MD/EP 3813762 T2 2022.06.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **MD/EP 3813762** (13) **T2**

(51) Int. Cl:***A61K 6/17*** (2020.01.01)
A61K 6/54 (2020.01.01)
A61K 6/838 (2020.01.01)
A61K 6/849 (2020.01.01)
A61K 6/864 (2020.01.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 0426

(22) Data de depozit: 2019.06.27

(96) Numărul cererii şi data de depozit a cererii de brevet european: 19742294.2, 2019.06.27

(97) Numărul de publicare şi data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3813762, 2021.05.05

(31) Numărul cererii prioritare: 201800006753

(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.06.28

(33) Ţara cererii prioritare: IT

(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 06/2022, 2022.06.30

(80) Data publicării menţiunii acordării de către OEB: EPB nr. 46/2021, 2021.11.17

(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30

(71) Solicitant: CURASEPT A.D.S. S.R.L., IT
(72) Inventatori: IAFISCO Michele, IT; TAMPIERI Anna, IT
(73) Titular: CURASEPT A.D.S. S.R.L., IT
(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia

MD/EP 3813762 T2 2022.06.30

(54) Fosfat de calciu amorf stabilizat dopat cu ioni de fluorură şi procedeu de obţinere a acestuia

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la un proces de preparare a unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat, care cuprinde următoarele etape: 1) furnizarea unei prime soluţii de sare de calciu şi sare de citrat, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu se află în intervalul de la 1 la 2, astfel obţinând o primă soluţie transparentă; 2) furnizarea unei a doua soluţii de sare, capabilă

2

de a da un anion fosfat şi o sare de carbonat; 3) amestecarea împreună a primei şi celei de-a doua soluţii la un pH în intervalul de la 8 la 11; 4) precipitarea nanoparticulei; şi 5) uscarea nanoparticulei obţinute în etapa 4). De preferinţă şi în mod avantajos, invenţia furnizează adăugarea unui compus de fluorură în etapa 2) pentru obţinerea unei nanoparticule sau unui agregat de nanoparticule de fosfat de

calciu acoperite cu citrat dopate cu fluor. Nanoparticula/aglomeratul de nanoparticule din invenție are o arie superficială deosebită și un diametru care permite utilizarea acesteia ca biomaterial pentru aplicații în stomatologie.

Revendicări: 18
Figuri: 10

(54) Stabilized amorphous calcium phosphate doped with fluoride ions and a process for producing the same

(57) Abstract:

1

The invention relates to a process for the preparation of a citrate-coated amorphous calcium phosphate nanoparticle which comprises the following steps: 1) providing a first solution of a salt of calcium and a citrate salt wherein the molar ratio of citrate ion to calcium ion is in the range from 1 to 2 thus obtaining a clear first solution; 2) providing a second solution of a salt capable to give phosphate anion and a carbonate salt; 3) mixing together the first and the second solution at a pH in the range from 8 to 11; 4) precipitating the nanoparticle; and 5) drying

2

the nanoparticle obtained from step 4). Preferably and advantageously the invention provides for the addition of a fluoride compound in step 2) for obtaining a fluorine-doped citrate-coated calcium phosphate nanoparticle or a nanoparticle agglomerate. The nanoparticle/nanoparticle agglomerate of the invention has a peculiar superficial area and a diameter that allow to use it as a biomaterial for dentistry application.

Claims: 18
Fig.: 10

Descriere:
(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

DOMENIUL INVENŢIEI

Invenţia de faţă se referă la biomateriale de utilizat în medicină, de preferinţă în stomatologie. În mod specific, invenţia se referă la particule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, de preferinţă dopate cu ioni de fluor, şi la un proces de producere a acestora. Invenţia se referă de asemenea la utilizarea particulei din invenţie ca biomaterial în medicină, de preferinţă în stomatologie, ca biomaterial pentru remineralizarea dintelui şi desensibilizant al dentinei.

STADIUL TEHNICII

Fosfatul de calciu amorf (ACP) este una dintre cele mai importante faze ale fosfatului de calciu (CaP) din ştiinţa biomineralizării, precum şi din domeniul materialelor biomedicale. ACP apare în multe sisteme biologice, în special la organismele primitive, în principal ca rezervor de ioni de Ca^{2+} şi PO_4^{3-}. ACP este prima fază precipitată dintr-o soluţie apoasă suprasaturată care conţine ioni de Ca^{2+} şi PO_4^{3-} datorită energiei de suprafaţă mai mici a acesteia comparativ cu hidroxiapatita (HA) şi fosfatul de octacalciu (OCP). ACP este o fază minerală cu un ordin de rază cristalină mic, mai degrabă decât un ordin de rază cristalină mare. Unitatea structurală de ACP, aşa cum a fost propusă de Betts şi Posner, este o aglomerare aproximativ sferică de ioni care are un diametru de 9,5 nm, în concordanţă cu compoziţia chimică $Ca_9(PO_4)_6$.

