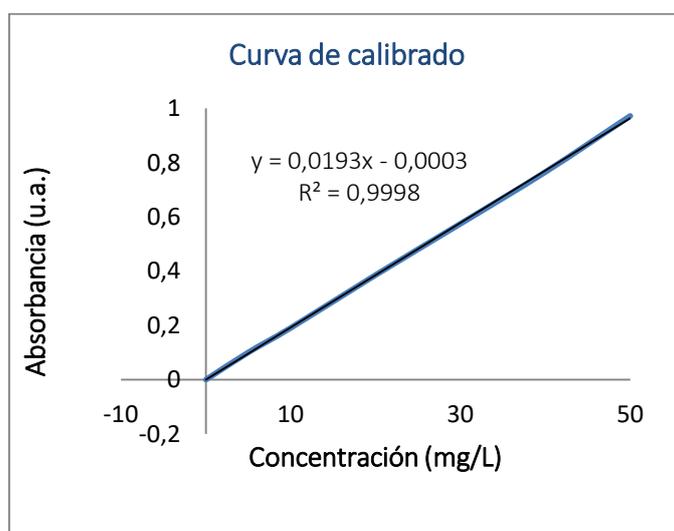


Figura 13. Curva de calibrado para el ensayo de liberación.

#### 4.4.5. ENSAYO DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

Como se ha mencionado anteriormente, el sol-gel se degrada hidrolíticamente en entorno acuoso. Dada la correspondiente reacción de hidrólisis, dicha degradación se traduce en liberación de silicio, la cual ha demostrado ejercer una acción osteorregeneradora tras ser absorbido en el organismo (47).

Estudiando la degradación hidrolítica de los recubrimientos sintetizados, se analiza paralelamente la liberación de los correspondientes productos de hidrólisis basados en sílice con actividad osteogénica. Para ello, se sumergen individualmente 3 discos de titanio de 12 mm de cada formulación en 2 mL de PBS, reservándolos en botes perfectamente cerrados y sellados. Manteniendo una temperatura constante de 37 °C, se recogen muestras a 1, 2, 3 y 4 semanas. Las muestras extraídas se diluyen 20 veces y se conservan a 5°C. El análisis cuantitativo se realiza mediante espectroscopía de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Esta es una técnica analítica ampliamente utilizada para medir elementos traza en fluidos biológicos que destaca por su alta sensibilidad, además de permitir analizar muestras con volumen reducido (48).

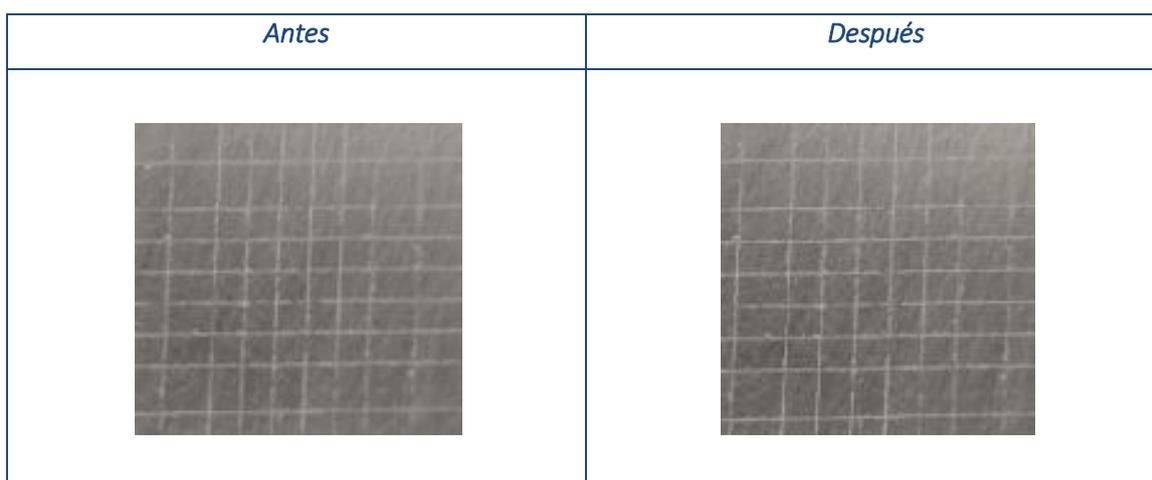
El equipo utilizado (Horiba Jobin Yvon, Activa) tiene un nebulizador concéntrico de cuarzo Meinhard, una cámara de pulverización de tipo Scott y una conexión de vaina de cuarzo estándar entre la cámara de pulverización y la antorcha.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

#### 5.1.1. ENSAYO DE ADHERENCIA

Tras someter los diferentes recubrimientos sintetizados al “corte por enrejado”, siguiendo los pasos establecidos por la norma ISO 2409, se obtiene que los resultados no difieren entre sí. De esta manera, dado que el desprendimiento en todos los casos fue del 0 %, cada recubrimiento corresponde a la clasificación 0. Tal y como puede observarse en la figura 14, el desprendimiento del recubrimiento tras retirar la cinta adhesiva es inapreciable, observación común al resto de los recubrimientos.

