



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1005792-7 B1

(22) Data do Depósito: 04/02/2010

(45) Data de Concessão: 03/07/2018



(54) Título: MATERIAIS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA A BASE DE COMBINAÇÕES DE MONETITA E OUTROS COMPOSTOS DE CÁLCIO E SILÍCIO BIOTATIVOS

(51) Int.Cl.: A61L 27/12; A61L 27/50; A61L 27/54; A61L 31/02; A61L 31/12; A61L 31/14; A61L 31/16

(30) Prioridade Unionista: 10/02/2009 ES PCT/ES09/070019

(73) Titular(es): AZUREBIO, S.L.

(72) Inventor(es): RAUL GARCÍA CORRODEGUAS; ARCADIO GARCIA DE CASTRO ANDREWS; SUSSETTE PADILLA MONDÉJAR; NIURIS ACOSTA CONTRERAS

MATERIAIS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA A BASE DE COMBINAÇÕES DE MONETITA E OUTROS COMPOSTOS DE CÁLCIO E SILÍCIO BIOTATIVOS

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao campo de biomateriais, mais especificamente ao campo de biomateriais de fosfato de cálcio que apresentam uma contribuição positiva para regeneração óssea. Os materiais a base de monetita sintéticos da presente invenção podem ser aplicados a múltiplos
10 tratamentos de regeneração óssea na área de medicina e veterinária, em cirurgia em traumatologia, cirurgia maxillofacial, cirurgia dental, cirurgia ortognática, endodontia, oftalmologia, neurocirurgia e/ou processos osteoporóticos, e outras indicações onde é necessária
15 regeneração óssea.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A perda de massa óssea e qualidade óssea é um sério problema de saúde que pode ser mais sério em pacientes de
20 idade avançada. Após intervenção em tratamentos odontológicos muitas vezes existe uma perda massa óssea que resulta em complicações e patologias. Isso ocorre, por exemplo, na resorção óssea alveolar após extração dentária e em doença periodontal. Por outro lado, em traumatologia e em
25 outras intervenções cirúrgicas, a perda de massa óssea é um sério problema de saúde que pode resultar até na morte do paciente.

Biomateriais tem sido usados por quase um século para reparar e substituir segmentos ósseos do sistema muscular-esquelético. Enxertos ósseos autólogos, isto é do próprio
30 paciente, normalmente são usados para preencher cavidades ósseas e em reconstruções cirúrgicas. Porém, existe uma fonte limitada de osso e esses procedimentos sujeitam os pacientes a um trauma adicional para obter o enxerto. Outra opção é a
35 do aloenxertos de doador. Porém, esses apresentam uma resorção óssea mais lenta e neoformação, vascularização reduzida e capacidade osteogênica, e uma maior resposta imunológica e risco de transmissão de patógenos. Uma

alternativa são materiais feitos de osso bovino, tais como BioOss[®], GenOx Inorg[®] e Orthoss[®], que normalmente são usados na odontologia. Porém, o uso desses produtos baseados em materiais biológicos apresenta o problema de possível
5 contaminação com agentes infecciosos e requer controles de qualidade rigorosos. Com o objetivo de evitar esses problemas, foram desenvolvidas matrizes sintéticas. A pesquisa de novos biomateriais sintéticos para reparo ósseo destinou-se a reduzir a necessidade de enxertos ósseos a um
10 nível mínimo por meio de um equivalente artificial, que é reabsorvido com o tempo e/ou que integra osso adjacente, e também serve como suporte para fraturas osteoporóticas. As propriedades mecânicas deste material ósseo artificial devem ser o mais próximo possível do osso esponjoso. O material
15 também deve contribuir para a estabilidade da fratura e ser suficientemente resistente para reduzir o tempo exigido para imobilização ou suporte externo. O material de substituição deve ser biodegradável, biocompatível e osteoindutivo, isto é, ele deve atrair células mesenquimais próximas ao implante
20 e favorecer sua diferenciação em osteoblastos, e também deve ser osteocondutivo, isto é, agir como um guia para a formação de osso novo.

Fosfatos de cálcio são de especial interesse em regeneração óssea, pois eles parecem a fase mineral de osso
25 natural e são susceptíveis à remodelação óssea e resorção. Os fosfatos de cálcio mais frequentemente usados incluem matrizes de hidroxiapatita, fosfato tricálcio e brushita. Esses materiais podem ser administrados na forma de cimentação, pastas, sólidos implantáveis ou formulações
30 granulares ou em pó.

No desenvolvimento de matrizes de regeneração óssea, devemos fazer uma menção especial aos produtos que reivindicam regeneração óssea melhorada por meio de incorporação de um determinado grau de porosidade|. A
35 introdução de porosidade no sistema aumenta consideravelmente a área de superfície do material no sítio de implante e a superfície que pode interagir com células dos tecidos circundantes. Exemplos de hidroxiapatita porosa de origem

coral incluem Interpore[®] e ProOsteon[®]. Além disso, exemplos de hidroxiapatita sintética incluem Apafill-G[®] ou ENGIpore[®]. Outras matrizes sintéticas granulares comerciais de fosfato tricálcio beta incluem chronOs[®] e Cerasorb[®]. Este último é
5 comercializado como partículas com diferentes tamanhos entre 150 µm e 2000 µm, dependendo da necessidade, e que é comumente usado na regeneração alveolar após mistura com o sangue do paciente. Outro produto similar é o Bi-Ostetic[™],
10 formado por partículas entre 1000 µm e 2000 µm, composto por uma mistura de hidroxiapatita e fosfato tricálcio. Além disso, Collagraft[®] é outro material granular a base de hidroxiapatita e fosfato tricálcio que também incorpora colágeno. Outros materiais osteoindutivos sintéticos incorporados em produtos comerciais tais como CalMatrix[™]
15 incluem sulfato de cálcio.

Na área de materiais com interesse crescente em regeneração óssea encontra-se o fosfato dicálcico dihidrato [CaHPO₄-2H₂O], de nome mineralógico "brushita", que pode ser encontrado na natureza ou ser sinteticamente produzido por
20 meio de reações ácido-base de fosfatos de cálcio (LeGeros et al. 1982 J. Dental Res. 61 :343; Brown WE y Chow LC. 1983 J. Dental Res. 62: 672). Na área do uso de brushita, foram feitas recentes descrições de combinações de brushita e fosfato tricálcio resultantes de um processo de fabricação
25 com excesso de fosfato tricálcico. Verificou-se que um material granular composto de 87% em massa de brushita e 17% em massa de fosfato beta-tricálcico é mais degradável e resulta em uma formação óssea maior do que a hidroxiapatite BioOss[®] bovina comercial (Tamimi F. et al. 2006 J. Clin.
30 Periodontal 33:922-928).

Fosfato dicálcico [CaHPO₄], de nome mineralógico "monetita", é um material consideravelmente diferente da brushita que pode ser encontrado como um mineral na natureza, sintetizado diretamente, ou através de uma reação
35 de decomposição de brushita. Existem poucos precedentes no uso de monetita em regeneração óssea, tais como descrições do uso do mineral monetita natural misturado com sangue do paciente (Getter L, et al. 1972 J. Oral Surg. 30:263-268) ou

sua incorporação em soluções de proteína (WO98/58602) ou polímeros biodegradáveis (US2005209704). A monetita vem sendo analisada mais recentemente em modelos animais de regeneração óssea (Tamimi F. et al. 2008 J. Biomed. Mater. Res. 87A:980-988). Porém, o uso de monetita em regeneração óssea não tem sido explorado, considerada como um material que não é ideal para uma regeneração óssea devido à sua rápida dissolução e baixa resistência mecânica. Um exemplo disso, pode-se verificar na formulação de grânulos de brushita (Tamimi F. et al. 2007 J. Biomed. Mater. Res. 81A:93-102) onde elevadas temperaturas que resultam na conversão de brushita em monetita, são intencionalmente evitadas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve matrizes de monetita sintéticas que são melhoradas por meio da incorporação de outros compostos de cálcio bioativos que modulam o tempo de degradação do material resultante, promovem a regeneração óssea, e melhoram sua osteoindutividade, osteocondutividade e propriedades biomecânicas.

A presente invenção abrange novos materiais para regeneração óssea e reparo, método para sua fabricação, e aplicação em cirurgia em traumatologia, cirurgia maxilofacial, cirurgia dentária, cirurgia ortognática, endodontia, oftalmologia, neurocirurgia e/ou processos osteoporóticos, e outras indicações onde é necessária a regeneração óssea.