Se cunoaşte că ACP este un material instabil, şi că se transformă în faze de CaP mai stabile termodinamic (adică HA şi OCP) în soluţie, precum şi în stare uscată, reacţionând cu apa din atmosferă, astfel exacerbând evident problema stabilităţii ACP atunci când este utilizat ca biomaterial final.

ACP este acum studiat pentru a fabrica câteva biomateriale, datorită bioactivităţii excelente a acestuia, adeziunii celulare mari, biodegradării ajustabile şi osteo-conductivităţii bune. Acesta este utilizat, de exemplu, în prepararea de învelişuri de pe protezele metalice, cimenturi injectabile în dispozitive cu auto-setare, şi compozite hibride cu polimeri.

ACP este un material în special atrăgător în stomatologie ca agent de remineralizare a emailului, datorită capacităţii acestuia de a elibera o cantitate semnificativă de ioni de Ca^{2+} şi PO_4^{3-}, comparativ cu altă fază cristalină a CaP. Aceşti agenţi pot fi adăugaţi ca materiale de refacere, sau direct aplicaţi pe suprafaţa dintelui pentru a penetra în leziunile de la suprafaţa emailului. ACP a fost propus a fi o fază precursoare esenţială în timpul formării ţesutului mineralizat. De aceea, utilizarea ACP poate furniza o strategie de remineralizare biomimetică, prin mimarea proceselor de biomineralizare care formează noua fază minerală.

Demineralizarea ţesuturilor dure dentare (email şi dentină), este responsabilul principal pentru cariile dentare şi hipersensibilitatea dentinei. Aceasta este cauzată de un mediu cu pH scăzut, care, la rândul său, are trei cauze principale: aportul de băuturi sau alimente acide, prezenţa bolii de reflux gastroesofagian sau activitatea acidogenă a unui biofilm oral patogen. Atunci când valoarea pH-ului salivei scade sub 5,5, hidroxiapatita (HA), care este constituentul mineral principal al ţesuturilor dentare care reprezintă în email şi dentină 96 % de gr., şi 75 % de gr., în mod corespunzător, începe să se dizolve.

Demineralizarea este un proces reversibil dacă ţesuturile vătămate sunt expuse la un mediu oral care favorizează remineralizarea. De exemplu, cavităţile din email cauzate de procesele de demineralizare sunt remineralizate natural prin creşterea epitaxială a cristalelor reziduale care acţionează ca locuri de nucleaţie, cu saliva furnizând un mediu suprasaturat cu ioni de Ca^{2+} şi PO_4^{3-} în raport cu HA. Cu toate acestea, remineralizarea emailului de către salivă este rareori complet realizată, în special atunci când există un dezechilibru între durata şi proporţia fazelor de demineralizare/remineralizare. Pentru a inversa eficient demineralizarea şi a stimula remineralizarea, utilizarea unei surse externe care furnizează ioni de Ca^{2+} şi PO_4^{3-} posibil în leziunile cristalului şi în vidurile acestuia pentru a creşte suprasaturarea în HA şi produce un câştig mineral net, poate fi de ajutor. De aceea, câteva formulări care conţin forme diferite de CaP (adică, HA, fluoro-hidroxiapatită (FHA), fosfat tetracalcic (TTCP), fosfat beta-tricalcic (β-TCP), ACP, etc.) au fost raportate ca agenţi de vindecare pentru demineralizarea emailului. Cu toate acestea, problema principală la aplicarea unei faze cristaline de CaP în cavitatea orală pentru a promova remineralizarea este solubilitatea slabă a acestuia, în special în prezenţa ionilor fluorură, astfel încât ionii de Ca^{2+} şi PO_4^{3-} sunt indisponibili.

A fost raportat recent că citratul joacă un rol dual cheie în cristalizarea HA: dirijând o cale de creştere printr-un precursor amorf, şi controlând mărimea nanoparticulelor prin mecanismul de creştere a cristalului de agregare orientată neclasic.

Suplimentar, fluorura este agentul profilactic cel mai pe larg utilizat pentru a reduce şi a împiedica demineralizarea emailului, rămânând până acum cel mai eficace agent pentru prevenirea cariilor. Se crede că fluorura funcţionează prin două mecanisme diferite: i) înlocuirea grupelor hidroxil ale HA nou formate, având ca rezultat fluorapatita [FHA, $Ca_5(PO_4)_3F$], care este mai puţin solubilă, şi

astfel mai rezistentă la atacul acid decât HA: ii) inhibarea căilor metabolice şi fiziologice ale microorganismelor din biofilmul cariogen, care produc acizi organici pentru a demineraliza ţesutul dentar.