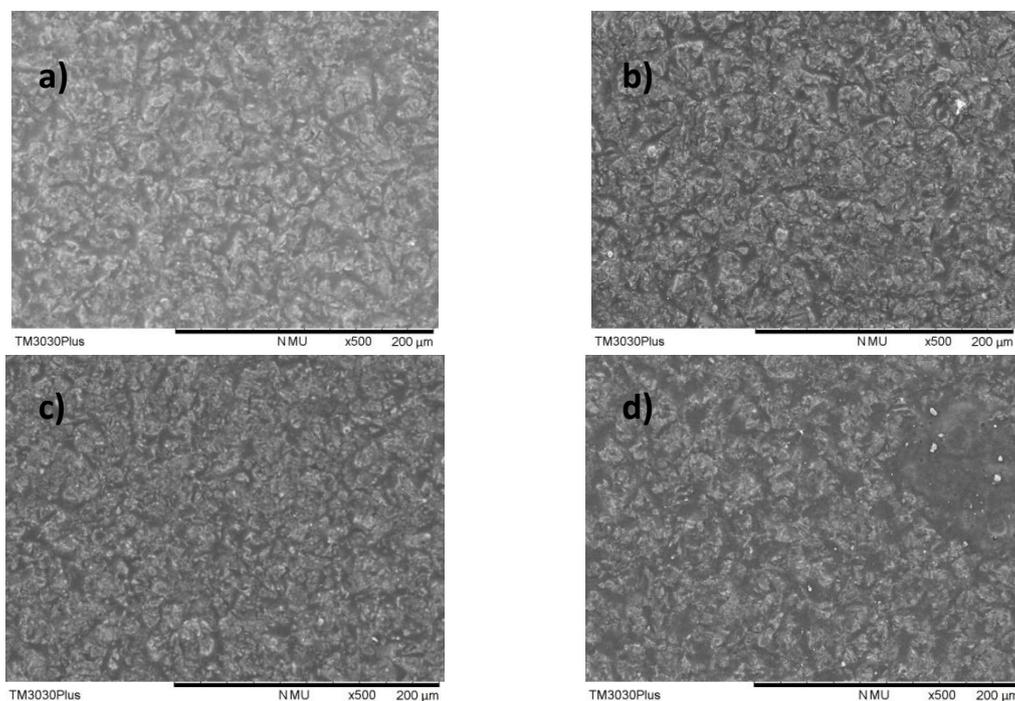


*Figura 14. Antes y después de realizar el ensayo de adherencia en el recubrimiento 7M:3T.*

El desprendimiento nulo de los recubrimientos sugiere que la adherencia a la superficie de las placas de acero es óptima, demostrando a su vez una destacable resistencia mecánica.

## 5.1.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

Los recubrimientos obtenidos presentan una rugosidad similar, sin precipitados de simvastatina.



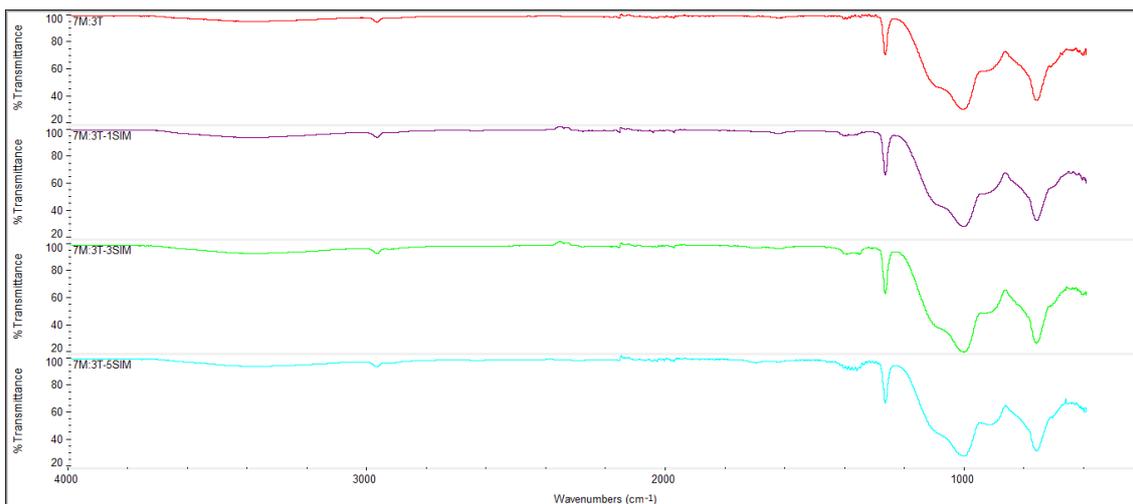
*Figura 15. Micrografías por SEM de los recubrimientos a) 7M:3T, b) 7M:3T-1SIM, c) 7M:3T-3SIM y d) 7M:3T-5SIM.*

## 5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

### 5.2.1. FTIR/ATR

Mediante esta técnica de caracterización se puede identificar la presencia de la red polisiloxánica observando la banda de absorción correspondiente a los enlaces O-Si-O. Además, es posible determinar si las diferentes proporciones de agente dopante influyen en la estructura química de la red siloxánica, atendiendo a los espectros obtenidos en cada caso.

La figura 16 muestra los espectros IR obtenidos para los recubrimientos híbridos dopados en proporciones diferentes de simvastatina.



