

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.06.14</b>	(73) Titular(es): <b>PROMIMIC AB</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2004.06.15 SE 0401524</b>	<b>STENA CENTER 1B 412 92 GÖTEBORG</b>	<b>SE</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.05.09</b>	(72) Inventor(es): <b>PER KJELLIN</b>	<b>SE</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2016.04.20</b> <b>144/2016</b>	<b>MARTIN ANDERSSON</b>	<b>SE</b>
	(74) Mandatário: <b>MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA</b>	
	<b>RUA DOS BACALHOEIRO, 4 1100-070 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO SINTÉTICO**

(57) Resumo:

DESCREVE-SE FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO SINTÉTICO, PARTICULARMENTE HIDROXIAPATITA, QUE TEM UMA ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA NO INTERVALO DE 150 M<sup>2</sup>/G A 300 M<sup>2</sup>/G. O FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO PODE ESTAR NA FORMA DE UM PÓ OU NA FORMA DE UM RECOBRIMENTO SOBRE UMA SUPERFÍCIE. DESCREVE-SE TAMBÉM UM MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO OU RECOBRIMENTO. O MÉTODO COMPREENDE A FORMAÇÃO DE UMA FASE CRISTALINA LÍQUIDA NUMA SOLUÇÃO AQUOSA DE CÁLCIO, FÓSFORO E UM TENSIOATIVO, COLOCANDO A FASE NUMA ATMOSFERA DE AMONÍACO DE MODO QUE SE FORMAM CRISTAIS NANOMÉTRICOS, SEGUIDO POR OU RETIRADA DO TENSIOATIVO COM UM SOLVENTE E RECUPERAÇÃO DOS CRISTAIS NANOMÉTRICOS PARA OBTER O PÓ, OU DILUIÇÃO DA FASE CRISTALINA LÍQUIDA TRATADA COM AMONÍACO COM UM SOLVENTE ORGÂNICO HIDROFÓBICO PARA CRIAR UMA MICROEMULSÃO DOS CRISTAIS NANOMÉTRICOS EM ÁGUA, SUBMERGIR UMA SUPERFÍCIE RECOBERTA COM CAMADA DE ÓXIDO DE UM OBJETO NA MICROEMULSÃO, OU ALTERNATIVAMENTE OMITIR A ETAPA DE TRATAMENTO COM AMONÍACO DA FASE CRISTALINA LÍQUIDA ATÉ APÓS A SUBMERSÃO DA SUPERFÍCIE DE UM OBJETO NA MICROEMULSÃO, SEGUIDO POR RETIRADA DO SOLVENTE ORGÂNICO E O TENSIOATIVO DA SUPERFÍCIE PARA OBTER O RECOBRIMENTO.

## RESUMO

### **<MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO SINTÉTICO>**

Descreve-se fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético, particularmente hidroxiapatita, que tem uma área superficial específica no intervalo de 150 m<sup>2</sup>/g a 300 m<sup>2</sup>/g. O fosfato de cálcio cristalino nanométrico pode estar na forma de um pó ou na forma de um revestimento sobre uma superfície. Descreve-se também um método de produção de um pó de fosfato de cálcio cristalino nanométrico ou revestimento. O método compreende a formação de uma fase cristalina líquida numa solução aquosa de cálcio, fósforo e um tensoativo, colocando a fase numa atmosfera de amoníaco de modo que se formam cristais nanométricos, seguido por ou retirada do tensoativo com um solvente e recuperação dos cristais nanométricos para obter o pó, ou diluição da fase cristalina líquida tratada com amoníaco com um solvente orgânico hidrofóbico para criar uma microemulsão dos cristais nanométricos em água, submergir uma superfície recoberta com camada de óxido de um objeto na microemulsão, ou alternativamente omitir a etapa de tratamento com amoníaco da fase cristalina líquida até após a submersão da superfície de um objeto na microemulsão, seguido por retirada do solvente orgânico e o tensoativo da superfície para obter o revestimento.

## DESCRIÇÃO

### <MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO CRISTALINO NANOMÉTRICO SINTÉTICO>

A presente invenção refere-se a um método de produção de um recobrimento de fosfato de cálcio cristalino nanométrico, em particular hidroxiapatita.

#### **Antecedentes da invenção**

Existe um enorme número de biomateriais diferentes que se podem implantar no corpo. Estes podem classificar-se de acordo com a sua atividade *in vivo* como materiais bioinertes, reabsorvíveis ou bioativos. Os materiais bioinertes consideram-se em certo sentido objetos estranhos quando entram em contato com tecido vivo. O corpo encapsula o objeto com tecido fino e, portanto, fixa mecanicamente o objeto dentro do corpo. Materiais bioinertes típicos são materiais cerâmicos tais como óxido de alumínio e dióxido de zircónio e diferentes polímeros não biodegradáveis. Os materiais biorreabsorvíveis tais como fosfato de tricálcio, sulfato de cálcio e polímeros biodegradáveis utilizam-se para substituir tecido danificado. Finalmente dissolvem-se e substituem-se por tecido corporal. Os materiais bioativos incluem, por exemplo, hidroxiapatita e alguns materiais de vidro e vitrocerâmica e caracterizam-se pela sua capacidade para iniciar uma resposta biológica, que conduz a uma união química e biológica ao tecido vivo.

A osseointegração, que significa a integração de um implante para reparar ou substituir tecidos duros num corpo e o tecido biológico circundante, isto é, osso, é decisiva para o sucesso do procedimento de implantação. Uma osseointegração deficiente pode conduzir ao desprendimento do implante. Há vários métodos para conseguir uma boa

osseointegração, por exemplo, a) desenho do implante, tal como a distância entre as roscas em parafusos de implante dental (Wennerberg, A., et al., "Design And Surface Characteristics Of 13 Commercially Available Oral Implant Systems", International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, vol. 8, n.º 6, págs. 622-623 (1993); Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al2O3. J Biomed Mater Res 1996; 30: 251-260, e patente norte-americana n.º 4.330.891 concedida a Branemark, et al.), b) ajuste da topografia de superfície do implante (Larsson et al, "Implant element", documento US 6.689.170), c) seleção da química de superfície adequada (Ellingsen et al, "Process for treating a metallic surgical implant", documento US 5.571.188) (R.G.T. Geesink, Clin. Orthop. 261 (1990) 39-58; J.A. Jansen, et al., Mater. Res., 25 (1991) 973-989; T.W. Bauer, et al., Bone Join Surg., 73A (1991) 1439-1452; Rashmir-Raven AM, Richardson DC, Aberman HM, DeYoung DJ. The response of cancellous and cortical canine bone to hidroxyapatite-coated and uncoated titanium rods. J Appl Biomater 1995; 6: 237-242.), ou bioinerte, reabsorvível ou bioativa, e d) uma combinação de dois ou os três de a) a c). A força impulsora para estudar a osseointegração e os seus mecanismos é que os pacientes que recebem cirurgia de implante com frequência têm que experimentar um longo período de recuperação. Os implantes dentais de titânio, por exemplo, normalmente requerem um tempo de recuperação de três a seis meses dependendo do paciente e da localização na boca antes que se possa aplicar carga externa.