Un prim obiectiv al invenţiei de faţă este de aceea livrarea de Ca^{2+}, PO_4^{3-} şi F^- în leziunile emailului, ducând la un efect de remineralizare îmbunătăţit, şi în acelaşi timp la ocluzia tubulilor dentari.

În WO2016/012452A1 se descrie un proces de obţinere a unor nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluorură, care pot fi aplicate în medicină şi în produsele pentru stomatologie, cum ar fi ape de gură, paste de dinţi, gume de mestecat, ca agent de remineralizare a emailului şi dentinei.

În mod specific, procesul descris aici cuprinde următoarele etape:

- Prepararea unei soluţii de $CaCl_2$ într-o concentraţie cuprinsă între 0,08 M şi 0,12 M şi citrat de sodiu într-o concentraţie cuprinsă între 0,35 M şi 0,50 M;
- prepararea unei a doua soluţii formate din Na_2HPO_4 într-o concentraţie cuprinsă între 0,10 M şi 0,15 M cu Na_2CO_3 0,2 M şi un compus de fluorură;
- amestecarea sub agitare a celor două soluţii preparate în etapele anterioare în proporţia de 1:1 v/v şa un pH cuprins între 8,3 şi 8,7 (ajustat, de exemplu, cu HCl) şi la temperatura camerei o perioadă de timp mai mică de 2 minute;
- trei cicluri succesive de sedimentare prin centrifugare, îndepărtarea supernatantului şi spălarea precipitatului cu apă ultrapură; şi
- uscarea prin îngheţare a precipitatului umed.

Acest proces permite obţinerea de nanoparticule care a rezultat că au un răspuns biologic în celulele osteoblaste, în mod specific o proliferare celulară a fost observată la concentraţii diferite de nanoparticule, în paralel fiind complet biocompatibile în contact cu celulele osteoblaste.

Chiar dacă nanoparticulele din WO2016/012452 au rezultat a fi un bun biomaterial adaptat pentru remineralizarea emailului, există totuşi necesitatea de a avea biomateriale care sunt eficace şi capabile de a acţiona ca agent de remineralizare într-o perioadă de timp scurtă.

REZUMATUL INVENŢIEI

Inventatorii invenţiei de faţă au descoperit în mod surprinzător un proces de preparare a unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, care cuprinde următoarele etape:

1) furnizarea unei prime soluţii a unei sări de calciu şi unei sări de citrat, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu se află în intervalul de la 1 la 2, obţinând astfel o primă soluţie transparentă;
2) furnizarea unei a doua soluţii a unei sări capabile de a dona anioni fosfat şi o sare de carbonat;
3) amestecarea împreună a primei soluţii transparente cu cea de-a doua soluţie la un pH în intervalul de la 8 la 11;
4) precipitarea nanoparticulei; şi
5) uscarea nanoparticulei obţinute în etapa 4).

În procesul din invenţie, prima soluţie este transparentă înainte ca etapa de amestecare să fie efectuată. Expresia „primă soluţie transparentă" înseamnă că prima soluţie este substanţial lipsită de orice tip de materie în particule.

În mod avantajos, etapa 5) este o etapă de uscare prin îngheţare.

Într-un alt aspect invenţia se referă la o nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat, care poate fi obţinută prin procesul în conformitate cu invenţia, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare, nanoparticula menţionată fiind caracterizată printr-o arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă, cu diametrul în intervalul de la 30 la 80 nm, după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

De aceea, într-o primă concretizare, aria superficială a nanoparticulei se află în intervalul de la 250 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1}, după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere şi unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), şi nanoparticula menţionată are de preferinţă o morfologie de formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm. Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente capabile de a avea imagini de microscopie electronică de transmisie (TEM).

În mod avantajos, etapa 5) este o etapă de uscare prin pulverizare.

Într-un alt aspect, invenţia se referă la un aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, care poate fi obţinut prin procesul în conformitate cu invenţia, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menţionat fiind caracterizat printr-o arie superficială de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o formă sferică, cu diametrul în intervalul de la 2 la 25 µm, după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

După cum va fi de asemenea evident din partea experimentală de mai jos, atunci când etapa 5) constă dintr-o etapă de uscare prin pulverizare, produsul final este un aglomerat de nanoparticule care

corespunde unei microparticule care are un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm. De aceea, într-o a doua concretizare, aria superficială a aglomeratului de nanoparticule se află în intervalul de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbție a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere și unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy) și aglomeratul de nanoparticule menționat are de preferință o formă sferică și un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm. Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente pentru microscopie electronică de scanare (SEM).