**Figura 16. Espectros IR del sistema 7M:3T base y dopado con diferentes porcentajes de simvastatina.**

En todos los espectros se detecta una región asociada a los enlaces Si-O-Si de la red formada (entre  $600$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ ). Todos los espectros presentan dos bandas intensas alrededor de  $1075\text{ cm}^{-1}$  y de  $1165\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración de tensión asimétrica del enlace Si-O-Si. Alrededor de  $760\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda asociada a la vibración de tensión simétrica de este enlace. Todas estas bandas confirman que se han conseguido obtener, en todos los casos, redes polisiloxánicas (49), demostrando que la simvastatina no afecta negativamente a la formación de estas.

También se observa la banda asociada a productos residuales de la reacción sol-gel. Así, a  $940\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda asociada a la vibración de tensión de los grupos terminales Si-OH. La intensidad de esta en todos los espectros es baja, por lo que son pocos los grupos silanol que no han condensado. Esto quiere decir que la red que se ha formado es considerablemente densa.

Por otra parte, la presencia del grupo metilo (no hidrolizable) del MTMOS la confirman las bandas a  $2975\text{ cm}^{-1}$  y a  $1275\text{ cm}^{-1}$  debidas a la vibración de tensión asimétrica del grupo  $-\text{CH}_3$  y a la vibración de deformación del grupo metilo del enlace Si- $\text{CH}_3$ , respectivamente (50).

Cabe mencionar que las bandas correspondientes a la simvastatina activa son inapreciables en todos los espectros de los recubrimientos dopados. Esto podría sugerir que dicho agente dopante se ha integrado adecuadamente en la red siloxánica.

### 5.2.2. $^{29}\text{Si}$ -RMN

El estudio de los espectros obtenidos mediante la técnica de  $^{29}\text{Si}$ -RMN, permite analizar la estructura química de la red siloxánica obtenida tras el curado térmico. Con este tratamiento térmico, los grupos silanol (Si-OH) que no se hayan condensado previamente, reaccionan entre ellos para dar grupos siloxano (Si-O-Si). Así, el entrecruzamiento de la red obtenida se maximiza.

A continuación se muestran los espectros de  $^{29}\text{Si}$ -RMN sólido obtenidos para el recubrimiento base y el dopado con el porcentaje en peso más alto de simvastatina:

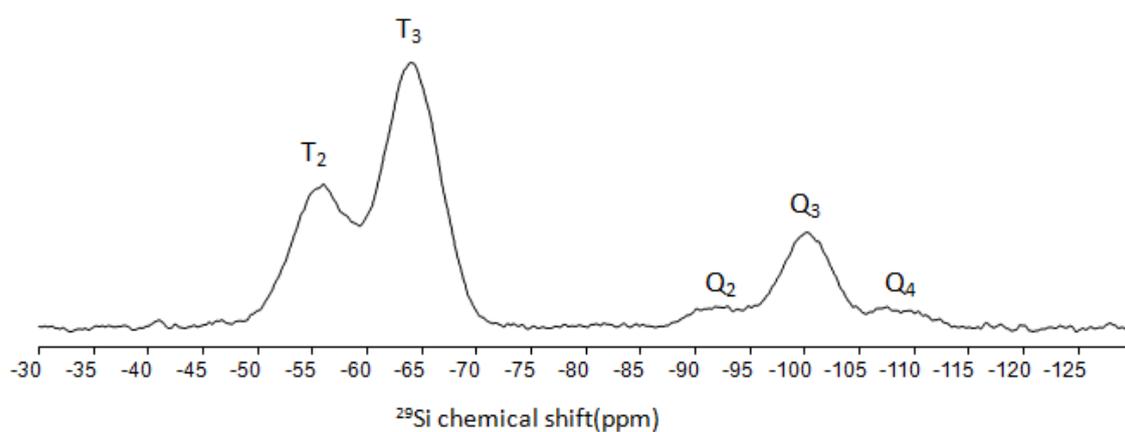


Figura 17. Espectro  $^{29}\text{Si}$ -RMN sólido del recubrimiento 7M:3T-5SIM.

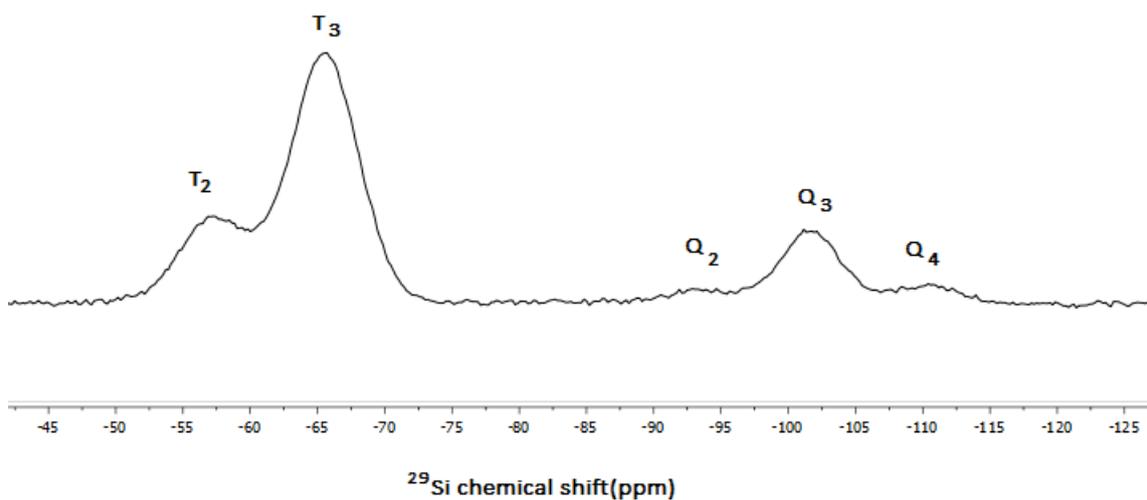


Figura 18. Espectro  $^{29}\text{Si}$ -RMN sólido del recubrimiento 7M:3T.