Os materiais são baseados em combinações de elementos biocompatíveis, biodegradáveis, osteocondutivos e osteoindutivos. Particularmente, a presente invenção abrange materiais sintéticos com 20 % a 95 %, preferivelmente entre 40% e 90% em massa total de monetita $[Ca_{1-x}M_xHPO_4]$, onde $0 < x < 0,05$, e onde M pode ser íon metálico divalente], e que em sua composição final incorpora entre 0 % e 80 %, preferivelmente entre 0 % e 60 %, em massa total de compostos de cálcio bioativos e entre 5% e 80 % em massa total de compostos de silício bioativos. A incorporação desses compostos de cálcio e/ou silício bioativos permite a

modulação da velocidade de degradação e a osteocondutividade, osteoindutividade e resistência de matrizes de monetita. Os compostos de cálcio bioativos incluem fosfatos de cálcio, e os compostos de silício bioativos incluem silicatos de cálcio, e/ou vidros de sílica ou géis bioativos. Além disso, os materiais da presente invenção podem incorporar agentes farmacológicos e/ou agentes biocompatíveis, e/ou agentes protetores em solução, ou como partículas ou grânulos que contribuem favoravelmente para a regeneração óssea, apresentam uma atividade particularmente terapêutica, modulam o tempo de degradação, ou contribuem para melhorar a resistência mecânica. Esses materiais podem ser feitos de reações ácido-base que resultam em materiais contendo brushita, e outros produtos de reação e que permanecem reagentes. Conversão da fração de brushita em monetita por meio de tratamento térmico resulta nos materiais desejados.

Esses materiais podem ser manufacturados na forma de pós, grânulos ou estruturas de monetita com um formato e tamanho determinados por um molde ou métodos de conformação tridimensional, e seu formato final pode ser modificado por escultura, erosão ou pulverização. Os materiais podem ser feitos para conter agentes biocompatíveis e/ou agentes farmacológicos que favorecem a regeneração óssea, e podem ser obtidos com resistência mecânica diferente, grau de porosidade, que podem ser interconectados ou não, e diferente tamanho de poro.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção abrange novos materiais para regeneração óssea, métodos para sua fabricação, e sua aplicação em saúde de animais e seres humanos em cirurgia em traumatologia, cirurgia maxilofacial, cirurgia dentária, cirurgia ortognática, endodontia, oftalmologia, neurocirurgia e/ou processos osteoporóticos, e outras indicações onde a regeneração óssea é necessária. Os materiais são baseados em elementos biocompatíveis, bioativos, osteocondutivos e osteoindutivos. Na presente invenção os materiais descritos referem-se à seguinte fórmula química e definições:

- 5 - Monetita: nome mineralógico para fosfato de cálcio [CaHPO₄], que também incorpora monetita parcialmente substituída [Ca_{1-x}M_xHPO₄, onde 0 < x ≤ 0.05, e onde M é íon metálico divalente tais como Mg, Sr, Ba, Fe, Zn, entre outros].
- 10 - Brushita: nome mineralógico para fosfato dicálcico dihidrato [CaHPO₄ · 2H₂O], que também incorpora brushita parcialmente substituída [Ca_{1-x}M_xHPO₄ · 2H₂O, onde 0 < x < 0.05, e onde M é íon metálico divalente tais como Mg, Sr, Ba, Fe, Zn, entre outros].
- Fosfato monocálcico: [Ca(H₂PO₄)₂].
- Fosfato monocálcico monohidrato [Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O].
- 15 - Fosfato tricálcico [Ca₃(PO₄)₂] indistintamente qualquer de seus polimorfos cristalinos estáveis, fosfato beta-tricálcico [β-Ca₃(PO₄)₂] ou fosfato alfa-tricálcico [α-Ca₃(PO₄)₂], e fosfato tricálcico amorfo.
- Fosfato octacálcico [Ca₈H₂(PO₄)₆ · 5H₂O].
- 20 - Hidroxiapatitas: nome mineralógico para a família de compostos com a fórmula química [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] onde Ca pode ser parcialmente substituído por Na, K, Sr, Mg, Zn, o PO₄ pode ser parcialmente substituído por HPO₄, CO₃, SiO₄, e o OH pode ser parcialmente substituído por F, Cl, CO₃. Esses podem variar de altamente cristalizados para pouco cristalizados.
- 25 - Wollastonita: metasilicato de cálcio [CaSiO₃], indistintamente alfa-wollastonita [α-CaSiO₃] ou beta-wollastonita [β-CaSiO₃].
- Metasilicato de cálcio misto: [CaM(SiO₃)₂] onde M pode ser um íon divalente metálico tais como Mg, Sr, Ba, Fe, Zn.
- 30 - Ortosilicato de cálcio: [Ca₂SiO₄], indistintamente ortosilicato alfa-cálcico [α-Ca₂SiO₄], ortosilicato beta-cálcico [β-Ca₂SiO₄], ou ortosilicato gama-cálcico [γ-Ca₂SiO₄].
- 35 - Silicato tricálcico: [Ca₃SiO₅].
- Vidros de sílica bioativos: materiais vítreos, obtidas seja por métodos de fusão ou por sol-gel, incluindo em sua composição Si e Ca, e que também pode

conter P, Na, Mg, Sr, entre outros, em concentrações tais que seja possível obter um material bioativo. Vidros de sílica bioativos incluem os sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZnO}$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO}$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$, e/ou $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$

5 - sílica gel hidratado: $[-\text{Si}(\text{OH})_2\text{-O-}]_n$.

Particularmente, a presente invenção incorpora materiais sintéticos que contém entre 20 % e 95 %, preferivelmente entre 40 % e 90 %, em massa total de monetita $[\text{Ca}_{1-x}\text{M}_x\text{HPO}_4]$, onde $0 \leq x \leq 0.05$, e onde M é um íon metálico divalente tais como Mg, Sr, Ba, Fe, Zn, entre outros], e que em sua composição final incorpora entre 0 % e 80%, preferivelmente entre 0 % e 60 %, em massa total de outros

10 compostos de cálcio bioativos e entre 5% e 80 % em massa total de compostos de silício bioativos. Monetita é um material osteocondutivo que, devido à sua baixa resistência mecânica e rápida dissolução no organismo ou em meios biológicos, não constitui um bom material para regeneração

15 óssea. A incorporação de compostos de cálcio bioativos em matrizes de monetita da presente invenção permite a modulação da taxa de degradação dos materiais resultantes e melhora sua osteocondutividade, osteoindutividade e propriedades biomédicas.

25 Obviamente, que os materiais sintéticos descritos na presente invenção não são limitados a esses compostos e podem compreender outros componentes.

Os "compostos de cálcio bioativos" incorporados nas matrizes de monetita incluem fosfatos de cálcio, além de monetita, entre outros, brushita, fosfato tricálcico, hidroxiapatitas e fosfatos octacálcicos.

30

Os "compostos de silício bioativos" incluem, entre outros, wollastonita, metasilicatos de cálcio mistos, ortosilicatos de cálcio, silicato tricálcico, e géis e vidros de sílica bioativos. Vidros de sílica incluem vidros, que podem ser obtidos por fusão ou métodos de sol-gel, que apresentam em sua composição Si e Ca, e também podem conter

35

P, Na, Mg, Sr, entre outros, em concentrações tais que seja obtido um material bioativo.

Conforme ilustrado, sem caráter restritivo, nos exemplo de 1-13, esses compostos de cálcio bioativos e compostos de silício bioativos podem ser incorporados em matrizes de monetita geradas a partir de reações ácido-base heterogêneas que resultam em brushita que é em seguida decomposta formando monetita.

A primeira etapa na síntese dos materiais da presente invenção compreende uma reação ácido-base na qual o componente ácido é uma solução de ácido ortofosfórico [H_3PO_4] ou seus sais monobásicos de metais alcalinos ou alcalino-terrosos, preferivelmente de Ca ou Mg, tais como fosfato de cálcio monobásico monohidrato, e os componentes básicos são compostos bioativos sólidos e/ou compostos de silício bioativos. A adição de um excesso do componente sólido básico à mistura de reação resulta em uma matriz de brushita, como um produto da reação, que contém o excesso não reagido de compostos de cálcio bioativos e/ou compostos de silício bioativos. O resultado da reação ácido-base, com excesso dos compostos de cálcio bioativos e/ou compostos de silício bioativos que agem como os componentes básicos, originam sólidos que contém entre 24 % e 96 % em massa de brushita e entre 4% e 76% em massa dos compostos de cálcio bioativos não reagidos e/ou compostos de silício bioativos dependendo da formulação inicial da reação ácido-base. Na formulação da reação ácido-base, os componentes sólidos básicos em geral apresentam um tamanho de partícula entre 0,01 μm e 300 μm , preferivelmente entre 0,05 μm e 100 μm , e estão presentes em uma proporção líquido/sólido entre 0,4 ml/g e 3 ml/g, preferivelmente entre 0,8 ml/g e 2 ml/g. A mistura dos componentes de reação ácido-base produz uma pasta que solidifica rapidamente, com o formato do molde no qual ela está contida, como resulta da precipitação do produto de brushita da reação. Quando um dos componentes básicos na mistura de reação é uma wollastonita, um metasilicato de cálcio misto, ortosilicato de cálcio, silicato tricálcico, e/ou um vidro de sílica bioativo, um dos produtos da reação

ácido-base, além da brushita, será um sílica gel hidratado em embuti a matriz sólida resultante.