Într-un aspect suplimentar și preferat al invenției, se permite obținerea unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluor, prin furnizarea adăugării unui compus de fluorură în cea de-a doua soluție a etapei 2).

De aceea, Într-un alt aspect, și preferat, invenția se referă la o nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat dopată cu fluor, care poate fi obținută prin procesul în conformitate cu invenția, și cuprinzând adăugarea unui compus de fluorură în etapa 2), în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin înghețare, nanoparticula menționată fiind caracterizată printr-o arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbție a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), și având o morfologie de formă rotundă, cu diametrul în intervalul de la 30 la 80 nm, după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

De aceea, într-o primă concretizare, aria superficială a nanoparticulei de fosfat de calciu amorfe acoperite cu citrat dopat cu fluor, se află în intervalul de la 250 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbție a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere și unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy) și nanoparticula menționată are de preferință o formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm. Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente capabile de a avea imagini de microscopie electronică de transmisie (TEM).

Într-un alt aspect, și preferat, invenția se referă la un aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluor, care poate fi obținut prin procesul în conformitate cu invenția și cuprinzând adăugarea unui compus de fluorură în etapa 2), în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menționat fiind caracterizat printr-o arie superficială de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbție a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), și având un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

Aria suprafeței se măsoară prin metoda de adsorbție a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere și unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

Într-un aspect suplimentar, invenția se referă la utilizarea nanoparticulei sau a aglomeratului de nanoparticule din invenție, ca biomaterial în tratamentul cavității orale, în general în stomatologie. De preferință, biomaterialul este utilizat ca agent de remineralizare, de preferință pentru remineralizarea țesuturilor dure dentare, sau ca desensibilizator al dentinei, unde, în acest ultim caz, acțiunea acestuia este de preferință de a umple și astupa tubulii dentinali.

În mod specific, biomaterialul este un agent de remineralizare, de preferință în caz de abfracție, eroziune, carie, abraziune, pete albe și hipomineralizare.

Într-un alt aspect suplimentar, invenția se referă la utilizarea unei particule din invenție ca biomaterial în aplicații ortopedice.

În mod surprinzător, nanoparticula stabilizată cu citrat și nanoparticula stabilizată cu citrat dopată cu fluor din invenție au o arie a suprafeței mare, care are ca rezultat capacitatea de a livra ioni de Ca^{2+} și F^{1-} într-o manieră foarte rapidă, clar mai rapidă decât nanoparticulele din stadiul tehnicii, cum ar fi cele descrise în WO2016/012452.

Fără a fi legați de nici o teorie specifică, și după cum va fi explicat mai mult în partea experimentală, inventatorii au considerat că proprietatea surprinzătoare de a livra ioni de Ca^{2+} și F^{1-} în mod foarte rapid, este datorată procesului, adică

raportului molar dintre ionul citrat și ionul de calciu în intervalul de la 1 la 2.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1A prezintă micrografia TEM a ACP^4 preparat în exemplul 1; (insert: corespunde structurii SAED)

Figura 1B prezintă spectrele de XRD ale ACP^4 preparat în exemplul 1;

Figura 1C prezintă spectrele FT-IR ale ACP^4 preparat în exemplul 1;

Figura 2A prezintă micrografia TEM a F-ACP^4 preparat în exemplul 1; (insert: corespunde structurii SAED)

Figura 2B prezintă spectrul de XRD al F-ACP^4 preparat în exemplul 1;

Figura 2C prezintă spectrele FT-IR ale F-ACP^4 preparat în exemplul 1;