Ambos espectros muestran que las especies más abundantes son  $T_3$  y  $Q_3$ , la forma más condensada del precursor MTMOS y la segunda más condensada del TEOS, respectivamente.

En la comparación de los resultados, cabe destacar la diferencia entre los picos de las señales de  $T_2$  y  $T_3$ . El pico de  $T_2$  para el recubrimiento dopado sugiere que hay menos especies condensadas de MTMOS que en el recubrimiento base.

Los resultados expuestos en este apartado demuestran que tanto con el agente dopante como sin él, los recubrimientos obtenidos muestran una buena proporción de especies condensadas, no viéndose afectadas en una medida considerable por la simvastatina.

### 5.2.3. $^{13}\text{C}$ -RMN

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenido para el recubrimiento 7M:3T-5SIM esclarece si el isopropanol, empleado como disolvente, se ha volatilizado completamente, pudiendo servir como referencia para el resto de los casos.

En la figura 19 se distinguen diferentes señales correspondientes a cada tipo de enlace con el carbono presentes.

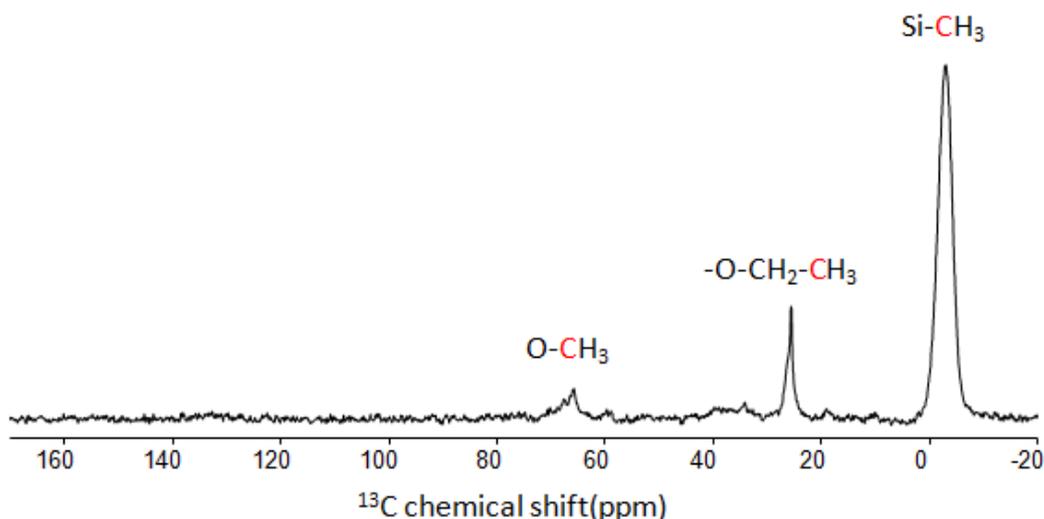


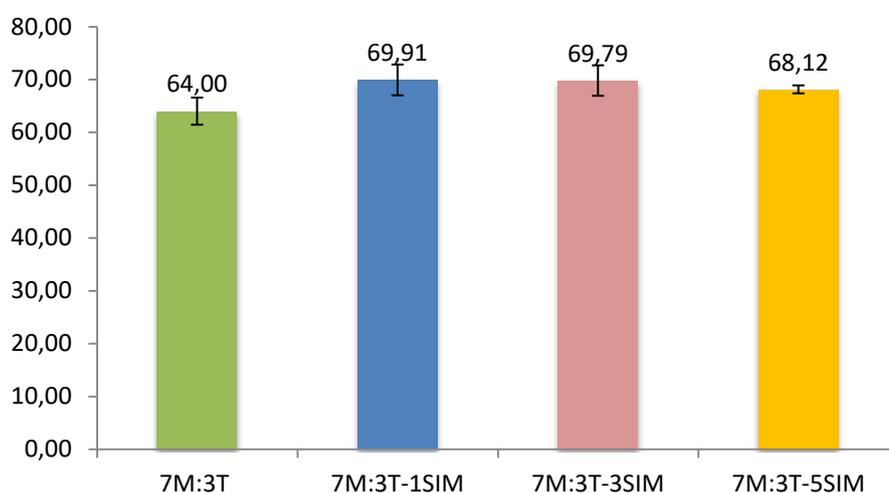
Figura 19. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del recubrimiento 7M:3T-5SIM.

La señal correspondiente al enlace  $\text{O-CH}_3$  proviene del MTMOS, al igual que la señal de  $\text{Si-CH}_3$ . Por otro lado, el enlace  $-\text{O-CH}_2-\text{CH}_3$  pertenece al precursor TEOS.

Los resultados en cuestión dejan en evidencia la ausencia de la señal correspondiente al enlace –CH-OH, que provendría del isopropanol. Dado que dicha señal no aparece, se puede concluir que el disolvente se evaporó completamente, lo que tiene una importancia indudable por la posible toxicidad y por lo tanto falta de biocompatibilidad que podría producir su presencia en el recubrimiento.