Para reduzir a velocidade da reação ácido-base e permitir uma melhor manipulação da pasta, a solução aquosa
5 incorpora preferivelmente um agente retardador que inclui, entre outros, e sem restrição, ácido cítrico [$C_6H_8O_7$] ou seus sais alcalinos ou de amônia, ácido sulfúrico [H_2SO_4] ou seus
10 sais alcalinos ou alcalino-terrosos ou de amônia, ácido glicólico [$C_2H_4O_3$] ou seus sais alcalinos ou de amônia, ácido acético [$C_2H_4O_2$] ou seus sais alcalinos ou de amônia, e ácido pirofosfórico [$H_4P_2O_7$], ou seus sais alcalinos ou de amônia.

Uma segunda etapa na síntese dos materiais da presente invenção compreende a decomposição da fração de brushita em monetita por tratamento térmico a temperaturas entre 40 °C e
15 400 °C, preferivelmente entre 40 °C e 200 °C. Este tratamento térmico pode ser realizado em uma segunda etapa ou pode ser executado simultaneamente para a formação de brushita resultante da reação ácido-base. A decomposição da fração de
20 brushita resulta nos materiais da presente invenção, contendo entre 20 % e 95 %, preferivelmente entre 40 % e 90 %, em massa de monetita, e entre 0 % e 80 %, preferivelmente entre 0 % e 60 %, em massa de compostos de cálcio bioativos e entre 5% e 80 % em massa total de compostos de silício bioativos.

Conforme ilustrado, sem caráter restritivo, nos
25 exemplos 6, 7 e 13, esse método de síntese também permite a fabricação de matrizes de monetita que contém mais de um composto de cálcio bioativo e/ou composto de silício bioativo, tais como brushita, fosfato tricálcico, fosfato octacálcico, hidroxiapatitas, wollastonita e/ou géis e vidros
30 de sílica bioativos. A inclusão de mais de um desses compostos de cálcio bioativos à reação ácido-base, resulta em matrizes de monetita que em sua composição final apresenta diferentes proporções desses compostos de cálcio bioativos. A
35 presença de entre 5% e 80% de compostos de sílica bioativos representa uma concretização preferida da invenção. Esses compostos de sílica bioativos incluem wollastonita, metasilicatos de cálcio mistos, ortosilicato de cálcio, silicatos tricálcicos, e géis e vidros de sílica bioativos. A

incorporação desses compostos de sílica bioativos resulta em materiais com porosidade e área de superfície maior, e coesão e resistência mecânica mais elevadas. A incorporação de compostos de sílica bioativos tampona o pH ácido resultante da dissolução e posterior conversão em apatite de monetita e outros compostos de cálcio bioativos na matriz que provê matrizes que são rapidamente colonizadas por células formadoras de osso e resulta em uma rápida e completa osteointegração.

10 Portanto, uma concretização preferida da presente invenção incorpora materiais sintéticos contendo entre 20 % e 95 %, preferivelmente entre 40 % e 90 %, em massa total de monetita, e entre 0 % e 80 %, preferivelmente entre 0 % e 60 % em massa total de outros compostos de cálcio bioativos, e 15 entre 5% e 80 % em massa total de compostos de silício bioativos, e sua obtenção através de reações ácido-base de um ou mais reagentes básicos em excesso e, se necessário, a transformação da fração de brushita obtida em monetita.

Conforme ilustrado, sem caráter restritivo, no exemplo 20 8, as matrizes de monetita da presente invenção podem incorporar substituições com íons metálicos divalentes (M) tais como magnésio, estrôncio, ferro, ou zinco, que estimulam a regeneração óssea ou colonização celular ou diferenciação. Incorporação dessas substituições na fração de monetita pode 25 ser feita mediante incorporação dos íons de metal à reação por adição dos fosfatos monobásicos correspondentes tais como $Mg(H_2PO_4)_2$, $Zn(H_2PCU)_2$, $Sr(H_2PO_4)_2$, ou precursores desses sais, tais como os óxidos correspondentes, hidróxidos ou carbonatos e a quantidade equivalente de ácido ortofosfórico. A reação 30 ácido-base de fosfatos monocálcicos com um ou mais fosfatos de cálcio em excesso, na presença de íons metálicos, resulta na precipitação de brushita ou monetita parcialmente substituídas. A decomposição subsequente da brushita parcialmente substituída resulta em matrizes de monetita 35 parcialmente substituídas contendo outros compostos de cálcio biotativos e/ou compostos de silício bioativos. Os materiais podem ser feitos com diferentes proporções de monetita, monetita parcialmente substituída, e outros compostos de

cálcio bioativos e/ou compostos de silício bioativos. Em uma concretização da presente invenção a monetita parcialmente substituída pode constituir grande parte do material final. Em uma concretização da presente invenção a substituição atômica dos ions de cálcio com o ion divalente dentro da fração de monetita é abaixo de 5 %, e preferivelmente entre 2 % e 4 %, conforme expresso pela fórmula $[Ca_{1-x}M_xHPO_4]$, onde $0 \leq x \leq 0.05$ e onde M é um íon metálico divalente. Esses materiais demonstram osteoindutividade, osteocondutividade melhoradas e biodegradação significativamente reduzida em comparação a monetita não substituída. Portanto, em uma concretização preferida da presente invenção a fração de monetita é parcialmente substituída com Mg, Zn, e/ou Sr. Uma concretização ainda mais preferida da presente invenção, ilustrada sem caráter restritivo no exemplo 13, incorpora compostos de silício bioativos e monetita parcialmente substituída com Mg, Zn, e/ou Sr. Esses materiais apresentam vantagens importantes sobre os materiais não substituídos e materiais livres de silício com relação a capacidades de regeneração óssea biológicas *in vitro* e *in vivo* e dureza e consistência aumentadas.

Conforme ilustrado, sem caráter restritivo, nos exemplos 9 e 10, os materiais da presente invenção podem incorporar "agentes biocompatíveis" que modulam a biodegradação, favorecem formação óssea, e/ou aumentam a resistência do material, tais como e sem caráter restritivo, albumina, ácido hialurônico, agarose, alginato, caseína, colágeno, celulose, elastina, fibrina, gelatina, seda ou de origem sintética tais como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poliuretano, polipropileno, policaprolactona, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, poliamidas, policarbonato, politetrafluoretileno, e derivados ou misturas destes. Alguns desses agentes biocompatíveis podem ser incorporados nas matrizes de monetita durante sua fabricação por meio de sua dissolução na fase aquosa da reação ácido-base, conforme ilustrado sem caráter restritivo no exemplo 9. Neste caso, os agentes em solução são homogeneamente distribuídos nas matrizes de monetita, provendo maior

resistência e/ou melhorando sua capacidade de regenerar osso e/ou biodegradação. Em uma concretização da presente invenção, a concentração de materiais solúveis é inferior a 15%, preferivelmente inferior a 7%, e mais ainda inferior 5% em massa dos materiais contendo monetita.

Em outra concretização da presente invenção, os agentes biocompatíveis são pouco solúveis em meios aquosos e são incorporados na reação ácido-base na forma de suspensões, emulsões, precipitados, pó, granulados ou fibras, conforme ilustrado, sem caráter restritivo no exemplo 10. No caso da inclusão na forma de fibras, estas podem apresentar diâmetros que podem variar entre 10 μm e 2000 μm , preferivelmente entre 50 μm e 1000 μm , e podem constituir até 70% em volume do material contendo monetita. Fibras que se dissolvem rapidamente in vivo favorecem a formação de poros interconectados e colonização celular do material resultante da invasão por células osteoprogenitoras.

A incorporação desses agentes biocompatíveis não apenas fornece as matrizes de monetita com maior resistência como também melhora a reologia da pasta e contribui para uma capacidade maior em regenerar osso. Isso é de aplicação especial na fabricação de monolitos, seja por métodos de conformação tri-dimensional seja por meio de um molde com um formato e tamanho de acordo com a aplicação prevista e/ou exigências do paciente.

Os materiais da presente invenção também podem ser formulados para conter "agentes farmacológicos" que favorecem processos de regeneração óssea conforme ilustrado sem caráter restritivo no exemplo 11. Esses agentes farmacológicos incluem, sem caráter restritivo, compostos sintéticos ou biológicos ou macromoléculas que promovem processos de regeneração óssea e/ou apresentam uma ação terapêutica. Esses agentes farmacológicos incluem antibióticos, agentes anti-inflamatórios e agentes anti-tumorais, bisfosfonatos, ácidos nucléicos, e fatores de crescimento celular tais como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento transformador

$-\beta$ (TGF- β), hormônio do crescimento (GH), fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF1); fator-2 de crescimento semelhante a insulina (IGF2), e/ou fator de crescimento de fibroblasto FGF).