A hidroxiapatita, HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é um dos principais componentes minerais em corpos de animais e seres humanos,

e proporciona dureza e resistência a ossos e dentes. No corpo, a HA existe como cristais diminutos com uma estrutura com forma de agulha (Lowenstam, H. A., e Weiner, S. On biomineralization, Oxford University Press, Nova York, 1989.). As agulhas são de aproximadamente 1-2 nm de grossura, 2-4 nm de largura e 20-40 nm de comprimento. A HA utiliza-se, por exemplo, em dispositivos percutâneos, tratamento periodontal, aumento de crista alveolar, ortopedia, cirurgia maxilofacial, otorrinolaringologia e cirurgia de coluna vertebral. (Hench (1991) J. Am. Cer. Soc. 74:1487), mas, utiliza-se o mais amplamente para aplicações de implante dental e ortopédico

Infelizmente, devido à baixa fiabilidade mecânica, especialmente num entorno húmido, a HA não se pode utilizar por si mesma para aplicações que portam carga pesada (Synthesis and characterization of nano-HA/PA66 composites Mie Huang, Jianqing Feng, Jianxin Wang, Xingdong Zhang, Yubao Li, Yonggang Yan Journal of Materials Science: Materials in Medicine 14 (2003) 655-660). No corpo, a HA incorpora-se em outro tecido "mais mole", formando, portanto, um material composto. Por exemplo, o dente humano está composto por uma mistura de colágeno e HA, que faz com que seja forte contra a rachadura. Atualmente, a utilização mais estendida da hidroxiapatita sintética é como recobrimentos de implantes de titânio. Isto é para potenciar a união entre o implante e o tecido circundante e para obter a união (osseointegração) o melhor e mais rapidamente possível. Nesta aplicação, utiliza-se a resistência do titânio junto à biocompatibilidade da hidroxiapatita. Ainda quando a HA, de acordo com estudos, tem um efeito bioativo, os problemas com a aplicação da HA foram numerosos. Principalmente os problemas estão relacionados com a adesão da película de HA sobre a

superfície de dióxido de titânio. A escassa adesão dá como resultado o desprendimento da película de HA do implante, o que por sua vez pode conduzir a um fracasso cirúrgico total. Além disso, foram experimentados problemas com a cristalinidade da HA, o que conduz à dissolução da película quando se apresenta ao tecido vivo (Wolke J. G. C, Groot K, Jansen J. A, "In vivo dissolution behaviour of various RF magnetron sputtered Ca-P coatings", J. Biomed. Mater. Res. 39 (4): 524-530, 15 de Março de 1998.).

Nos últimos anos, as conquistas da investigação têm conduzido a um aumento do interesse na HA como substância bioativa e à sua utilização como recobrimento em implantes e outras aplicações. Colocaram-se grandes esforços no desenvolvimento de novas vias ou modificações de métodos antigos para produzir produtos mais fiáveis compostos por HA. Um enfoque muito promissor é obter hidroxiapatita na forma de nanopartículas. Isto se deve à sua capacidade para sinterizar-se a baixa temperatura, à sua área superficial específica superior e a que dão lugar a produtos finais mais fortes após a sinterização.

Existem várias técnicas para a obtenção de HA e materiais similares na escala nanométrica. Estas incluem precipitação química controlada onde se utilizam soluções salinas de baixa concentração, técnicas de deposição de vapor (tanto química como física), condensação desde fase gasosa e diferentes técnicas de modelagem, tanto biológica como sintética. Ying et al (documento US 6013591) descrevem uma técnica que envolve o controlo cuidadoso do pH e a concentração de sal e a moagem em húmido da suspensão de HA-água, dando como resultado um pó de HA com um tamanho de cristal médio de 40 nm. Também mencionam a possibilidade de utilizar o pó em recobrimentos, embora não se revele o

método de recobrimento. Entre os métodos sintéticos, foram aplicados satisfatoriamente automontagem de tensioativo, especialmente microemulsões onde o tensioativo forma pequenas gotinhas de água que se utilizam como microrreatores para o fim de obter pequenas partículas de HA (Susmita Bose *et. al.*, Chem. Mater. 2003 (15) 4464-4469; Koumoulidis GC, Katsoulidis AP, Ladavos AK, Pomonis PJ, Trapalis CC, Sdoukos AT, Vaimakis TC, Journal of Colloid and Interface Science 259 (2): 254-260, 15 de Março de 2003; Lim GK, Wang J, Ng SC, Gan LM Journal of Materials Chemistry, 9 (7): 1635-1639, Julho de 1999). Sem embargo, há problemas com o controlo tanto do tamanho como da morfologia, assim como com o baixo rendimento dos produtos. Portanto, existe a necessidade de uma técnica fiável para a produção de fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético morfologicamente puro, em particular hidroxiapatita.

O documento US2002/0031534 revela um pó que compreende uma substância de base que se pode utilizar como pó para cosméticos, uma hidroxiapatita e um óxido de zinco. Preferivelmente, o pó obtém-se formando uma camada de recobrimento de hidroxiapatita sobre a superfície da substância de base e fixando logo o óxido de zinco a esta camada de recobrimento.

Existem diversos métodos para aplicar películas de HA sobre objetos de implante. Por exemplo: a) Pulverização térmica de plasma. Durante o processo de pulverização de plasma produz-se plasma deixando que um arco elétrico passe através de uma corrente de gases mistos. Isto dá como resultado a fusão parcial de uma matéria-prima de HA, que por sua vez se lança a uma velocidade relativamente alta incidindo sobre a superfície exterior do objeto a ser

recoberto. Este tratamento dá lugar a temperaturas localmente altas, afetando, portanto, à cristalinidade da HA dando outros polimorfos assim como HA amorfa parcial. Esta HA amorfa tem tendência a dissolver-se no corpo dando uma osseointegração mais deficiente. Além disso, a camada de HA é relativamente grossa (10  $\mu\text{m}$  mínimo), o que dá problemas em relação com a adesão ao implante (Cheang, P.; Khor, K. A. *Biomaterials* 1996, 17, 537; Groot, K. d.; Geesink, R.; Klein, C.; Serekian, P. L. *Biomedical Mater. Res.* 1987, 21, 1375; Story, B.; Burgess, A. *Prosthetic implants coated with hydroxylapatite and process for treating prosthetic implants plasma-sprayed with hydroxylapatite*; S. Calcitek: USA, 1998; e Zyman, Z.; Weng, J.; Liu, X.; Zhang, X.; Ma, Z. *Biomaterials* 1993, 14, 225.). b) Métodos de pulverização catódica, que têm um custo relativamente alto e não são práticos devido à sua baixa eficácia (Massaro C, Baker MA, Cosentino F, Ramires PA, Klose S, Milella E, *Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. Journal of Biomedical Materials Research*, 58 (6): 651-657, 5 de Dezembro de 2001). c) Métodos eletroquímicos que utilizam eletroquímica para fazer crescerem cristais sobre um substrato. Esta técnica tem problemas com a formação de gás, que pode rachar e romper a película de recobrimento. Existem outras técnicas diversas que se descrevem na bibliografia, mas atualmente só se utiliza comercialmente a técnica de pulverização de plasma. Os problemas de utilizar estas técnicas descritas anteriormente e outras não descritas são numerosos, especialmente devido a que só se podem aplicar camadas grossas (de vários  $\mu\text{m}$ ) o que conduz a problemas com a adesão ao substrato e problemas com o recobrimento de objetos que têm formas complicadas. Várias das técnicas utilizadas ou testadas também criam localmente altas