Figura 3A prezintă micrografia TEM a ACP^1, preparat în exemplul 2; (insert: corespunde structurii SAED)
Figura 3B prezintă spectrele de XRD ale ACP^2, ACP^1, $F\text{-}ACP^1$, $F\text{-}ACP^2$ preparate în exemplul 2;
Figura 3C prezintă spectrele FT-IR ale ACP^2, ACP^1, $F\text{-}ACP^1$, $F\text{-}ACP^2$ preparate în exemplul 2;
Figura 4A raportează eliberarea cumulativă a Ca^{2+} din probele de ACP preparate în exemplul 1 şi exemplul 2; (n = 5);
Figura 4B raportează eliberarea cumulativă a Ca^{2+} din probe F-ACP preparate în exemplul 1 şi exemplul 2; datele sunt exprimate ca medie ± deviaţie standard (n = 5);
Figura 4C raportează F^- cumulativ din probe de F-ACP preparate în exemplul 1 şi exemplul 2; datele sunt exprimate ca medie ± deviaţie standard (n = 5);
Figura 5 prezintă Spectrul de XRD al $F\text{-}ACP^1$ uscat prin pulverizare din exemplul 8;
Figura 6 prezintă micrografiile SEM la măriri diferite ale $F\text{-}ACP^1$ uscat prin pulverizare din exemplul 8;
Figura 7 prezintă spectrele de XRD ale ACP^2, ACP^1, $F\text{-}ACP^2$, $F\text{-}ACP^1$ preparate în exemplul 2, la un an după sinteză, depozitate la temperatura camerei din exemplul 9;
Figura 8 prezintă spectrele de XRD ale $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ preparate în exemplul 2bis;
Figura 9 prezintă spectrele FT-IR ale $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ preparate în exemplul 2bis;
Figura 10A raportează eliberarea cumulativă a Ca^{2+} din probe de $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ preparate în exemplul 2bis; datele sunt exprimate ca medie ± deviaţie standard (n = 5); şi
Figura 10B raportează eliberarea cumulativă a F^- din probe de $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ preparate în exemplul 2bis; datele sunt exprimate ca medie ± deviaţie standard (n = 5).

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENŢIEI

De aceea, invenţia se referă la un proces pentru prepararea unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, care cuprinde următoarele etape:
1) furnizarea unei prime soluţii a unei sări de calciu şi unei sări de citrat, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu se află în intervalul de la 1 la 2 obţinând astfel o primă soluţie transparentă;
2) furnizarea unei a doua soluţii a unei sări capabile de a da anioni fosfat şi o sare de carbonat;
3) amestecarea împreună a primei soluţii transparente cu cea de-a doua soluţie la un pH în intervalul de la 8 la 11;
4) precipitarea nanoparticulei; şi
5) uscarea nanoparticulei obţinute în etapa 4).

Etapa 1) a procesului constă din furnizarea unei prime soluţii a unei sări de calciu şi unei sări de citrat, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu se află în intervalul de la 1 la 2. Prima soluţie astfel obţinută este transparentă.

Sarea de calciu este de preferinţă fabricată dintr-un anion selectat din grupul constând din clorură, nitrat, hidroxid, acetat, oxalat, lactat, mai preferabil anionul este clorură.

Sarea de citrat este de preferinţă fabricată dintr-un cation selectat din grupul constând din sodiu şi potasiu, mai preferabil cationul este sodiu.

Mai preferabil, raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu este aproximativ 1.

Chiar mai preferabil, raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu este aproximativ 2. Într-o concretizare preferată, prima soluţie din etapa 1) a procesului în conformitate cu invenţia cuprinde cel puţin o sare suplimentară selectată din grupul constând din: o sare de stronţiu, şi o sare de magneziu.

Sarea de stronţiu este de preferinţă fabricată dintr-un anion selectat din grupul constând din clorură, nitrat, hidroxid, acetat, oxalat, lactat, mai preferabil anionul este clorură.

Sarea de magneziu este de preferinţă fabricată dintr-un anion selectat din grupul constând din clorură, nitrat, hidroxid, acetat, oxalat, lactat, mai preferabil anionul este clorură.

Etapa 2) constă din furnizarea unei a doua soluţii a unei sări capabile de a da anioni fosfat şi o sare de carbonat.

De preferinţă, raportul dintre anionul carbonat şi fosfat se află în intervalul de la 1 la 1,66.

De preferinţă, sarea capabilă de a da anioni fosfat este o sare de fosfat, hidrogen fosfat sau hidrogen fosfat. Sarea capabilă de a da anioni fosfat este de preferinţă, fabricată dintr-un cation selectat din grupul constând din sodiu, potasiu şi amoniu, mai preferabil cationul este sodiu.

Etapa 3) constă din amestecarea împreună a primei şi celei de-a doua soluţii la un pH în intervalul de la 8 la 11, de preferinţă, 8,5-10,7.

Într-un aspect avantajos, raportul dintre prima şi a doua soluţie se află în intervalul de la 1: 1 la 1:1,5.

În conformitate cu invenţia, etapa de amestecare 3) este executată după ce prima soluţie este transparentă. De preferinţă, cea de-a doua soluţie se adaugă la prima soluţie transparentă pentru etapa de amestecare.

Etapa 4) constă din precipitarea nanoparticulei.

Etapa de precipitare poate fi executată în mod avantajos, prin furnizarea de cicluri de sedimentare prin centrifugare, după care îndepărtarea supernatantului poate fi executată în conformitate cu metode bine cunoscute. În momentul în care precipitatul este colectat, acesta poate fi spălat de preferinţă cu apă ultrapură. Precipitatul umed este apoi uscat în conformitate cu metodele de uscare cunoscute în domeniu.