5 Esses agentes farmacológicos podem ser incorporados à reação ácido-base seja como pó ou grânulos. Mais ainda, a fase aquosa da reação ácido-base pode conter estabilizantes e/ou agentes protetores para melhorar a estabilidade dos agentes bioativos, tais como, sem caráter restritivo,
10 trealose, sacarina, rafinose, manitol, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, albumina, colágeno e/ou gelatina. Adição desses estabilizantes e/ou agentes protetores evita a degradação do agente farmacológico durante o tratamento térmico para a conversão de brushita em monetita e provê
15 estabilidade a longo prazo. Alternativamente, os agentes farmacológicos podem ser incorporados aos materiais da presente invenção por impregnação do produto resultante a partir da reação ácido-base, ou impregnação do produto final após o tratamento térmico para a conversão da fração de
20 brushita em monetita. A incorporação de agentes estabilizantes e/ou protetores evita a degradação dos agentes farmacológicos durante a impregnação, tratamento térmico, secagem e/ou armazenamento.

 Conforme ilustrado, sem caráter restritivo, no exemplo
25 12, os materiais que contém monetita podem ser formulados com diferentes graus de porosidade e poros de diferentes tamanhos que podem ser isolados ou comunicados. Isso pode ser feito por meio de agentes incorporadores, resultando na liberação de gás durante a reação ácido-base e endurecimento da pasta.
30 Exemplos desses agentes indutores na formação de poros (porogênicos) incluem, sem caráter restritivo, carbonato de cálcio, bicarbonato de cálcio, bicarbonato de sódio ou peróxido de hidrogênio. A liberação de gás origina materiais que após o endurecimento apresentam uma porosidade induzida,
35 que é, adicionalmente à porosidade intrínseca do material, de até 60% em volume, e com diâmetros de poro que podem variar entre 1 μm e 1000 μm . Além disso, a porosidade dos materiais também podem ser aumentada por aditivos de incorporação à

reação ácido-base que após endurecimento da mistura e sua remoção por dissolução resulta na formação de poros. Exemplos desses aditivos incluem, sem caráter restritivo, sais orgânicos ou inorgânicos, açúcares, alcoóis de açúcar, aminoácidos, proteínas, polissacarídeos ou polímeros solúveis. Mais ainda, os materiais da presente invenção podem ser fabricados com uma porosidade projetada mediante execução da reação ácido-base e endurecimento da pasta em um molde que uma vez removido produz uma macroporosidade definida como poros ou canais com um diâmetro superior a 200 μm .

Os materiais da presente invenção podem ser fabricados como pós, grânulos, ou na forma de monólitos com um formato, tamanho e macroporosidade pré-determinados por um molde. Os reagentes também podem ser incorporados e sistemas de conformação, tais como extrusão ou impressão tridimensional para a fabricação de monólitos tridimensionais com o formato, tamanho e estrutura de poro desejados. Além disso, após endurecimento da pasta como resultado da reação ácido-base, o formato e tamanho do sólido resultante podem ser modificados por fragmentação, abrasão, limagem e/ou pulverização. Este procedimento pode ser realizado antes ou após a conversão da fração de brushita em monetita. Os monólitos feitos a partir dos materiais da presente invenção podem ser aplicados em intervenções cirúrgicas nas quais é necessário reconstruir ou fundir uma massa óssea a um determinado formato e tamanho.

Em outra concretização preferida da presente invenção, o material é produzido na forma de grânulos. O tamanho do grânulo pode variar entre 50 μm e 4000 μm , preferivelmente, o tamanho de grânulo situa-se entre 200 μm e 2000 μm . Essa forma granular é de especial interesse em reconstrução alveolar e outras indicações onde é necessário apresentar novo osso formado dentro de uma cavidade.

Os materiais que contêm monetita e outros compostos de cálcio bioativos e/ou compostos de silício bioativos descritos na presente invenção são biocompatíveis, biodegradáveis, osteoindutivos e osteocondutivos e são de um especial interesse e podem ser aplicados na fabricação de materiais com aplicações médicas e veterinárias, em cirurgia

em traumatologia, cirurgia maxilofacial, cirurgia dentária, cirurgia ortognática, endodontia, oftalmologia, neurocirurgia e/ou processos osteoporóticos. Além disso, conforme ilustrado no exemplo 5, os materiais da presente invenção são úteis para cultura in vitro de células autólogas que quando implantadas no paciente junto com os materiais da presente invenção aceleram o processo de regeneração óssea.

A presente invenção é, além disso, ilustrada pelos 13 exemplos a seguir que são mencionados a título ilustrativo e não apresentam caráter restritivo em seu escopo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Material de monetita e de fosfato tricálcico

Para obter um material feito de monetita e de fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, as diferentes quantidades de reagentes, fosfato alfa- ou beta-tricálcico e fosfato monocálcico $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$, mostrados na tabela 1 são completamente misturados. Foram adicionados à mistura de pós 2,0 ml. De uma solução 0.8 M de ácido cítrico. A pasta resultante é misturada rapidamente por 1 minuto e em seguida é deixada consolidar por 24 horas em uma câmara com 100 % de umidade relativa e a uma temperatura de 50-60 °C a fim de completar a reação ácido-base e decompor a brushita formada em monetita. As pastas endurecidas são secadas a 100-110 °C e granuladas e classificadas com peneiras para coletar frações com o tamanho de partícula desejado. A composição final dos grânulos obtidos é determinada por difração de raio-X (qualitativa) e análise termogravimétrica (quantitativa), sendo indicada na tabela 1.

30

Tabela 1

Quantidade de reagentes			Composição de fase final	
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (g)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (g)	Citric A, 0,8 M (mL)	% massa CaHPCv	% massa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
(β) 1 -26	0,96	2,0	96 %	(β) 4 %
(β) 1,42	0,80	2,0	82 %	(β) 18 %

(β) 1 -62	0,60	2,0	63 %	(β) 37 %
(β) 1,74	0,48	2,0	41 %	(β) 59 %
(a) 1,42	0,80	2,0	84 %	(a) 16 %
(a) 1,74	0,48	2,0	43 %	(a) 57 %

EXEMPLO 2: Material de monetita e de fosfato octacálcico

Para obter um material composto de 80-85 % em massa de monetita e 15-20 % em massa de fosfato octacálcico [Ca₈H₂(PO₄)₆.5H₂O], 0,60 g de fosfato monocálcico e 1,62 g de fosfato octacálcico são totalmente misturados. São adicionados à mistura de pós 2,0 ml de uma solução 0.8 M de ácido cítrico. A pasta resultante é rapidamente misturada por 1 minuto e em seguida deixada consolidar por 24 horas em uma câmara com 100 % de umidade relativa e a uma temperatura de 50-60 °C a fim de completar a reação ácido-base e decompor a brushita formada em monetita. A pasta endurecida é secada ao ar e granulada e classificada com peneiras para coletar frações com o tamanho de partícula desejado. O granulado obtido é esterelizado com uma dose de 25 kGy de radiação gama.

EXEMPLO 3: Material de monetita e hidroxiapatita

Para obter um material composto de 80-85 % em massa de monetita e 15-20 % em massa de hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], 0,88 g de fosfato monocálcico e 1,34 g de hidroxiapatita são totalmente misturados. São adicionados à mistura de pós 2,0 ml de uma solução 0.8 M de ácido cítrico. A pasta resultante é rapidamente misturada por 1 minuto e em seguida deixada consolidar por 24 horas em uma câmara com 100 % de umidade relativa e a uma temperatura de 50-60 °C a fim de completar a reação ácido-base e decompor a brushita formada em monetita. A pasta endurecida é secada ao ar e granulada e classificada com peneiras para coletar frações com o tamanho de partícula desejado. O granulado obtido é esterilizado com uma dose de 25 kGy de radiação gama.

EXEMPLO 4: Solubilidade de materiais de monetita contendo compostos de cálcio bioativos.

Para determinar a taxa de dissolução de matrizes de monetita contendo diferentes proporções de monetita e compostos de cálcio bioativos, 100 mg de cada material, previamente moído a um tamanho de partícula inferior a 100 μm são colocados em frascos. A cada frasco são adicionados 100 mL de uma solução tamponada com pH 6,0 (100 mM KCOOCH_3 ; ajustada com KOH e/ou HCOOCH_3). Os frascos são rolhados e colocados em um sacudidor orbital a 36,5 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Os sobrenadantes foram em seguida filtrados através de uma membrana Teflon (0,45 μm) e a concentração de cálcio (Ca) no filtrado foi determinada por espectrofotometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente. Três réplicas foram feitas por material. A concentração média de Ca dissolvido para cada material após incubação na solução tamponada aparece indicada na tabela 2. Para cada um dos diferentes fosfatos de cálcio, a quantidade de Ca dissolvido a partir dos grânulos, e, portanto, a solubilidade do material, depende diretamente da razão monetita/fosfato de cálcio. Para materiais contendo diferentes fosfatos de cálcio dentro das matrizes de monetita, a solubilidade depende do tipo de fosfato de cálcio na seguinte ordem: fosfato octacálcico > fosfato alfa-tricálcico > fosfato beta-tricálcico > hidroxiapatita.