### 5.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDROFILIA/HIDROFOBIA

Los ángulos de contacto para cada recubrimiento se presentan en la figura 20.



*Figura 20. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos de los sistemas 7M:3T + % simvastatina.*

Como puede observarse en la figura, el titanio recubierto con cualquiera de los recubrimientos da lugar a una superficie ligeramente más hidrófoba, pero en todos los casos el ángulo de contacto ronda los 65°.

Cabe señalar que los valores obtenidos con el agente dopante confieren una hidrofobia/hidrofilia adecuada para promover la adhesión y propagación celular (51).

## 5.4. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE SIMVASTATINA

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de liberación:

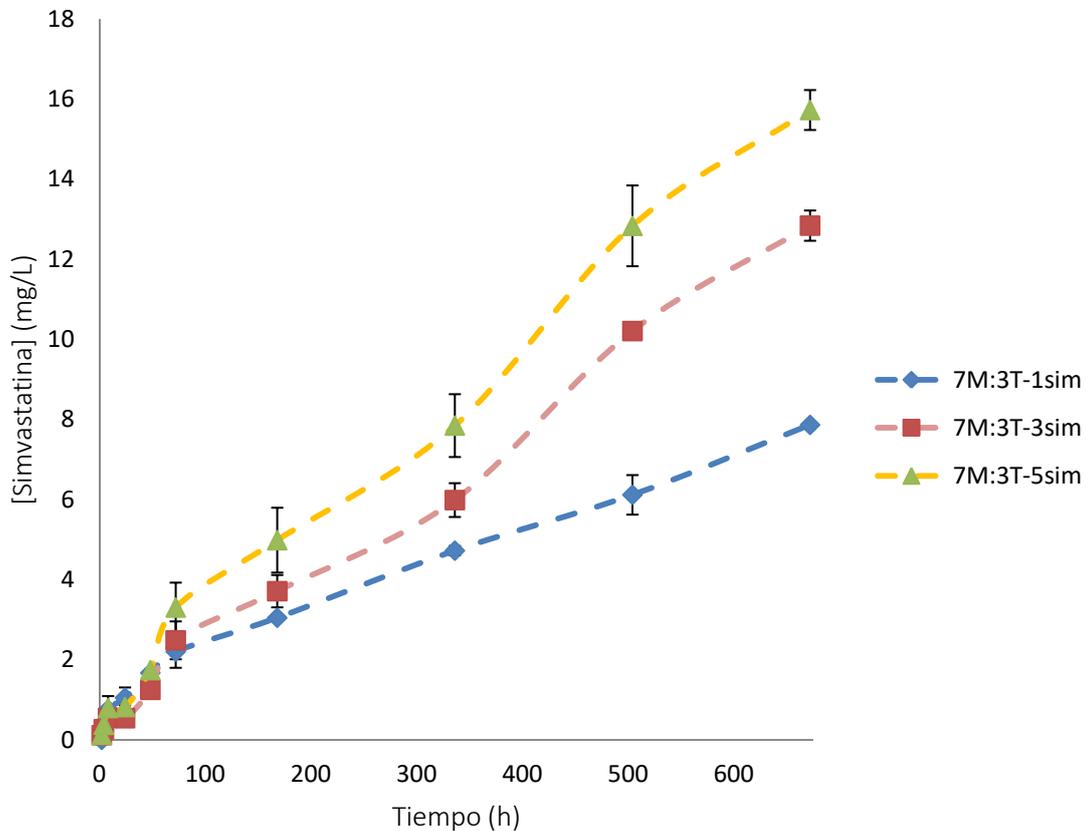


Figura 21. Liberación de simvastatina de los recubrimientos dopados.

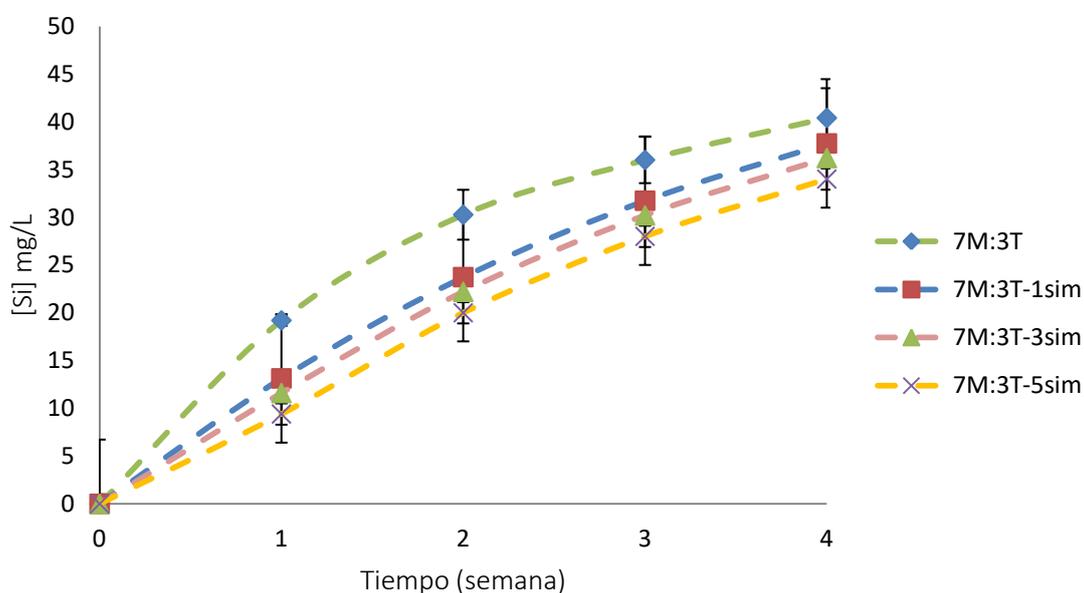
Los recubrimientos dopados demuestran una tendencia según la cual a mayor porcentaje en peso del agente dopante, mayor es la liberación. Se puede observar también, que durante las primeras 75 horas, la liberación es más rápida en todos los casos. Además, la liberación continuada y creciente a lo largo de las 4 semanas del ensayo es muy buen indicador ya que es hacia la cuarta semana cuando el proceso de osteointegración da paso a la osteogénesis de contacto y de distancia (7).