temperaturas, dando HA amorfa em lugar da forma de apatita cristalina desejada. Portanto, requerem-se novos métodos de recobrimento para as deposições de HA sobre superfícies. Uma técnica prometedora é a denominada técnica de recobrimento por imersão onde o substrato submerge-se numa dissolução que consiste numa dispersão de partículas. Há vários estudos realizados sobre a utilização desta técnica, mas os problemas com a obtenção de um sol adequado deram como resultado problemas com a adesão ao substrato, assim como películas inconsistentes.

### **Curta descrição da invenção**

A presente invenção proporciona um método de produção de apatitas nanométricas altamente cristalinas, especialmente hidroxiapatita, na forma de um recobrimento sobre uma superfície. Pode aplicar-se um recobrimento de apatita fina, transparente e altamente cristalina, isto é fosfato de cálcio, tal como hidroxiapatita, sobre objetos, por exemplo, implantes, utilizando o método da invenção que se detalhará a seguir.

O método da invenção pode utilizar-se para a formação de vários produtos onde a utilização de partículas pequenas constitui uma vantagem. Além disso, o método utiliza uma dissolução que pode depositar-se facilmente sobre superfícies de substratos ou metálicos ou não metálicos. As nanopartículas presentes na solução aderem-se ao substrato eletrostaticamente, e, portanto, o substrato deve ter uma camada de óxido com o fim de maximizar a aderência à superfície. Isto conduz a uma superfície que consiste numa camada muito fina (tal como 150 nm ou menos) de apatita cristalina, que se pode aplicar independentemente das formas do substrato. Além disso, a invenção dá lugar a uma camada de apatita que pode seguir a rugosidade de

superfície do substrato dando as possibilidades de combinar estrutura de superfície e recobrimento de apatita, o que é de grande importância na osseointegração.

De acordo com a ciência de materiais, com a sinterização aumenta-se a resistência de um material com a diminuição do tamanho de partícula (referência: A.A. Griffith, "The phenomena of rupture and flow in solids", Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. A. 221 [4] 163-198 (1920-1921)). Isto conduzirá a materiais de resistência superior quando se sinteriza um pó de fosfato de cálcio nanométrico em comparação com materiais compostos por HA convencional. Isto permite a obtenção de implantes de alta resistência que consistem completamente em HA. Além disso, o pequeno tamanho dos cristais oferece a possibilidade de obter camadas muito finas de HA sobre o substrato sólido. Além disso, os nanocristais de hidroxiapatita na forma de um recobrimento sobre uma superfície resultam vantajosos quando se utilizam para aumentar a área superficial de implantes compostos por metais ou não metais, assim como para dar uma superfície bioativa. Isto dará como resultado uma osseointegração mais rápida e mais controlada.

Os cristais nanométricos sintéticos de hidroxiapatita produzidos mediante o método da invenção têm, que se saiba, a maior área superficial específica jamais apresentada. Aparecem-se às partículas de HA que estão presentes no corpo humano, o que as fazem altamente adequadas na imitação biológica do tecido corporal para a obtenção de implantes corporais. Portanto, a HA é adequada para depositar-se sobre a superfície de um implante proporcionando-lhe uma superfície altamente bioativa com o fim de estimular o crescimento ósseo durante o processo de recuperação inicial. Por exemplo, o dente humano está

composto por nanopartículas que consistem em HA incluídas numa matriz do polímero proteico colágeno, o que lhe proporciona a estabilidade e a resistência mecânica adequadas.

### **Descrição dos desenhos**

A figura 1 mostra uma imagem de microscópio eletrónico de transmissão (TEM) de cristais de hidroxiapatita produzidos de acordo com a invenção. Barra de escala = 100 nm.

A figura 2 mostra uma imagem de microscópio eletrónico de varrimento (SEM) de uma superfície de metal recoberta com hidroxiapatita produzida de acordo com a invenção. Tal como pode observa-se a partir desta imagem, a camada de hidroxiapatita produzida de acordo com a invenção segue a topografia da superfície de metal. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

A figura 3 mostra uma imagem de SEM de uma camada de hidroxiapatita produzida de acordo com a invenção sobre uma superfície de vidro. Barra de escala = 1  $\mu\text{m}$ .

A figura 4 mostra um difratograma de raios X de um pó de HA com uma área superficial específica de 220  $\text{m}^2/\text{g}$ .

### **Descrição detalhada da invenção**

O fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético produzido de acordo com a invenção pode ter uma área superficial específica no intervalo de 150  $\text{m}^2/\text{g}$  a 300  $\text{m}^2/\text{g}$ , tal como de 180  $\text{m}^2/\text{g}$  a 280  $\text{m}^2/\text{g}$  tal como se mede mediante o método de BET (S. Brunauer, P.H. Emmet, E. Teller, J. Am. Chem. Soc. 1938, 60, 309-319).

Os cristais têm um tamanho de partícula médio de 1-10 nm, tal como 2-10 nm, e preferivelmente 1-5 nm de diâmetro, e 20-40 de comprimento, que se pode estimar mediante a imagem de TEM mostrada na figura 1.

Numa forma de realização preferida da invenção, o fosfato de cálcio é hidroxiapatita.

Em outra forma de realização, o fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético produzido de acordo com a invenção tem uma área superficial específica selecionada de 180 m<sup>2</sup>/g, 220 m<sup>2</sup>/g e 280 m<sup>2</sup>/g.

O fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético produzido de acordo com a invenção está na forma de um recobrimento sobre uma superfície, por exemplo, uma superfície de metal, tal como uma superfície de titânio.

Numa forma de realização do fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético na forma de um recobrimento sobre uma superfície, o recobrimento tem uma grossura de menos de ou igual a 150 nm, tal como menos de ou igual a 100 nm.

Ainda em outra forma de realização do fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético produzido de acordo com a invenção a razão de cálcio em relação com o fósforo é de 1,67.