Tabela 2

Composição final		Ca dissolvido em 30 min (mg/L)
% massa de CaHPO_4	% massa de fosfato de cálcio	
96 %	4 % $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	98 \pm 1
82 %	18 % $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	85 \pm 1
63 %	37 % $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	70 \pm 2
41 %	59 % $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	62 \pm 2
84 %	16 % $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	90 \pm 1
81 %	19% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	78 \pm 2
60 %	40 % $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	64 \pm 2
81 %	19 % $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96 \pm 1

65%	35 % $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	93 ± 1
-----	-----------------------------------------------------------------------	--------

EXEMPLO 5: Colonização celular e regeneração óssea de materiais de monetita contendo compostos de cálcio bioativos.

Para determinar a capacidade de regeneração óssea de diferentes matrizes de monetita contendo compostos de cálcio bioativos, as matrizes foram incubadas na presença de células tronco de medula óssea de coelho. Resumidamente, células de medula óssea foram recoletadas e suspensas em 10 ml de meio essencial mínimo Earl com glutamina e aminoácidos não essenciais e suplementadas com 1 mM de pivurato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 60 mg/ml de sulfato de canamicina e 15% de soro fetal bovino. Uma suspensão de 1×10^5 células foi adicionada a cavidades contendo 0,5 g do material de teste na forma de grânulos entre 200 µm e 2000 µm de diâmetro. A colonização celular do material é determinada após 7 dias de incubação pelo método indireto MTT (de acordo com Mosman T 1983 J. Immunol. Meth. 65: 55-63). Além disso, para determinar a capacidade de formação óssea foram implantados diferentes materiais em um coelho modelo com um orifício de 1 cm de diâmetro no seu crânio. A avaliação do material foi feita seis semanas após implante, depois do sacrifício e autópsia do animal. Um dos materiais populados celulares também foi implantado no modelo de regeneração óssea. A tabela 3 mostra os dados do modelo de colonização celular e a análise in vivo das diferentes matrizes contendo compostos de cálcio bioativos. Os efeitos observados podem ser classificados como "muito abundante: +++++", "abundante: ++++", "moderado: +++", "escasso: ++", "nenhum: +". A incorporação dos compostos de cálcio bioativos resulta em uma melhora da capacidade de suportar crescimento celular e capacidade de regeneração óssea.

Tabela 3

Composição de fase final		Crescimento celular [determinado por MTT]	Regeneração óssea [análise in vivo]
CaHPO_4 (% massa)	Fosfato de cálcio (% massa)		

98 %	2 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	++	++
82 %	18 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	++++	++++
82 %	18 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂ + células	Não determinado	+++++
63 %	37 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	++++	++++
41 %	59 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	+++	+++
84 %	16 % α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	++	+++
0 %	100 % β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	++	++
81 %	19%Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	++++	+++
60 %	40 % Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	++++	+++
0 %	100%Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	++	++
81 %	19 % Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .5H ₂ O	++++	+++
0 %	100%Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .5H ₂ O	++	+

EXEMPLO 6: Monetita, wollastonita e material de sílica gel hidratado com ou sem fosfato de beta-tricálcico.

Para obter um material composto de 38-43 % em massa de monetita, 34-39 % em massa de alfa- wollastonita [α -CaSiO₃] e 21-26 % em massa de sílica gel hidratado [$-\text{Si}(\text{OH})_2-\text{O}$]_n, 2.66 ml de uma solução aquosa de ácido ortofosfórico (3,5 M) e ácido cítrico (0,8 M) foram adicionados a 2,22 g de alfa-wollastonita com um tamanho de partícula inferior a 50 μm . Os componentes foram misturados totalmente por 1 minuto para obter uma pasta. Alternativamente, para obter um material com 38-43 % em massa de monetita, 33- 38 % em massa de fosfato de beta-tricálcico, 0-2% em massa de alfa-wollastonita, e 21-26 % em massa de sílica gel amorfo hidratado, 2,66 ml de uma solução aquosa de ácido ortofosfórico (3,5 M) e ácido cítrico (0,8 M) foram adicionados a uma mistura contendo 1,11 g de alfa- ou beta-wollastonita e 1,1 1 g de fosfato beta-tricálcico, ambos como pós com tamanho de partícula inferior a 50 μm . Os componentes foram misturados totalmente por 1 minuto para obter uma pasta.

As pastas resultantes das diferentes composições foram derramadas em moldes de silicone no formato de discos de 20 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. Os discos formatados obtidos após endurecimento da pasta foram deixados por 24 hs em uma câmara a 20-30 °C com 100% de umidade relativa para

completar a reação ácido-base. Os discos foram secados em um forno a 100-110 °C para decompor a brushita em monetita e eliminar a água absorvida pela sílica gel. A composição de fase dos sólidos obtida é determinada por difração de raio-X e análise térmica conforme indicado na tabela 4.

A bioatividade *in vitro* dos materiais obtidos é comparada com aquela de um material com o mesmo formato de disco composto por 40 % em massa de monetita e 60 % em massa de fosfato beta-tricálcico. Para tanto, os discos foram incubados em diferente intervalos de tempo em um fluido fisiológico (pH 7,3 a 36,5 °C) e o tempo registrado para os primeiros sinais, e a cobertura total da superfície com apatita globular (de acordo com Kokubo e Takadama 2006 Biomaterials 27:2907-29). A incorporação de alfa-wollastonita e sílica gel hidratado às matrizes de monetita resulta em um aumento da bioatividade *in vitro* dos materiais reusltantes conforme indicado na tabela 4.

Tabela 4

20

Composição de fase do material	Primeiros sinais de cobertura	Cobertura total
(% em massa)		
40% Monetita/ 37% fosfato beta-tricálcico / 23% de sílica gel hidratado	6 h	24 h
40 % Monetita / 36% fosfato beta-tricálcico / 1% beta-wollastonita/ 23% sílica gel hidratado	12 h	48 h
40% Monetita/ 60% fosfato beta-tricálcico	48 h	96 h

EXEMPLO 7: Material de monetita, vidro bioativo e de sílica gel hidratado com ou sem fosfato beta-tricálcico.

Para obter um material composto de 41-45 % em massa de monetita, 26-30% de vidro bioativo de composição $70\text{SiO}_2\text{-}30\text{CaO}$ e 27-31 % de sílica gel hidratado $[-\text{Si}(\text{OH})_2\text{-O-}]_n$, 1,54 g de vidro bioativo com um tamanho de partícula inferior a 100 μm , e 0,96 g de fosfato monocálcico são misturados. A esta mistura de pós, são adicionados 2,71 ml de uma solução aquosa de 1.0 M ácido glicólico e totalmente misturados por 1 minuto para obter uma pasta.

Alternativamente, para obter um material composto de 41-45 % em massa de monetita, 12-16% de fosfato beta-tricálcico, 12-16 % de vidro bioativo, e 27-31 % de sílica gel amorfo hidratado, 1,27 g de composição de vidro bioativo $70\text{SiO}_2\text{-}30\text{CaO}$ e um tamanho de partícula inferior a 100 μm , 0,40 g de fosfato beta-tricálcico com um tamanho de partícula inferior a 100 μm , e 1,04 g de fosfato monocálcico foram misturados. À mistura de pós, foram adicionados 2,71 ml de uma solução aquosa de 0,8 M ácido cítrico e totalmente misturados por 1 minuto para obter uma pasta.

As pastas resultantes foram derramadas em moldes de silicone no formato de discos com 20 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. Os moldes preenchidos foram deixados por 48hs em uma câmara a 50-60 $^\circ\text{C}$ e com 100% de umidade relativa para completar a reação ácido-base e decompor a brushita obtida em monetita. Os discos endurecidos foram retirados dos moldes e secados em um forno a 100-110 $^\circ\text{C}$ para eliminar a água absorvida pela sílica gel. Os sólidos obtidos foram caracterizados por difração de raio-X e análise térmica. Os discos obtidos a partir de ambos os materiais foram incubados por diferentes intervalos de tempo em um fluido fisiológico simulado (pH 7,3 a 7,4 e 36,5 $^\circ\text{C}$) e o tempo registrado para os primeiros sinais e a cobertura total da superfície com apatita globular (de acordo com Kokubo e Takadama 2006 Biomaterials 27:2907-29). Conforme ilustrado na tabela 5, a bioatividade *in vitro* é maior para materiais contendo vidros bioativos.