De esta forma, la línea temporal en la que se produce la liberación de simvastatina para cada recubrimiento dopado se adecúa razonablemente al proceso natural de osteointegración.

## 5.5. ENSAYO DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

Como se ha mencionado en apartados anteriores, los recubrimientos sol-gel se degradan tanto por erosión como por hidrólisis en entorno acuoso. En este ensayo se mide la concentración de productos de la reacción de hidrólisis basados en silicio a lo largo de cuatro semanas. Este estudio es de interés dadas las propiedades osteogénicas de los productos obtenidos.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:



*Figura 22. Degradación de los recubrimientos del sistema 7M:3T + % simvastatina.*

Tal y como se puede observar en la figura 22, es el recubrimiento base el que libera más silicio a lo largo de las cuatro semanas, superando ligeramente las concentraciones liberadas por el resto de recubrimientos.

La tendencia observada señala que a mayor porcentaje en peso de simvastatina, menor concentración de productos basados en silicio se libera. Puesto que la liberación de los productos basados en silicio se produce con la degradación de la red polisiloxánica, los resultados sugieren que, una mayor proporción de simvastatina contribuye en cierta medida a la estabilización de la red, impidiendo ligeramente que se libere silicio. Dicha observación

también podría deberse a la ligera hidrofobia que confiere la adición de simvastatina, disminuyendo la hidrofilia y por ende la hidrólisis que daría paso a la degradación estudiada. En cualquier caso, la liberación de silicio se produce de forma continuada y creciente hasta la cuarta semana en todos los recubrimientos, pudiendo ejercer así la acción osteogénica buscada durante la primera etapa de osteointegración.

## 6. CONCLUSIÓN

Después de la realización de este trabajo, se pueden definir las siguientes conclusiones:

- El estudio realizado demuestra que los recubrimientos 7M:3T-1SIM, 7M:3T-3SIM y 7M:3T-5SIM presentan una adherencia máxima a la superficie del titanio, manteniendo la rugosidad propia del Ti pretratado así como su grado de hidrofilia/hidrofobia, lo que los hace adecuados para la adsorción de proteínas (52).
- La incorporación de simvastatina a las formulaciones no afecta a la uniformidad y continuidad de los recubrimientos, no provocando la aparición de poros o grietas.
- La adición de la simvastatina contribuye a una ligera estabilización de la red polisiloxánica, liberando en todos los casos productos osteogénicos, entre los cuales también se encuentran especies basadas en silicio, en un entorno que simula las condiciones fisiológicas.
- Un aumento de la cantidad de simvastatina en los recubrimientos provoca una mayor cantidad de simvastatina liberada.

A la vista de las conclusiones de este trabajo, y para poder seleccionar el recubrimiento más idóneo será necesario realizar una completa caracterización biológica de los mismos. Esta caracterización tendría que iniciarse por los ensayos celulares, comenzando por el estudio de citotoxicidad, y continuando por otros ensayos celulares más específicos, utilizando marcadores osteogénicos. Una vez realizados los ensayos *in vitro*, y con la formulación seleccionada, habría que realizar el estudio *in vivo*.

## 6. CONCLUSION

After carrying out this work, the following conclusions can be defined:

- The study carried out shows that the 7M:3T-1SIM, 7M:3T-3SIM and 7M:3T-5SIM coatings have maximum adherence to the titanium surface, maintaining the roughness of pre-treated Ti as well as its hydrophilicity/hydrophobicity degree, which makes them suitable for protein adsorption (52).
- The addition of simvastatin to the formulations does not affect the uniformity and continuity of the coatings, and does not cause the appearance of pores or cracks.
- The addition of simvastatin contributes to a slight stabilization of the polysiloxane network, releasing in all cases osteogenic products, including silicon-based species, in an environment that simulates physiological conditions.
- An increase in the amount of simvastatin in the coatings causes a greater amount of simvastatin to be released.