A invenção refere-se a um método de produção de um pó ou recobrimento de fosfato de cálcio cristalino nanométrico que compreende as etapas de

a) proporcionar uma solução de água e quantidades dissolvidas estequiométricas de um precursor de fósforo e de um precursor de sal de cálcio,

b) adicionar um tensioativo, e opcionalmente um solvente orgânico hidrofóbico, à solução de a) para criar uma fase cristalina líquida,

c) permitir que a fase cristalina líquida se equilibre, e

d) colocar a fase cristalina líquida equilibrada numa atmosfera de amoníaco para elevar o pH de modo que se formem cristais nanométricos de fosfato de cálcio nos domínios aquosos da fase cristalina líquida,

realizando-se as etapas a) - d) a temperatura ambiente,

seguido por

e1) diluir a fase cristalina líquida tratada com amoníaco em d) com um solvente orgânico hidrofóbico para criar uma microemulsão dos cristais nanométricos de fosfato de cálcio em água,

f1) submergir uma superfície recoberta com camada de óxido de um objeto na microemulsão de e1) para depositar a microemulsão sobre a superfície,

g1) evaporar o solvente orgânico da superfície de f1) para obter o recobrimento de fosfato de cálcio cristalino nanométrico, e

h1) esquentar sob atmosfera inerte com o fim de retirar o tensioativo,

ou alternativamente

omitir a etapa d) e

e2) diluir a fase cristalina líquida de c) com um solvente orgânico hidrofóbico para criar uma microemulsão,

f2) submergir uma superfície recoberta com camada de óxido de um objeto na microemulsão de e2) para depositar a microemulsão sobre a superfície,

g2) evaporar o solvente orgânico da superfície de f2) para formar a fase cristalina líquida, onde os precursores dissolvidos situam-se nos domínios aquosos e

h2) colocar a superfície de g2) numa atmosfera de amoníaco para elevar o pH de modo que se formem cristais nanométricos de fosfato de cálcio nos domínios aquosos da fase cristalina líquida e depositem-se sobre a superfície, seguido por

i1) esquentar sob atmosfera inerte com o fim de retirar o tensioativo.

Numa forma de realização, as quantidades dissolvidas estequiométricas em a) são quantidades dissolvidas em água, mas em algumas outras formas de realização onde o precursor de fósforo não é solúvel em água, por exemplo, fosfito de trietilo ou propionato de cálcio, as quantidades dissolvidas dissolvem-se em surfactante ou dissolvem-se em óleo, respetivamente.

Numa forma de realização preferida atualmente, o tensioativo em b) é um tensioativo não iónico.

Mediante o método da invenção, é possível produzir fosfato de cálcio cristalino nanométrico que tem uma superfície específica no intervalo de 50 m<sup>2</sup>/g a 300 m<sup>2</sup>/g, ainda quando um intervalo preferido atualmente é de 150 m<sup>2</sup>/g a 300 m<sup>2</sup>/g.

Numa forma de realização do método da invenção, a superfície recoberta com camada de óxido de f1) ou f2) é uma superfície de metal, tal como uma superfície de titânio.

Em outra forma de realização, o objeto de f1) ou f2) é um implante corporal, por exemplo, um implante dental.

Formas de realização do método da invenção compreendem o fosfato de cálcio como hidroxiapatita, o precursor de fósforo como ácido fosfórico, o precursor de sal de cálcio como nitrato de cálcio, e a razão de cálcio em relação com fósforo como 1,67.

Portanto, mantém-se também a importante razão de Ca/P, que no corpo é da ordem de 1,67. A razão de Ca/P de 1,67 é a razão da hidroxiapatita que se produz de maneira natural. Sem embargo, podem produzir-se outros compostos de fosfato de cálcio de acordo com o método da invenção alterando a razão do cálcio e os precursores de fósforo, tais como fosfato de di-, tri- ou tetracálcio.

Os exemplos de precursores de fósforo incluem, além de ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido hipofosforoso e ésteres de ácido fosforoso, tais como fosfito de trietilo.

Os exemplos do precursor de sal de cálcio incluem, além de nitrato de cálcio, por exemplo, cloreto de cálcio, acetato de cálcio e alcóxidos de cálcio tais como etóxido de cálcio.

O fosfato de cálcio cristalino nanométrico sintético, em particular hidroxiapatita, pode depositar-se sobre qualquer superfície de interesse tal como, por exemplo, metais, polímeros e qualquer outro material orgânico, material

cerâmico e outros materiais inorgânicos, sempre que tenham uma camada de óxido. O objeto ou implante pode ser plano, como redondo, concêntrico ou de qualquer forma complexa, e a superfície pode ser ou lisa ou porosa. Os metais utilizados como implantes corporais, tais como titânio (que sempre tem uma camada de dióxido de titânio presente sobre a superfície), aço inoxidável, molibdênio, zircônio, etc., podem bioativar-se, portanto, pela ação do recobrimento descrita por esta invenção.

Com o fim de obter boa adesão ao substrato, a superfície do substrato deve limpar-se apropriadamente. Isto é para eliminar os contaminantes que poderiam influenciar na união. Podem utilizar-se várias técnicas para este fim, tanto mecânicas, tais como granalhagem e polimento, como químicas, tais como lavagem com solventes orgânicos e água.

Com o fim de controlar o tamanho do cristal assim como de obter a sua cristalinidade desejada, isto é, a sua estrutura de apatita, foi utilizada automontagem de tensioativo no método da invenção. Os tensioativos são moléculas anfifílicas que consistem numa ou mais partes hidrofílicas e uma ou mais partes hidrofóbicas. A parte hidrofílica significa que é liofílica para a água, isto é, que tem afinidade pela água, o que se refere a que a cabeça é mais ou menos solúvel em água. A parte hidrofóbica significa que não é liofílica para a água, isto é, que não tem afinidade para a água, o que com frequência se refere a que a cauda não é solúvel em água ou é menos solúvel em água que a parte hidrofílica. Combinações destas partes diferentes dão como resultado moléculas que têm uma parte solúvel em água e uma parte não solúvel em água ou menos solúvel em água. Existem diferentes composições entre estas partes, e os tensioativos podem ter, por exemplo, uma

cabeça dupla com uma ou mais caudas hidrofóbicas, ou ao contrário, uma molécula com cauda dupla com uma ou mais cabeças. Além disso, os tensioativos dividem-se em diferentes grupos dependendo do tipo de cabeça, isto é, iônicos ou não iônicos, sendo os iônicos positivos, negativos, zwitteriônicos ou anfotéricos. Os tensioativos zwitteriônicos contêm tanto uma carga positiva como uma negativa. Com frequência a carga positiva é invariavelmente amônio e a carga negativa pode variar, mas habitualmente é um carboxilato. Se tanto a carga positiva como a negativa são dependentes do pH, denominam-se tensioativos anfotéricos, que num determinado intervalo de pH são zwitteriônicos. A característica mais importante dos tensioativos é a sua tendência a adsorver sobre as superfícies de contato, por exemplo, a superfície de contacto de ar-líquido, a superfície de contato de ar-sólido e a superfície de contacto de líquido-sólido. Quando os tensioativos são livres no sentido de não estar na forma agregada, denominam-se monômeros ou unímeros. Quando aumenta a concentração de unímeros tendem a agregar-se e formar pequenas entidades de agregados, as denominadas micelas. Esta concentração denomina-se a concentração micelar crítica e com frequência designa-se como CMC. A formação de micelas pode considerar-se como alternativa à adsorção sobre uma superfície de contato, reduzindo, portanto, a sua energia livre de acordo com as regras da termodinâmica. Quando se utiliza água como solvente para a micelização, a CMC alcança-se a concentrações micelares muito baixas. Não é incomum com valores de 1 mM e inferiores. Ao aumentar a concentração de tensioativo além da CMC, as micelas começam a aumentar de tamanho. A uma concentração de tensioativo superior, as micelas alcançam a fase em que começam a se embalar umas próximas a outras formando novas estruturas mais viscosas, isto é, fases

cristalinas líquidas. Estas entidades formam-se em água ou solventes orgânicos ou em misturas de água e solventes orgânicos.