Tabela 5

Composição de fase do material (% em massa)	Primeiros sinais de cobertura	Cobertura total
43 % Monetita/ 28 % vidro bioativo / 29 % sílica gel	3 h	24 h
43 % Monetita/ 14 % fosfato beta-tricálcico/ 14 % vidro bioativo / 29 % sílica gel	3 h	24 h
100 % Monetita	96 h	120 h

EXEMPLO 8: Material de monetita parcialmente substituído com íons metálicos e fosfato tricálcico

Para obter materiais compostos por 80-85 % em massa de monetita parcialmente substituída com magnésio ou por zinco, e por 15-20 % em massa de fosfato beta-tricálcico, foram bem misturados 0,68 g de fosfato monocálcico e 1,54 g de fosfato beta-tricálcico com tamanho de partícula inferior a 100 μm . À mistura de pós, foram adicionados 2,0 ml de uma solução de ácido glicólico 1.0 M e 0,4 M $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ou $\text{Zn}(\text{H}_2\text{PCU})_2$. A pasta resultante foi misturada totalmente por 1 minuto e derramada em moldes de silicone no formato de discos com 15 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade para obter discos com essas dimensões. Os discos foram deixados por 24hs e uma câmara a 50-60 $^\circ\text{C}$ e com 100% de umidade relativa para completar a reação ácido-base e decompor a brushita produzida em monetita. Os discos foram retirados dos moldes e deixados secar ao ar. Os materiais resultantes, de acordo com a análise por difração de raio-X, análise termogravimétrica, microscopia de elétrons para rastreamento e microanálise por espectroscopia de energia dispersiva de raio-X, são compostos por 80-85 % em massa de monetita parcialmente substituída por magnésio ou por zinco, e 15-20 % em massa de fosfato beta-tricálcico. A substituição de Ca por Mg e Zn no retículo de monetita, de acordo com a microanálise de grânulos desta fase

resulta em 4 % de substituição atômica de Ca por Mg e em 3% de uma substituição atômica de Ca por Zn respectivamente.

A capacidade dos materiais substituídos com Zn ou com Mg para promover adesão celular é determinada pelo ensaio 5 Alamar Blue (de acordo com Nakayama et al. 1997 J. Immunol. Methods 204:205-208). Resumidamente, os discos são esterilizados com radiação gama (25 kGy) e quatro discos de cada um dos materiais (substituídos com Zn ou com Mg, ou não 10 substituídos), ou quatro discos Thermanox™ de igual diâmetro (como um controle), são colocados em placas de 24 cavidades. Para cada cavidade é adicionado 1 ml de uma suspensão 1.4×10^5 células/mL em MEM completo (meio 15 essencial mínimo) de uma cultura de células de fibroblastos humanos primária. As placas são incubadas a 37 ± 1 °C por um dia e os meios removidos juntos com aquelas células que ainda permaneciam em suspensão. Às cavidades contendo os discos e 20 células aderidas, foi adicionado 1 ml de uma solução de azul Alamar (diluição 1:10 de azul Alamar, Serotec, BUFO12A, com MEM sem vermelho fenólico) e as placas são incubadas por 4 horas a 37 ± 1 °C. Para cada ponto de leitura é incluído um 25 branco em vazio mediante substituição da suspensão celular com 1 ml da solução de azul Alamar. A partir de cada cavidade 4 alíquotas de 100 μ l são transferidas para cavidades de uma placa de 96 cavidades a fim de determinar a densidade óptica em 570 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm. 30 As cavidades contendo os materiais e as células aderidas são lavadas com uma solução salina tamponada de fosfato e 1 ml de MEM completo é adicionado para continuar a incubação a 37 ± 1 °C até a próxima leitura do ponto no tempo. As leituras são feitas nos dias 1, 4, 7, 14, e 21. A densidade óptica medida 35 é diretamente proporcional ao número de cavidades viáveis aderidas na superfície dos materiais testados. A tabela 6 mostra as leituras de densidade óptica para cada amostra e período de incubação. Os três materiais testados mostraram uma adesão celular inicial de 60% comparado com Thermanox™, e proliferação considerável durante o período de incubação. Para todos os períodos de tempo os números máximos de células foram encontrados associados ao material substituído com Mg,

seguido pelo material que substitui com Zn, e em uma escala menor o material não substituído.

Tabela 6

5

Material	Densidade óptica para cada tempo de incubação (dias)				
	1	4	7	14	21
Não-substituído	0,178(0,008)	0,307(0,010)	0,290(0,019)	0,330(0,017)	0,315(0,018)
com Mg	0,222(0,009)	0,361(0,016)	0,387(0,020)	0,393(0,012)	0,401(0,020)
comZn	0,197(0,011)	0,324(0,019)	0,346(0,021)	0,366(0,014)	0,387(0,015)
Thermanox™	0,281(0,016)	0,468(0,018)	0,459(0,025)	0,410(0,016)	0,451(0,016)

EXEMPLO 9: Material contendo agentes biocompatíveis incorporados em solução para obter materiais que incorporam diferentes agentes biocompatíveis solúveis,

10

Colágeno tipo I, hialuronato de sódio, ou quitosana são dissolvidos em concentrações de 0,5 % em massa em uma solução 0.8 M de ácido cítrico. À essas soluções são adicionadas diferentes proporções de fosfato monocálcico $[Ca(H_2PO_4)_2]$ com fosfato beta-tricálcico $[\beta-Ca_3(PO_4)_2]$, hidroxiapatita 15 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ou dióxido de silício $[CaMg(SiO_3)_2]$. As pastas resultantes são misturadas totalmente por 1 minuto e colocadas em moldes de silicone com 5 mm de diâmetro e 12 mm de profundidade, ou 15 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, para executar discos e cilindros dessas dimensões. Os 20 cilindros e discos são deixados por 24 hs em uma câmara a 20-30 °C e com 100% de umidade relativa para completar a reação ácido-base. Os discos são deixados secar ao ar e foram retirados dos moldes de silicone. Para obter os materiais finais, a fração de brushita dos materiais obtidos é 25 transformada em monetita mediante tratamento térmico seco a 60 °C por 2 horas.

A resistência a compressão foi determinada nos cilindros com 5 mm de diâmetro em um dispositivo bioaxial

Instron™ 851 1. Os testes foram realizados a temperatura ambiente e a uma velocidade de 1 mm/min até a fratura da amostra.

A determinação da capacidade de sustentar o crescimento celular foi feita pela cultura celular da linhagem de célula HOS semelhante a osteoblasto (ECACC no. 87070202) sobre os discos de 15 mm de diâmetro e observação de colonização celular por microscopia e ensaio de redução MTT (de acordo com Mosman T 1983 J. Immunol. Meth. 65: 55-63; y Slater T.F. et al. 1963 Biochim. Biophys. Acta 77:383-93). As observações foram feitas em diferentes intervalos de tempo por 7 dias.

A determinação da capacidade de regenerar o osso foi feita por implante em defeitos ósseos artificiais em tibia de ratos e subsequente avaliação histológica dos segmentos ósseos contendo os sítios de implante após sacrifício dos animais em 7, 30 e 120 dias. Os materiais para implantação foram obtidos dos fragmentos resultantes da resistência para ensaio de compressão após granulação em grânulos com um tamanho entre 200 µm e 2000 µm e esterilização com radiação gama (25 kGy).

Os materiais obtidos, sua resistência à compressão, capacidade de sustentar o crescimento celular e capacidade de regenerar osso em um modelo animal aparecem indicados na tabela 7. A incorporação desses agentes biocompatíveis em matrizes de monetita resulta em uma melhora de sua capacidade de sustentar o crescimento celular e regenera o osso. Os efeitos observados podem ser classificados como "muito abundante: +++++", "abundante: ++++", "moderado: +++", "fraco: ++", "nenhum: +".