In view of the conclusions of this work, and in order to select the most suitable coating, it will be necessary to carry out a complete biological characterization of them. This characterization would have to begin with cellular assays, beginning with the study of cytotoxicity, and continuing with other more specific cellular assays, using osteogenic markers. Once the *in vitro* tests have been carried out, and with the selected formulation, the *in vivo* study would have to be performed.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Oral Bone Tissue Regeneration: Mesenchymal Stem Cells, Secretome, and Biomaterials*. **Gugliandolo, Agnese, et al.** 5236, 2021, International journal of molecular sciences, Vol. 22.
2. *Osteoporosis: A Review of Treatment Options*. **Kristie N Tu, Janette D Lie, Chew King Victoria Wan, Madison Cameron, Alaina G Austel, Jenny K Nguyen, Kevin Van, Diana Hyun.** 2018, PubMed, Vol. 43, pp. 92-104.
3. *The underlying pathophysiology and therapeutic approaches for osteoporosis*. **Harshika Awasthi, Dayanandan Mani , Divya Singh , Atul Gupta.** 6, 2018, Medicinal Research Reviews, Vol. 38, pp. 2024-2057.
4. *Primary osteoporosis in postmenopausal women*. **Meng-Xia Ji, Qi Yu.** 1, 2015, Chronic Diseases and Translational Medicine, Vol. 1, pp. 9-13.
5. *Osteoporosis: Current Concepts*. **Ibrahim Akkawi, Hassan Zmerly.** 06, 2018, Joints, pp. 122-127.
6. *Evaluation of Oral Implant Survival Rate in Postmenopausal Women with Osteopenia/Osteoporosis. A Retrospective Pilot Study*. **Liapaki, Anna, et al.** 6, 2022, Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery, Vol. 123, pp. e777-81.
7. *Health, Maintenance, and Recovery of Soft Tissues around Implants*. **Yulan Wang MD, Yufeng Zhang PhD, Richard J. Miron PhD.** 3, s.l. : Wiley, 2015, Clinical implant dentistry and related research, Vol. 18, pp. 425-634.
8. *Osteoinduction by demineralised bone*. **Solheim, E.** 22, 1998, International Orthopaedics, pp. 335-342.
9. *Osteoinduction*. **J, Wilson-Hench.** 1987, Progress in biomedical engineering, Vol. 4, p. 29.
10. *Mussel-Inspired Peptide Coatings on Titanium Implant to Improve Osseointegration in Osteoporotic Condition*. **Huan Zhao, Yingkang Huang, Wen Zhang, Qianping Guo, Wenguo Cui, Zhiyong Sun, David Eglin, Lei Liu, Guoqing Pan, and Qin Shi.** 7, 2018, ACS Biomaterials Science & Engineering, Vol. 4, pp. 2505-2515.
11. **Frank E. Johnson, Katherine S. Virgo.** *The Bionic Human*. s.l. : Humana Press, 2006.
12. *Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface*. **D Buser, N Broggin, M Wieland, R K Schenk, A J Denzer, D L Cochran, B Hoffmann, A Lussi, S G Steinemann.** 83, 2004, Journal of Dental Research, Vol. 7, pp. 529-533.
13. *On the Nature of Biomaterials*. **Williams, David F.** 30, 2009, Biomaterials, Vol. 30, pp. 5897-909.
14. *Biomaterials Tailoring at the Nanoscale for Tissue Engineering and Advanced Therapies*. **Ciardelli, Monica Boffito and Gianluca.** 5, 2021, Nanomaterials, Vol. 11, p. 1221.
15. **Maita, Dr Luis.** Dental.org. [Online] Marzo 9, 2023. [Cited: junio 6, 2023.] <https://www.dentaly.org/es/implantes-dentales/partes/>.
16. *Surface modifications of dental implants*. **Dows Institute for Dental Research, College of Dentistry, The University of Iowa, USA.** 1, 2008, Australian Dental Journal, Vol. 53, pp. S26-S33.

17. **Rubio, Beatriz Palla.** Recubrimientos antibacterianos basados en Silicio para implantes dentales. 2016. pp. 13-18.
18. *The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior.* **Ku, Y., Chung, C. P., & Jang, J. H.** 25, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5153-5157.
19. *Composition and Modifications of Dental Implant Surfaces.* **Bruschi, M., Steinmüller-Nethl, D., Goirwoda, W., & Rasse, M.** 2015, *Journal of Oral Implants*.
20. *Development of hybrid sol–gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance.* **M.J. Juan-Díaz, M. Martínez-Ibáñez, I. Lara-Sáez, S. da Silva, R. Izquierdo, M. Gurruchaga, I. Goñi, J. Suay.** 2016, Vol. 96, pp. 42-51.
21. **Arnáez, Iñaki García.** Desarrollo de recubrimientos para implantes dentales con sales de Ca y Sr, para optimizar los procesos iniciales de regeneración ósea. Donostia : s.n., 2021. pp. 57-62.
22. *Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality: an overview of randomized trials.* **Herbert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH.** 4, 1997, *JAMA*, Vol. 278, pp. 313-321.
23. *Low-density lipoprotein-independent effects of statins.* **Davignon J, Laaksonen R.** 6, 1999, *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 10, pp. 543-560.
24. *Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption and kinase activation in vitro.* **Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al.** 1, 1999, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 96, pp. 133-138.
25. *Simulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins.* **G. MUNDY, R. GARRETT, S. HARRIS, J. CHAN, D. CHEN, G. ROSSINI, B. BOYCE, M. ZHAO, AND G. GUTIERREZ.** 5446, 1999, *Science*, Vol. 286, pp. 1946-1949.
26. *Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1.* **Yamaguchi A, Toshihisa Komori T, Tatsuo Suda T.** 1999, *Endocrine Reviews*, Vol. 21, pp. 393-411.
27. *Simvastatin nanoemulsion for improved oral delivery: design, characterisation, in vitro and in vivo studies.* **Sandip S. Chavhan, Kailash C. Petkar & Krutika K. Sawant.** 8, 2013, *Journal of Microencapsulation*, Vol. 30, pp. 771-779.
28. **Aldalur, Itziar.** *Incorporación de microesferas cargadas de simvastatina a recubrimientos sol-gel osteoinductores.* Universidad del País Vasco. Donostia : s.n., 2015.
29. *Applying causal models to explore the mechanism of action of simvastatin in progressive multiple sclerosis.* **Arman Eshaghia, Rogier A. Kievit, Ferran Pradosa, Carole H. Sudreg, Jennifer Nicholas, M. Jorge Cardoso, Dennis Chan, Richard Nicholas, Sebastien Ourselin, John Greenwood, Alan J. Thompson, Daniel C. Alexander, Frederik Barkhof, Jeremy Chataway.** 22, 2019, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 116, pp. 11020-11027.
30. *Composite PCL/HA/Simvastatin Electrospun Nanofiber Coating on Biodegradable Mg Alloy for Orthopedic Implant Application.* **Rezk, Abdelrahman I., et al.** 2, 2019, *Journal of Coatings Technology and Research*, Vol. 16, pp. 477-89.