Etapa 5) constă din o etapă de uscare a nanoparticulei precipitate din invenţie.

Etapa de uscare poate fi executată prin orice mijloace adecvate cunoscute în domeniu.

De preferinţă, etapa de uscare poate fi selectată dintre uscare prin îngheţare, uscare prin pulverizare şi uscare în cuptor ventilat. Aceasta ultima este de preferinţă executată după spălarea cu etanol şi la o temperatură de aproximativ 40°C.

Într-un aspect preferat, etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare.

Într-un aspect preferat, invenţia se referă la o nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat, care poate fi obţinută prin procesul în conformitate cu invenţia, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare, nanoparticula menţionată fiind caracterizată printr-o arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1}, de preferinţă, de la 270 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1}, după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

De aceea, într-o primă concretizare, aria superficială a nanoparticulei se află în intervalul de la 250 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1}, de preferinţă, de la 270 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1}, după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere şi unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy) şi nanoparticula menţionată are de preferinţă, o formă sferică, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm. Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente capabile de a avea imagini de microscopie electronică de transmisie (TEM).

Într-un aspect avantajos suplimentar, etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare.

Într-un aspect preferat, invenţia se referă la un aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, care poate fi obţinut prin procesul în conformitate cu invenţia, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menţionat fiind caracterizat printr-o arie superficială de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

De aceea, într-o primă concretizare, aria superficială a aglomeratului de nanoparticule se află în intervalul de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere şi unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy) şi aglomeratul de nanoparticule menţionat are de preferinţă, o formă sferică, şi un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm. Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente pentru microscopie electronică de scanare (SEM).

Într-un aspect suplimentar şi preferat al invenţiei, se permite obţinerea unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluor, prin furnizarea adăugării unui compus de fluorură în cea de-a doua soluţie a etapei 2).

De preferinţă, compusul de fluorură este fluorura unui cation selectat din grupul constând din sodiu şi potasiu.

De aceea, într-un alt aspect, şi preferat, invenţia se referă la o nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat dopată cu fluor, care poate fi obţinută prin procesul în conformitate cu invenţia şi cuprinzând adăugarea unui compus de fluorură în etapa 2), în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare, nanoparticula menţionată fiind caracterizată printr-o arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1}, de preferinţă, de la 270 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1}, după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm, după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

De aceea, într-o primă concretizare, aria superficială a nanoparticulei de fosfat de calciu amorfe acoperite cu citrat dopate cu fluor, se află în intervalul de la 250 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1} , de preferinţă, de la 270 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1}, după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere şi unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy) şi nanoparticula menţionată are de preferinţă, o formă sferică, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm.

Toate instrumentele utilizate pentru determinarea diametrului sunt instrumente capabile de a avea imagini de microscopie electronică de transmisie (TEM).

Într-un alt aspect, şi preferat, invenţia se referă la un aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluor, care poate fi obţinut prin procesul în conformitate cu invenţia, şi cuprinzând adăugarea unui compus de fluorură în etapa 2), în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menţionat fiind caracterizat printr-o arie superficială de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 2 la 25 µm, după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

Aria suprafeţei se măsoară prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), prin utilizarea de probe de pulbere şi unui Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

Într-un aspect suplimentar, invenţia se referă la utilizarea unei particule din invenţie ca biomaterial pentru utilizare în aplicaţi de stomatologie. De preferinţă, biomaterialul este utilizat pentru remineralizarea ţesuturilor dentare dure, sau ca desensibilizator al dentinei, în care, în acest ultim caz, acţiunea acestuia este de preferinţă, de a umple şi de a astupa tubulii dentinali.

Într-un aspect suplimentar, invenţia se referă la utilizarea unei particule din invenţie ca biomaterial în aplicaţii ortopedice.

PARTE EXPERIMENTALĂ

Materiale

Clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, ≥99,0% puritate), citrat de sodiu tribazic dihidrat ($Na3(C6H5O7) \cdot 2H_2O$, ≥99,0% puritate (de acum înainte denumit Na3(Cit)), fosfat de sodiu dibazic dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, ≥99,0% puritate), clorură de stronţiu clorură hexahidrat ($SrCl2 \cdot 6H2O$, ≥99,0% puritate), clorură de magneziu hexahidrat ($MgCl2 \cdot 6H2O$, ≥99,0% puritate), carbonat de sodiu monohidrat ($Na_2CO_3 \cdot 2H_2O$, ≥99,0% puritate), fluorură de sodiu (NaF, ≥99,0% puritate), clorură de potasiu (KCI ≥99,5% puritate), tiocianat de potasiu (KSCN ≥98,0% puritate), carbonat de sodiu monobazic ($NaHCO_3$, ≥99,7% puritate) şi acid lactic ($C_3H_6O_3$ ≥90,0% puritate) au fost cumpărate de la Sigma Aldrich (St. Luis, MO, USA). Toate soluţiile au fost preparate cu apă ultrapură (0,22 µS, 25 °C, MilliQ©, Millipore).