30

Tabela 7

% em massa componentes inorgânicos	% em massa agents biocompatíveis	Resistência (MPa)	Adesão e proliferação celular	Regeneração óssea
CaHPCv 95-100 %	Sem aditivos	4±1	++	++

$\text{CaHP0}_4/\text{p-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 80-85%/20-15%	Sem aditivos	7±1	++	+++
$\text{CaHPCv/p-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 80-85%/20-15%	0,5% de Hialuronato	11±2	++++	++++
$\text{CaHPCv/p-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 80-85%/20-15%	0,5% Colágeno	10±1	++++	++++
$\text{CaHPCv/p-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 65-70% / 35-30%	0,5% quitosana	9±2	+++	+++
$\text{CaHP0}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 80-85%/ 20-15%	Sem aditivos	6±1	++	+++
$\text{CaHP0}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 80-85%/20-15%	0,5% Hialuronato	8±1	++++	++++
$\text{CaHP0}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 65-70% / 35-30%	0,5% Colágeno	7±1	++++	++++
$\text{CaHP0}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 80-85%/20-15%	0,5% quitosana	7±1	+++	+++
$\text{CaO},97\text{MgO},03\text{HP0}_4/\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2/\text{Silica gel}$ 80-85% /15-13%/5-2%	Sem aditivos	5±2	+++	++++
$\text{CaO},97\text{MgO},03\text{HP0}_4/\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2/\text{Silica gel}$ 80-85% /15-13%/5-2%	0,5% Hialuronato	7±2	++++	++++
$\text{CaO},97\text{MgO},03\text{HP0}_4/\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2/\text{Silica gel}$ 65-70% / 32-29% / 31%	0,5% Colágeno	6±1	+++++	+++++

CaO, 97MgO, 03HPO4/ CaMg(SiO3)2/ Silica gel 80-85% /15-13%/5- 2%	0,5% quitosana	7±1	++++	++++
------------------------------------------------------------------------------	-------------------	-----	------	------

EXEMPLO 10: Monólitos contendo monetita e fibras de agentes biocompatíveis

Para obter materiais que incorporam diferentes agentes biocompatíveis orgânicos como fibras, diferentes fibras foram produzidas do colágeno tipo I ou alternativamente do polilactídeo-poliglicólico (50:50), por meio de técnicas de eletro-fiação a partir das soluções aquosas para colágeno e a partir da solução de dimetilformamida para o polilactídeo-poliglicólico. As fibras apresentam um diâmetro final entre 10 µm e 1000 µm dependendo dos parâmetros usados na sua fabricação. As fibras são intimamente misturadas com 1,55 g de fosfato monocálcico [Ca(H₂PO₄)₂] e, 1,45 g de alfa-wollastonita [α-CaSiO₃] ou alternativamente 1,46 g de vidro bioativo da composição 70SiO₂-30CaO (moles por cento), e 0,30 g de fosfato beta-tricálcico [β-Ca₃(PO₄)₂], e adicionados às misturas 3,0 ml e 1,9 ml, respectivamente de solução 0.8 M ácido cítrico. As pastas resultantes são totalmente misturadas por 1 minuto e derramadas em moldes de silicone para o formato de um osso e deixadas por 24hs em uma câmara com 100% de umidade relativa e a temperatura de 20-30 °C. Uma vez endurecidos, os diferentes materiais são deixados secar ao ar. Para obter os produtos finais, a fração de brushita dos materiais é transformada em monetita por tratamento térmico a 100 °C durante 2 horas. Os materiais resultantes contêm 55-65 % em massa de monetita, 15-30 % em massa de silica gel e 22-33 % de alfa-wollastonita ou 9-12 % de vidro bioativo (70SiO₂-30CaO), e aproximadamente 20% em volume de colágeno tipo I ou fibras polilactídeo-poliglicólico. A incorporação das fibras resulta em uma resistência maior e favorece a colonização celular.

EXEMPLO 11: materiais de monetita e fosfato beta-tricálcico com antibiótico.

Para obter materiais de monetita e fosfato beta-tricálcico com antibióticos, 2,11g de fosfato beta-tricálcico com um tamanho de partícula inferior a 100 µm, 0,11 g de ceftriaxona sódica, e 25 mg de trealose foram totalmente misturados. Foram adicionados à mistura, 1,53 ml de uma solução de 2.0 M ácido ortofosfórico e a pasta resultante misturada totalmente por 1 minuto e compactada em moldes de silicone de 15 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade para produzir discos dessas dimensões. Os discos foram deixados nos moldes por 24hs em uma câmara com 100% de umidade relativa e uma temperatura de 50-60°C para completar a reação ácido-base e decompor a brushita formada em monetita. Os discos foram removidos dos moldes e esterilizados com raios gama.

Para estudar a liberação do antibiótico foram colocados discos em frascos. À metade dos discos foi adicionado um tampão fosfato com pH 7,4 (8 mM K₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) e à outra metade dos discos um tampão fosfato pH 4,0 (1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 M KCl), com uma razão volumétrica sólido/líquido de 1 :10. Os frascos foram colocados em um sacudidor orbital ajustada a 37 °C durante os 15 dias do estudo. A determinação da quantidade de ceftriaxona liberada ao meio é feita por espectroscopia UV e por comparação com uma curva padrão. Durante as primeiras sete horas do estudo as determinações foram feitas a toda hora, para o Segundo ao quarto dia a cada 24hs, e no período restante a cada 3 dias no máximo. Para cada determinação todo o líquido foi removido e substituído por tampão fresco. Os perfis de liberação de ceftriaxona com pH 4.0 e 7.4 aparecem indicados na tabela 8.

Tabela 8

35

Tempo (horas)	Ceftriaxona acumulada, mg/L	
	pH 4.0	pH 7.0
1,4	714	706

2,8	970	1014
3,7	1007	1091
5,5	1064	1194
6,4	1112	1246
24,8	1275	1477
49,2	1388	1698
73,6	1494	1904
144,8	1633	2336
216,0	1778	2778
312,6	1909	2953

EXEMPLO 12: Monólitos com colágeno e porosidade induzida

Para obter materiais com 80-85 % em massa de monetita,
 5 15-20 % em massa de fosfato beta-tricálcico, 0,45 % em massa
 de colágeno, e diferentes graus de porosidade induzida, 0,1 %
 a 3 % em massa de carbonato de cálcio foi adicionado como
 agente formador de poro (porogênico) a uma mistura de 1,42 g
 de fosfato beta-tricálcico e 0,80 g de fosfato monocálcico. À
 10 mistura de pós, foram adicionados 2,0 ml de uma solução 0.8 M
 ácido cítrico contendo 0,5 % massa/vol. de colágeno tipo I.
 A pasta resultante é misturada totalmente por 1 minuto,
 derramada em um molde cilíndrico com 3 mm de diâmetro e 6 mm
 de profundidade e deixada consolidar por 12hs em uma câmara
 15 com 100% de umidade relativa e a uma temperatura de 20-30 °C.
 Uma vez endurecidos, os diferentes materiais foram deixados
 secar ao ar. Para obter os produtos finais, a fração de
 brushita dos materiais obtidos foi transformada em monetita
 mediante tratamento térmico a 45 °C durante 2 horas. Os
 20 materiais resultantes mostram uma porosidade induzida,
 adicionalmente à microporosidade natural do material, até 50%
 e um tamanho de poro entre 50 µm e 800 µm. Análise da
 capacidade dos materiais resultantes para sustentar o
 crescimento celular é feita por cultura de células por 7 dias
 25 da linhagem de células semelhante a osteoblastos HOS (ECACC
 no. 87070202), observação microscópica da colonização celular
 e ensaio de redução MTT (de acordo com Mosman T 1983 J.
 Immunol. Meth. 65: 55-63; y Slater T. F. et al. 1963 Biochim.

Biophys. Acta 77:383-93). As observações foram feitas em diferentes momentos por 7 dias.

Além disso, a eficácia dos materiais obtidos em regeneração óssea é avaliada em defeitos ósseos artificiais em tibia de ratos. Para tanto foram usados 90 ratos saudáveis (Rattus norvegicus, Holtzman, ~ 200g). Grupos de 30 animais foram usados para cada ponto no tempo (7, 30 e 120 dias). Três animais de cada grupo recebeu implantes bilaterais do mesmo material experimental em defeitos de 3mm criados na seção média (diáfise) da tibia. Em três animais de cada grupo os defeitos artificiais foram deixados vazios como controle. Os animais foram sacrificados por injeção letal com tiopental após 7, 30 e 120 dias, e os segmentos ósseos contendo o controle e sítios de implante forem revestidos. Os segmentos ósseos foram fixados em solução Bouin, lavados, descalcificados, desidratados e embebidos em parafina. Seções de espessura 6 µm seriais foram cortadas e impregnadas com hematoxilina e eosina para exame histológico. O grau de nova formação óssea é avaliado e classificado como "muito abundante: +++++", "abundante: ++++", "moderado: +++", "fraco: ++", "nenhum: +". Os materiais obtidos, sua capacidade de sustentar proliferação celular e a análise de sua capacidade em regenerar osso em modelo animal de rato estão indicados na tabela 9. A incorporação de porosidade dos materiais resulta em um aumento da capacidade de suportar a proliferação celular e regenerar osso.

Tabela 9

Materiais	% em volume de	Adesão celular	Regeneração
% em massa de monetita / % fosfato tricálcico	Porosidade induzida	extensão & proliferação	óssea
100 %	0 %	++	++
80-85 % / 20-15%	0 %	+++	+++
65-70 % / 35-30	0 %	+++	+++

%			
80-85 % / 20-15%	10 %	++++	++++
65-70 % / 35-30 %	10 %	++++	++++
80-85 % / 20-15%	20 %	++++	++++
65-70 % / 35-30 %	20 %	++++	+++
80-85 % / 20-15%	30 %	++++	++++
65-70 % / 35-30 %	50 %	++++	+++

EXEMPLO 13: Materiais de monetita, substituídos ou não com Mg, Zn e Sr, contendo compostos de silício bioativos e/ou compostos de cálcio bioativos.