31. *Simvastatin Coating of TiO<sub>2</sub> Scaffold Induces Osteogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells*. **Pullisaar, Helen, et al.** 1, 2014, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 447, pp. 139-44.
32. *Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales*. **Juan-Díaz, M. J.** [ed.] UPV/EHU. 2013.
33. *Study on the Conversion of Three Natural Statins from Lactone Forms to Their Corresponding Hydroxy Acid Forms and Their Determination in Pu-Erh tea*. **Yang, Deng-Jye, y Lucy Sun Hwang.** 1-2, 2006, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1119, pp. 277-84.
34. **Herrero, Ruth Rodríguez.** *Cementos Óseos Acrílicos Inyectables y Bioactivos con Propiedades Terapéuticas*. *Ciencia y Tecnología de Polímeros*, UPV/EHU. Donostia : s.n., 2010. p. 214, Tesis doctoral.
35. *Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales*. **Juan-Díaz, M. J.** (UPV/EHU) : s.n., 2013.
36. *Wet Coating Technologies for Glass*. **Schmidt, H. & Mennig, M.** 2000, INM, Institut für Neue Materialien.
37. *Surface Modifications for Implants Lifetime Extension: An Overview of Sol-Gel Coatings*. **Tranquillo, Elisabetta, y Flavia Bollino.** 6, 2020, *Coatings*, Vol. 10, p. 589.
38. *Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)*. **Clavijo, Josué.** 3, 2013, *Revista Elementos*, pp. 134-146.
39. *Structural studies of silicates by solid-state high-resolution silicon-29 NMR*. **Lippmaa, E., Maegi, M., Samoson, A., Engelhardt, G. & Grimmer, A. R.** 1980, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 102, pp. 4889-4893.
40. *Atomic-scale structure of gel materials by solid-state NMR. in Handbook of Sol-Gel Science Technology: Processing, Characterization and Applications*. **Smith, M. E. & Holland, D.** 2018, pp. 1281-1322.
41. *Design of Cefotaxime Sodium-Loaded Polydopamine Coatings with Controlled Surface Roughness for Titanium Implants*. **He, Fei, et al.** 11, 2022, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 8, pp. 4751-63.
42. *Preventing Peri-Implantitis: The Quest for a Next Generation of Titanium Dental Implants*. **Hasan, Jafar, et al.** 11, 2022, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 8, pp. 4697-737.
43. *Protein interactions with polymer coatings and biomaterials*. **Wei, Q. et al.** 2014, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 53, pp. 8004-8031.
44. *Self-Assembled Microlens Array with Controllable Focal Length Formed on a Selective Wetting Surface*. **Xu, Miao, et al.** 6, 2020, *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 12, p. 7827.
45. *Interaction Pattern and in Vitro, in Vivo Release Behavior of Simvastatin-Loaded Chitosan Nanoformulation*. **Sararhchandiran, Irisappan, et al.** 11, 2019, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 45, pp. 1725-39.
46. **Anette Müllertz, Yvonne Perrie y Thomas Rades.** *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. s.l. : Springer, 2016.

47. *Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology.* **Gupta, R. & Kumar, A.** 3, 2008, *Biomedical materials*, Vol. 3, p. 034005.
48. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects.* **Wilschefski, Scott, y Matthew Baxter.** 3, 2019, *Clinical Biochemist Reviews*, Vol. 40, pp. 115-33.
49. *Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides.* **Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V. & Zaharescu, M.** 2003, *J. Non. Cryst. Solids*, pp. 263-279.
50. *Improved barrier performance of metal alkoxide-modified methyltrimethoxysilane films.* **Yang, Y. Q., Liu, L., Hu, J. M., Zhang, J. Q. & Cao, C. N.** 2012, *Thin Solid Films*, Vol. 520, pp. 2052-2059.
51. *Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films.* **Zolkov, C., Avnir, D. & Armon, R.** 2004, *J. Mater. Chem.*, Vol. 14, p. 22002205.
52. *Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs.* **Buser, D. et al.** 1991, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 25, pp. 889-902.
53. *Effects of sol-gel process parameters on the anticorrosive performance of phosphosilicate hybrid coatings for carbon steel: structural and electrochemical studies.* **Phan, T. T., Bentiss, F. & Jama, C.** 2018, *New J. Chem.*, Vol. 42, pp. 13442-13452.