A automontagem de tensioativo na forma de estruturas cristalinas líquidas existe numa variedade de geometrias diferentes. Exemplos destas geometrias são lamelar, hexagonal, hexagonal inversa e cúbica. Com a presente invenção é possível obter todas estas geometrias. Outras fases de tensioativo que existem são as denominadas fases de solução isotrópica, e exemplos delas são soluções micelares diluídas e concentradas, soluções micelares inversas, microemulsiones e soluções vesiculares. Os sistemas mais altamente concentrados, isto é, as fases cristalinas líquidas, têm desordem a pouca distância, mas certa ordem a distâncias mais longas. Comparou-se isto com cristais habituais tais como os cristais inorgânicos que têm ordem tanto a distância longa como curta. Estas propriedades fazem com que os cristais líquidos sejam uma estrutura rígida, mas, mais similar a um líquido em comparação com os cristais ordinários. Os intervalos de tamanho típicos para estas estruturas estão no intervalo meso, isto é 2-50 nm.

O método de utilizar fases cristalinas líquidas e o seu comportamento de fase rica, faz com que seja uma via muito prometedora também para obter materiais porosos (mesoporosos), o que seria interessante na aplicação de substituição de osso danificado. Os materiais obtidos utilizando a fase cristalina líquida altamente concentrada têm uma área superficial específica de mais de 50 m<sup>2</sup>/g, tal como 100 m<sup>2</sup>/g, preferivelmente mais de 150 m<sup>2</sup>/g, por exemplo, 200 m<sup>2</sup>/g e o mais preferivelmente 280 m<sup>2</sup>/g, que até onde se sabe é a maior área superficial notificada para

HA sintética utilizando o método de adsorção de N<sub>2</sub> convencional (deve indicar-se que Rudin *et. al.* (documento WO 02/02461) indicaram que haviam obtido HA com uma área superficial específica de 920 m<sup>2</sup>/g. Sem embargo, estes valores não são comparáveis com os valores obtidos com o método de adsorção de N<sub>2</sub> convencional).

O tensioativo utilizado na presente invenção como agente de controlo da estrutura para a formação da apatita cristalina, por exemplo, partículas de HA, também pode funcionar como agente dispersante estabilizando a suspensão coloidal, e como agente humectante em caso de que se deseje a dispersão das partículas sobre um objeto. Os tensioativos adequados para a produção de fosfatos de cálcio nanométricos são os tensioativos não iónicos do tipo polietilenglicol de bloco-propilenglicol de bloco-polietilenglicol de bloco. Tal como se mencionou anteriormente, existem várias estruturas ou fases cristalinas líquidas liotrópicas diferentes. O tipo de fase que se pode obter depende do tensioativo, da fase hidrofóbica (se está presente), da pressão aplicada, da temperatura, do pH e das concentrações, e é possível mudar de fase mudando um ou mais destes parâmetros. Esta característica torna possível começar com uma fase de tensioativo específica, levar a cabo a reação desejada nesse entorno incluído específico e mudar um ou mais parâmetros para convertê-la em outra fase. Esta outra fase pode ter outras propriedades desejadas para o procedimento de produção, que se podem utilizar em outra etapa adicional. A mudar parâmetros tais como as temperaturas e as concentrações de tensioativo, é possível produzir a fase desejada e as nanopartículas apresentadas pela invenção, e mudar a outra fase mais desejável como uma suspensão estável. Além disso, obtendo estes sistemas de tensioativo

em condições conhecidas termodinamicamente, os sistemas podem obter-se e manter-se. Isto significa que a fase nunca se separará em fases nos seus próprios componentes respectivos ainda quando se armazene durante muito tempo. Esta é uma propriedade desejada quando se tratam de questões práticas tais como a reprodutibilidade de produção e produtos.

O solvente orgânico utilizado possivelmente pode selecionar-se de um grande número de solventes diferentes, e os exemplos de solventes incluem acetato de butilo e p-xileno.

A invenção ilustrar-se-á agora com referência aos exemplos e os desenhos, mas deve entender-se que o alcance da invenção não se limita aos detalhes revelados.

## **Exemplos**

### **Exemplo 1**

#### Produção de pó de hidroxiapatita (não reivindicado)

Fabrica-se o pó utilizando uma fase cristalina líquida. Uma fase deste tipo está constituída por tensioativos, água e opcionalmente uma fase hidrofóbica que é um solvente orgânico. Os tensioativos que foram utilizados são os denominados copolímeros de bloco da estrutura PEG-PPG-PEG (polietilenglicol de bloco-polipropilenglicol de bloco-polietilenglicol de bloco). BASF fabrica esta série de polímeros com o nome Pluronic, mas a empresa química Aldrich também vende copolímeros de bloco quase idênticos. Conseguiu-se fabricar hidroxiapatita mediante quatro fórmulas diferentes, dadas em percentagem em peso:

### **1) Fase hexagonal inversa**

15% de solução aquosa:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

35% de acetato de butilo

50% de Pluronic P123

### **2) Fase hexagonal inversa**

15% de solução aquosa:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

15% de p-xileno

70% de Pluronic L64

### **3) Fase cúbica**

50% de solução aquosa:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

50% de Pluronic F127

### **4) Fase hexagonal**

30% de solução aquosa:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

70% de Pluronic F127

Permite-se que a fase cristalina líquida se equilibre durante algumas horas antes de tratar-se numa atmosfera de amoníaco. O amoníaco precipita a hidroxiapatita posto que se eleva o pH dos domínios aquosos. Em quatro dias a reação cessou e retira-se o tensioativo com um solvente (por exemplo, etanol ou tolueno). A hidroxiapatita filtra-se, lava-se e seca-se ao ar. Devido ao facto de que a cristalização se produz nos domínios aquosos muito pequenos

que estão presentes na fase cristalina líquida (5-10 nm de diâmetro) o pó torna-se de grão extremamente fino.