Instrumente şi metode de evaluare

Spectrele de difracţie de raze X (XRD) ale probelor raportate în tabelul 1 au fost înregistrate pe un difractometru D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Germany) prevăzut cu un detector sensibil de pozitroni Lynx-eye utilizând radiaţie Cu Kα (λ = 1,54178 Å) generate la 40 kV şi 40 mA. Spectrele au fost înregistrate în intervalul 2θ de la 10 la 60° cu o mărime a pasului (2θ) de 0,021 şi un timp de numărare de 0,5 s.

Au fost executate analizele de spectroscopie de infraroşu cu transformată Fourier (FT-IR) pe un spectrometru Nicolet 5700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) cu o rezoluţie de 2 cm^{-1} prin acumularea a 64 de scanări, care acoperă intervalul de la 4000 la 400 cm^{-1}, utilizând metoda peletei de KBr.

Microscopia de transmisie electronică (TEM) şi evaluarea de difracţie electronică a zonei selectate (SAED) au fost executate cu un microscop Tecnai F20 (Fei Corp., Hillsboro, OR, USA) care operează la 120 kV. Probele de pulbere au fost dispersate ultrasonic în apă ultrapură, şi apoi câteva picături de nămol au fost depozitate pe reţele TEM de cupru cu mărime 200, acoperite cu filme de carbon amorf subţiri, şi incubate timp de câteva minute.

Cuantificarea Ca şi P, Mg, şi Sr a fost executată cu un spectrometru de emisie atomică plasmatică cuplată inductiv (ICP-OES) (Agilent Technologies 5100 ICP-OES, Santa Clara, CA, USA), în timp ce F a fost cuantificat cu un electrod de ioni de fluor (Intellical™ ISEF121, Hach Lange, Loveland, CO, USA). Probele au fost preparate dizolvând o alicotă de pulbere într-o soluţie 1% de gr. de HNO_3.

Analizele de termogravimetrie (TGA) au fost executate utilizând un aparat STA 449 Jupiter (Netzsch GmbH, Selb, Germany). Aproximativ 10 mg de probă au fost cântărite într-un creuzet de platină şi încălzite de la temperatura camerei la 1200 °C sub un curent de aer, cu o viteză de încălzire de 10 °C/min.

Metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), a fost utilizată pentru a măsura aria suprafeţei specifice (SSA) a probelor în pulbere, utilizând un Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

Evaluarea de microscopie electronică de scanare (SEM) a fost executată utilizând un Sigma NTS Gmbh (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Probele de pulbere au fost puse pe bare de aluminiu scurte, utilizând bandă de carbon, şi înainte, pulberea de analizat a fost acoperită cu aur într-un Sputter Coater E5100 (Polaron Equipment, Watford, Hertfordshire, UK) sub argon la 10^{-3} mbari timp de 4 minute, cu un curent de pulverizare de 30 mA.

Exemplul 1

Prepararea nanoparticulelor din WO2016/016012452 din stadiul tehnicii

ACP pulbere uscată (fosfat de calciu amorf) a fost sintetizat prin amestecarea a două soluţii (1:1 v/v, 200 ml total) la temperatura camerei de (i) 100 mM $CaCl_2$ + 400 mM Na_3(Cit) şi (ii) 120 mM

Na_2HPO_4 + 200 mM Na_2CO_3. PH-ul a fost ajustat la 8,5 cu soluție de HCl. Atunci când amestecul a devenit lăptos, particulele au fost spălate cu apă ultrapură prin centrifugare la 5000 rpm timp de 15 minute, termostatate la 4 °C și apoi uscate prin înghețare peste noapte la -50 °C sub un vid de 3 mbari.

Probele de F-ACP au fost preparate similar cu ACP, în timp ce 50 mM NaF_2 a fost adăugată la soluția (ii).

Exemplul 2

Prepararea nanoparticulelor din invenție

Urmând aceeași preparare ca cea din exemplul 1, probe de ACP și F-ACP (dopat utilizând 50 mM NaF_2) au fost de asemenea preparate scăzând raportul molar inițial Cit/Ca la 2 și 1 (codificat de aici înainte sub denumirea de ACP^2, $F\text{-}ACP^2$ și ACP^1, $F\text{-}ACP^1$, în mod corespunzător).