5 Para determinar o efeito benéfico da incorporação de compostos de silício bioativos, foram produzidas diferentes matrizes de monetita, substituídas ou não com Mg, Zn e Sr listadas na tabela 10, e comparadas com matrizes sem compostos de silício bioativos com relação ao seu

10 comportamento in vivo. Resumidamente, as matrizes de monetita foram obtidas por reações entre um componente básico consistindo em fosfato beta-tricálcico e/ou alfa-wollastonita e/ou vidro bioativo de composição $70\text{SiO}_2\text{-}30\text{CaO}$, com uma solução ácida de ácido fosfórico em quantidade

15 estequiométrica ou pequena. Para a síntese de monetitas substituídas com ions Zn ou Mg, as quantidades necessárias de $2\text{ZnCO}_3\text{-}3\text{Zn(OH)}_2$, $4\text{MgCO}_3\text{-Mg(OH)}_2$ ou SrCO_3 foram respectivamente dissolvidas na solução de ácido fosfórico. Foi utilizada uma taxa líquida/pó entre 0,8 e 1,2. Após a

20 adição do líquido ao pó, a pasta resultante foi misturada totalmente por 30 segundos e deixada consolidar por 24 horas em uma câmara com 100% de umidade relativa a 60°C . Uma vez endurecidos, os diferentes materiais foram secados a 60°C . Os materiais foram manualmente moídos e peneirados. As

25 frações de grânulos entre $250\ \mu\text{m}$ e $1000\ \mu\text{m}$ foram usadas para o ensaio in vivo. Antes de sua implantação os materiais foram esterilizados a 121°C e 1 atm de sobrepressão por 20 minutos.

Para o ensaio in vivo os grânulos foram implantados em ossos de ovelha. Foram feitos seis furos de 13 mm de profundidade por 8 mm de diâmetro no osso umeral direito e esquerdo, tibia e fêmur de toda ovelha. Foram utilizadas no total 12 ovelhas. Cada material de teste foi randomicamente implantado em seis defeitos ósseos e seis furos randomicamente selecionados foram deixados vazios e usados como controle. A regeneração óssea e resorção dos materiais implantados em todo defeito foi avaliada por raio-X, ressonância magnética nuclear, e exame histológico 12 semanas após a implantação. O grau de nova formação óssea, regeneração óssea, foi avaliado e classificado como "muito abundante: +++++", "abundante: ++++", "moderado: +++", "fraco: ++", "nenhum: +" e indicado na tabela 10. A incorporação de compostos de silício nas matrizes contendo monetita da presente invenção, e especialmente naquelas nas quais a monetita é parcialmente substituída com Mg, Zn ou Sr apresenta um evidente efeito benéfico em regeneração óssea.

Para determinar a consistência dos grânulos formados e em certa extensão sua dureza, 2 g de grânulos na faixa entre 250 e 1000 microns de diâmetro foram colocados dentro das garrafas de polietileno contendo uma bola de borracha. As garrafas foram agitadas em um sacudidor orbital por 30 minutos e os materiais obtidos peneirados para determinar a fração de partículas menores do que 250 microns. Os materiais com a máxima proporção de partículas remanescentes superior a 250 microns foram considerados como tendo maior consistência e dureza. O grau de consistência, e indiretamente dureza dos materiais foi classificado como "muito consistente: +++++", "consistente: ++++", "moderadamente consistente: +++", "macio: ++", "muito macio: +" e indicado na tabela 10. A incorporação de compostos de silício e substituição parcial da matriz de monetita com íons de Mg, Zn ou Sr apresentou uma contribuição positiva quanto à consistência e dureza dos materiais resultantes.

Tabela 10

Composição de fase final					Consistênc ia de grânulo	Regeneraç ão óssea
$Ca_{1-x}M_xHPO_4$			Compostos de cálcio bioativo e de silício			
			Fosfato			
100%	-	0	-	-	++	++
80%	-	0	20 % (β - $Ca_3(PO_4)_2$)	-	+	+++
80%	-	0	14.4 % (β - $Ca_3(PO_4)_2$)	5.6 % Sílica gel	+++	++++
80%	Zn	0.03	20 % (β - $Ca_3(PO_4)_2$)	-	+++	+++
60%	-	-	-	5.6% α - $CaSiO_3$ 34.4 % Sílica gel	+++++	+++++
60%	Mg	0.03	-	5.6% α - $CaSiO_3$ 3.4% Sílica gel	+++++	++++
60%	Mg	0.03	7 % (β - $Ca_3(PO_4)_2$)	33 % Sílica Gel	++++	+++++
60%	Mg	0.03	7 % $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$	33 % Sílica Gel	++++	+++++
60%	-	-	-	10% vidro 70S30C 30 % Sílica gel	++++	++++
60%	Mg	0.03	-	10% vidro 70S30C 30 % Sílica gel	++++	+++++
60%	Sr	0.03	-	10% vidro 70S30C 30 % Sílica Gel	+++++	+++++
FUROS VAZIOS	-	-	-	-	-	+

REIVINDICAÇÕES

1. Material sintético caracterizado pelo fato de
5 compreender:

- (a) 20 % a 95 % em massa total de monetita [$\text{Ca}_{1-x}\text{M}_x\text{HPO}_4$], onde $0 \leq x \leq 0,05$ e onde M é um íon metálico divalente,
- 10 (b) entre 5% e 80 % em massa total de compostos de silício bioativos selecionados de wollastonita, metasilicatos de cálcio misturados, ortosilicato de cálcio, silicato tricálcico, e géis e vidros de sílica bioativos e/ou combinações destes;
- 15 (c) entre 0 % e 60 % em massa total de compostos de cálcio bioativos além de monetita e selecionados dos fosfatos de cálcio;
- 20 (d) e, opcionalmente agentes biocompatíveis, agentes farmacológicos e/ou agentes protetores.

2. Material, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de "x" ser igual a zero.

3. Material, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o íon metálico divalente (M) ser
25 magnésio, estrôncio, bário, ferro e/ou zinco.

4. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de os compostos de cálcio bioativos ser fosfatos de cálcio selecionados de brushita, fosfato tricálcico,
30 hidroxapatitas e fosfato octacálcico e combinações destes.

5. Material, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o fosfato de cálcio ser uma hidroxapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], sendo que o cálcio é parcialmente substituído por sódio, potássio, estrôncio,
35 magnésio e/ou zinco; o fosfato é parcialmente substituído por hidrogênio-fosfato, carbonato, silicato; e/ou o hidroxila é parcialmente substituído por flúor, cloro ou carbonato.

6. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de o composto de silício bioativo ser alfa-wollastonita e/ou beta-wollastonita [α - or β -CaSiO₃].

5 7. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de o composto de silício bioativo ser um silicato de cálcio [CaM(SiO₃)₂] que contém um íon metálico divalente (M) selecionado de magnésio, estrôncio, bário, ferro e/ou
10 zinco.

8. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de um composto de silício de cálcio bioativo ser um vidro bioativo nos sistemas SiO₂-CaO, SiO₂-CaO-P₂O₅, SiO₂-CaO-ZnO
15 , SiO₂-CaO-MgO, SiO₂-CaO-P₂O₅-ZnO, e/ou SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO.

9. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de um composto de silício bioativo ser um sílica gel. .

10. Material, de acordo com qualquer uma das
20 reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de incorporar agentes biocompatíveis em sua composição.

11. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores de 1 a 10, caracterizado pelo fato de incorporar agentes farmacológicos em sua
25 composição.

12. Material, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de estar na forma de grânulos entre 50 μ m e 4000 μ m.

13. Material, de acordo com qualquer uma das
30 reivindicações anteriores de 1 a 12, caracterizado pelo fato de estar no formato de monólitos tridimensionais com o formato e tamanho determinados por um defeito ósseo.

14. Método para obter materiais conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores de 1 a 13,
35 caracterizado pelo fato de compreender:

- (a) uma reação ácido-base em um meio aquoso no qual o componente ácido é ácido ortofosfórico ou seus sais monobásicos de

5 metais alcalinos ou alcalino-terrosos, e de o
componente básico ser constituído por um ou
mais compostos de silício bioativos, e
opcionalmente por compostos de cálcio
bioativos, que estão presentes em excesso; e
(b) decomposição por tratamento térmico da fração
de brushita obtida da reação ácido-base
formando monetita.

10 15. Composição, compreendendo materiais, conforme
definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 13,
caracterizada pelo fato de incorporar células animais ou
humanas.

15 16. Aplicação dos materiais, conforme definido em
qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, ou da
composição, conforme definido na reivindicação 15,
caracterizada pelo fato de se destinar à fabricação de
materiais de regeneração óssea.