Tal como pode observar-se a partir das fórmulas, adicionam-se concentrações solúveis de ácido fosfórico e nitrato de cálcio à fase aquosa. A relação entre o nitrato de cálcio e o ácido fosfórico sempre foi realizada de maneira que a razão de Ca/P foi de 1,67. Dependendo de quais concentrações de nitrato de cálcio e ácido fosfórico se adicionam, pode controlar-se o tamanho dos cristais de hidroxiapatita resultantes. Variaram-se as concentrações de nitrato de cálcio e ácido fosfórico (ainda com a razão de Ca/P de 1,67) e mediram-se as seguintes áreas superficiais específicas:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Área superficial específica, m <sup>2</sup> /g
20% em peso	80
10% em peso	180
5% em peso	220
2,5% em peso	280

Todas as áreas superficiais específicas mencionadas neste texto foram medidas com adsorção de gás nitrogénio, mais especificamente com um instrumento ASAP 2010 de Micromeritics instruments.

### **Exemplo 2** (invenção)

#### Produção de um recobrimento sobre uma superfície - método 1

O recobrimento obtém-se diluindo a fase cristalina líquida tratada com amoníaco com um solvente orgânico que tem que ser insolúvel em água. Em lugar de retirar os tensioativos

e filtrar o pó como no exemplo 1, adiciona-se mais componente insolúvel em água à fase cristalina líquida. Desta maneira obtém-se uma denominada microemulsão de água em óleo, em que os cristais de hidroxiapatita existem em pequenas gotinhas de água na solução, de aproximadamente 10 nm de diâmetro. A quantidade de solvente que se adiciona é importante com o fim de manter a microemulsão. Se se adiciona demasiado solvente, a hidroxiapatita precipitará e sedimentará. Na fórmula com p-xileno e L64 foi adicionado o dobro da quantidade de p-xileno em comparação com o peso da fase cristalina líquida com o fim de obter uma microemulsão:

15 g de solução aquosa

215 g de p-xileno

70 g de Pluronic L64

Quando se submerge um metal tal como titânio na solução, a hidroxiapatita unir-se-á ao metal, junto com o tensioativo e o solvente orgânico. Após a imersão, a amostra seca-se durante meia hora, de modo que o solvente orgânico se evapora. Posto que o tensioativo se queima posteriormente a 550°C em 5 minutos, só se mantém a hidroxiapatita pura. A hidroxiapatita será completamente cristalina e, além disso, terá uma grande área superficial específica. Com outros métodos, tais como pulverização catódica de plasma, obtém-se uma grossa camada de hidroxiapatita parcialmente amorfa junto com uma baixa superfície específica. O tratamento térmico realiza-se num denominado forno de tipo tubular, fluindo gás nitrogénio através da amostra e impedindo desse modo a oxidação adicional da superfície de titânio.

O método de produção anterior de um recobrimento de HA pode descrever-se em resumo tal como segue:

1. Produz-se a fase cristalina líquida e
2. coloca-se numa atmosfera de amoníaco durante 4 dias.
3. Dilui-se a fase com um solvente para criar uma solução de recobrimento.
4. Submerge-se a superfície a ser recoberta na solução de recobrimento e seca-se, de modo que se reproduz a fase cristalina líquida na superfície.
5. Coloca-se a superfície num forno sob gás nitrogénio durante 5 minutos para retirar o tensioativo

### **Exemplo 3** (Invenção)

Produção de um recobrimento sobre uma superfície - método 2

O recobrimento obtém-se diluindo a fase cristalina líquida, que não foi tratada numa atmosfera de amoníaco, com um solvente orgânico que tem que ser insolúvel em água. Obtém-se uma microemulsão de água em óleo, mas posto que a fase cristalina líquida não foi exposta a amoníaco, não estão presentes cristais de hidroxiapatita nas gotinhas de água da microemulsão. Em troca, estas gotinhas de água contêm os precursores de cálcio e fósforo. A composição da microemulsão é idêntica à de no exemplo 2:

15 g de solução aquosa

215 g de p-xileno

70 g de Pluronic L64

O método de produção anterior de um recobrimento de HA pode descrever-se em resumo tal como segue:

1. Produz-se a fase cristalina líquida e
2. dilui-se com um solvente para criar uma solução de recobrimento.
3. Submerge-se a superfície a ser recoberta na solução de recobrimento e seca-se, de modo que se reproduz a fase cristalina líquida na superfície e
4. coloca-se numa atmosfera de amoníaco durante 20 minutos.
5. Coloca-se a superfície num forno sob gás nitrogénio durante 5 minutos para retirar o tensioativo.

A principal diferença entre os dois métodos alternativos de produção de um recobrimento nanocristalino sobre uma superfície é que no segundo caso a fase cristalina líquida não se trata com amoníaco durante 4 dias. Em troca, trata-se a superfície com amoníaco após a imersão, eleva-se o pH e deposita-se a HA sobre a superfície. A etapa final de retirar os tensioativos num forno é igual em ambos os métodos. Os métodos dão o mesmo resultado, mas o segundo método realiza-se num tempo mais curto.

É possível recobrir outras superfícies além de superfícies de metal com hidroxiapatita sempre que tenha uma camada de óxido sobre a superfície (de outro modo a hidroxiapatita na microemulsão não se unirá ao substrato de maneira satisfatória) e que o material resista o tratamento térmico. Os exemplos de materiais suscetíveis a

recobrimento com HA incluem metais tais como aço inoxidável e titânio, e materiais cerâmicos tais como óxido de zircônio e vidro ordinário.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de um recobrimento de fosfato de cálcio cristalino nanométrico, caracterizado por compreender as etapas de
  - a) proporcionar uma solução de água e quantidades dissolvidas estequiométricas de um precursor de fósforo e de um precursor de sal de cálcio,
  - b) adicionar um tensioativo, e opcionalmente um solvente orgânico hidrofóbico, à solução de a) para criar uma fase cristalina líquida,
  - c) permitir que a fase cristalina líquida se equilibre, e
  - d) colocar a fase cristalina líquida equilibrada numa atmosfera de amoníaco para elevar o pH de modo que se formem cristais nanométricos de fosfato de cálcio nos domínios aquosos da fase cristalina líquida, realizando-se as etapas a) - d) a temperatura ambiente, seguido por
    - e1) diluir a fase cristalina líquida tratada com amoníaco de d) com um solvente orgânico hidrofóbico para criar uma microemulsão dos cristais nanométricos de fosfato de cálcio em água,
    - f1) submergir uma superfície recoberta com camada de óxido de um objeto na microemulsão de e1) para depositar a microemulsão sobre a superfície,
    - g1) evaporar o solvente orgânico da superfície de f1) para obter o recobrimento de fosfato de cálcio cristalino nanométrico, e
    - h1) esquentar sob atmosfera inerte com o fim de retirar o tensioativo,ou alternativamente omitir a etapa d) e
    - e2) diluir a fase cristalina líquida de c) com um solvente orgânico hidrofóbico para criar uma microemulsão,

f2) submergir uma superfície recoberta com camada de óxido de um objeto na microemulsão de e2) para depositar a microemulsão sobre a superfície,  
g2) evaporar o solvente orgânico da superfície de f2) para formar uma fase cristalina líquida, e  
h2) colocar a superfície de g2) numa atmosfera de amoníaco para elevar o pH de modo que se formem cristais nanométricos de fosfato de cálcio nos domínios aquosos da fase cristalina líquida e se depositem sobre a superfície, seguido por  
i1) esquentar sob atmosfera inerte com o fim de retirar o tensioativo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o tensioativo em b) ser um tensioativo não iónico.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a superfície recoberta com camada de óxido de f1) ou f2) ser uma superfície de metal.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a superfície de metal ser uma superfície de titânio.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o objeto de f1) ou f2) ser um implante corporal.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o implante corporal ser um implante dental.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado por o fosfato de cálcio ser hidroxiapatita.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, caracterizado por o precursor de fósforo ser ácido fosfórico.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, caracterizado por o precursor de sal de cálcio ser nitrato de cálcio.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, caracterizado por a razão de cálcio em relação com o fósforo ser de 1,67.

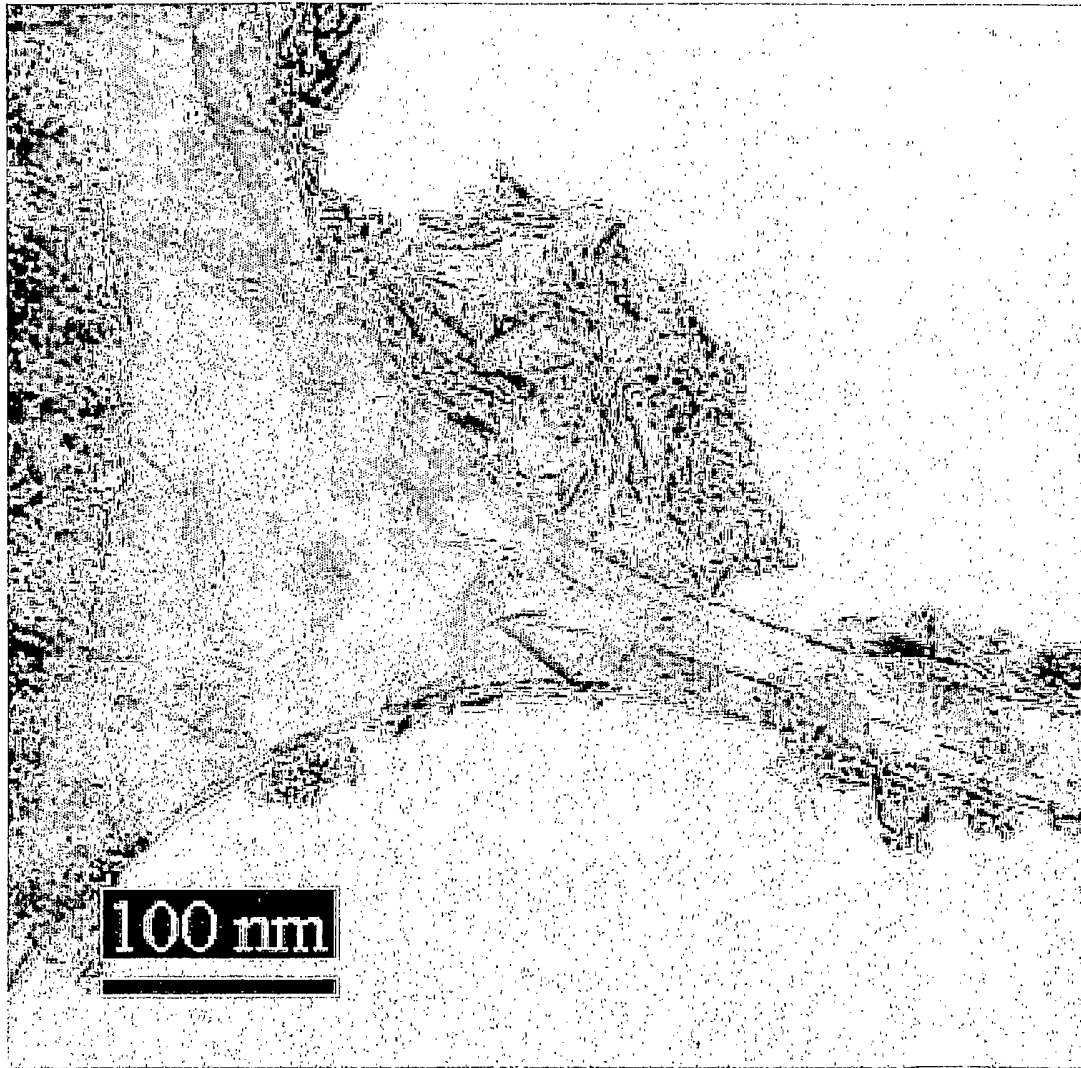


Fig. 1

2/4

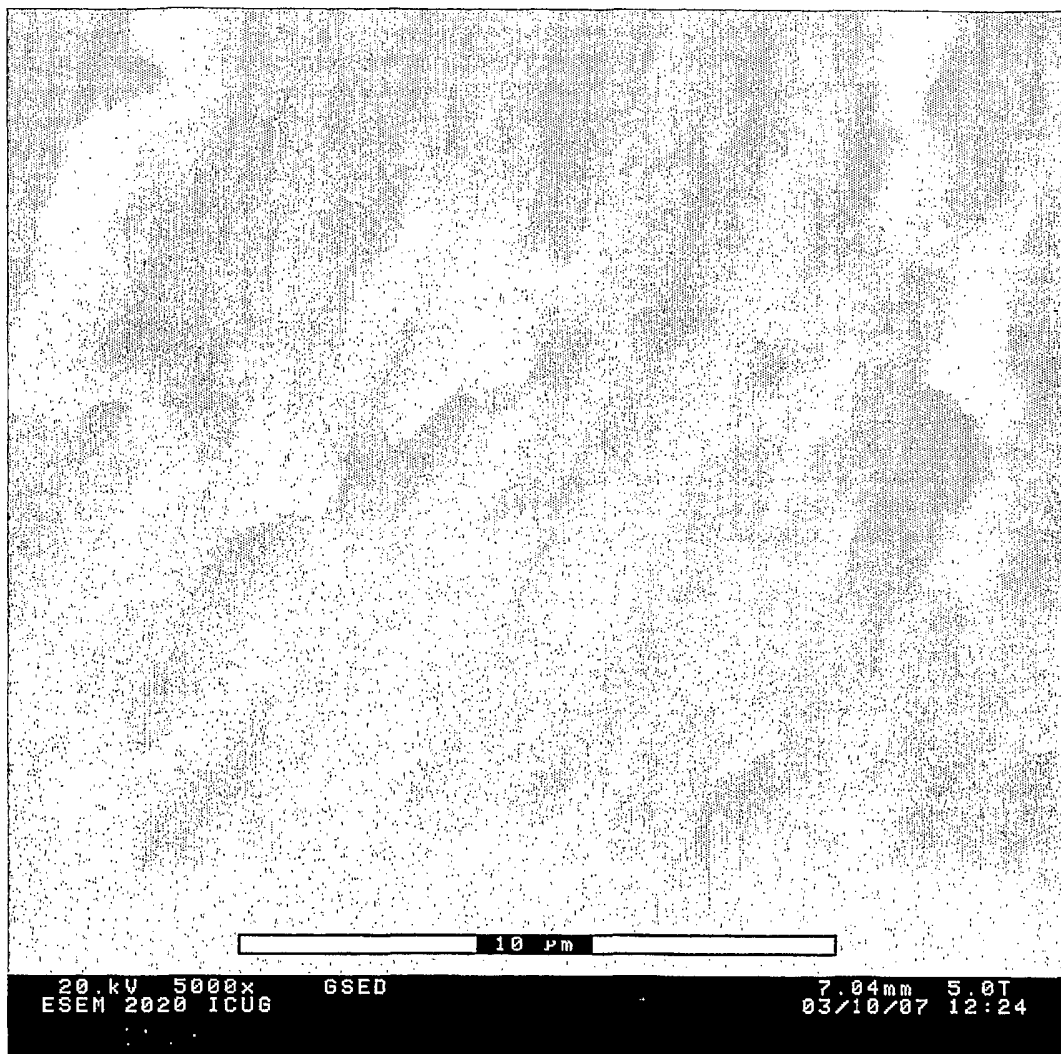
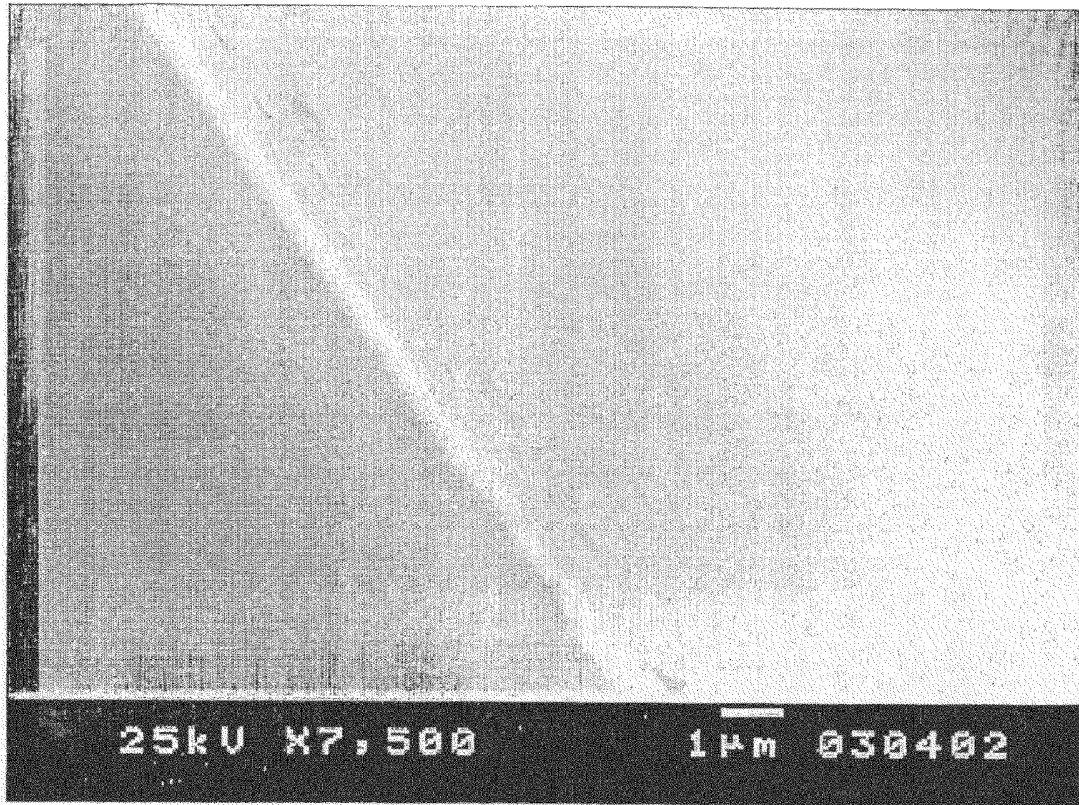


Fig. 2



**Fig. 3**

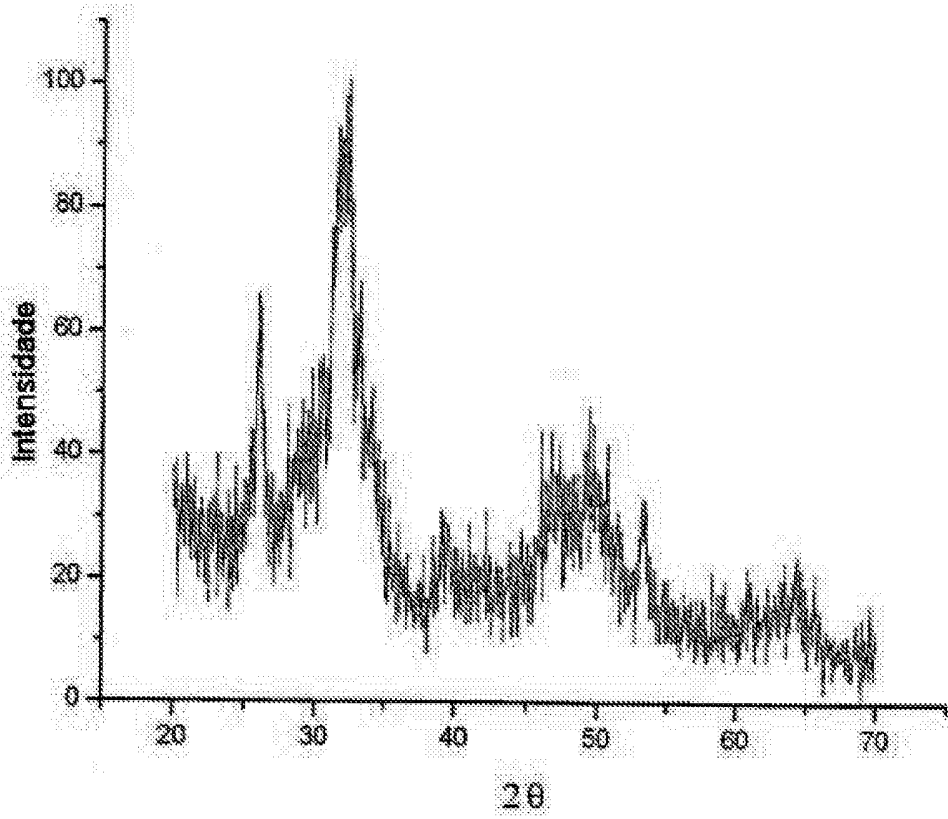


Fig. 4