Exemplul 2bis

Prepararea nanoparticulelor din invenție cu Mg și Sr

Urmând prepararea din exemplul 2, probe de SrF-ACP, MgF-ACP și SrMgF-ACP au fost de asemenea preparate similar cu F-ACP, în timp ce 5 mM $SrCl_2$ sau 40 mM $MgCl_2$ sau ambele au fost adăugate la soluția (i). Raportul molar inițial al Cit/Ca de 2 și 1 (codificat de aici înainte sub denumirea de $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$ și $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$, în mod corespunzător) a fost utilizat.

Codurile probelor și concentrația reactanților chimici utilizați pentru prepararea din exemplul 1 și exemplul 2 sunt raportate în tabelul 1 care urmează.

Tabelul 1

Probă	Cit/Ca	NaF (mM)	$CaCl_2$ (mM)	Na3(Cit) (mM)	Na_2HPO_4 (mM)	Na_2CO_3 (mM)	$MgCl_2$ (mM)	$SrCl_2$ (mM)
ACP^4	4	-	100	400	120	200	-	-
$F\text{-}ACP^4$	4	50	100	400	120	200	-	-
ACP^2	2	-	100	200	120	200	-	-
$F\text{-}ACP^2$	2	50	100	200	120	200	-	-
ACP^1	1	-	100	100	120	200	-	-
$F\text{-}ACP^1$	1	50	100	100	120	200	-	-
$SrF\text{-}ACP^2$	2	50	100	200	120	200	-	5
$MgF\text{-}ACP^2$	2	50	100	200	120	200	40	-
$SrMgF\text{-}ACP^2$	2	50	100	200	120	200	40	5
$SrF\text{-}ACP^1$	1	50	100	100	120	200	-	5
$MgF\text{-}ACP^1$	1	50	100	100	120	200	40	-
$SrMgF\text{-}ACP^1$	1	50	100	100	120	200	40	5

Probele din stadiul tehnicii au un raport molar între citrat şi calciu de 4, în timp ce probele din invenţia de faţă au fost preparate cu un raport molar în intervalul de la 1 la 2.

Exemplul 3: Evaluarea caracteristicilor fizice şi a compoziţiilor de particule de ACP^4 preparat în exemplul 1

Pulbere uscată de ACP^4 preparată în exemplul 1 a fost evaluată pentru proprietăţile fizice cu instrumentele raportate mai sus.

În figura 1A, micrografia TEM a ACP^4 este raportată, relevând nanoparticule cu formă rotundă mai degrabă decât cu faţetele şi forma unghiulară tipică pentru CaP cristalin, cu mărimi în intervalul între 20 şi 50 nm. Modelul SAED colectat pentru astfel de nanoparticule (insertul de la dreapta sus din Fig. 1A) demonstrează natura amorfă a acestora, datorită prezenţei aripilor difuze, mai degrabă decât a petelor.

Spectrul de XRD al ACP^4 (Fig. 1B) revelează o bandă lată la aproximativ 30° (2θ), tipică pentru o fază fără o regularitate periodică de interval lung, confirmând structura ne-cristalină a ACP^4 şi excluzând prezenţa HA şi a altor faze cristaline de CaP. Spectrul de FT-IR (Fig. 1C) prezintă benzi late, nerezolvate, caracteristicile CaP având structură amorfă. În special, benzile de adsorbţie la aproximativ 560 şi 1050 cm^{-1} au fost asociate cu modurile de îndoire şi întindere ale grupelor fosfat, în mod corespunzător; cele la aproximativ 870 cm^{-1} şi în intervalul de 1400-1500 cm^{-1} au fost atribuite ionilor carbonat, în timp ce banda de la aproximativ 1605 cm^{-1} a fost atribuită apei adsorbite, precum şi întinderii COO$^-$ din citrat.

De aceea, Figurile 1A, 1B, 1C, au confirmat forma sferică a nanoparticulelor fabricate din fosfat de calciu amorf.

Exemplul 4: Evaluarea caracteristicilor fizice şi ale compoziţiilor de particule de F-ACP preparat în exemplul 1

Cu referire la exemplul 1, într-o primă etapă, concentraţia reactivilor, precum şi raportul Cit/Ca, au fost menţinute constante, respectând protocolul utilizat pentru prepararea ACP^4, în timp ce NaF a fost adăugată pentru a dopa ACP^4 (denumit de aici înainte F-ACP^4)).

Imaginea de TEM a F-ACP^4 (Fig. 2A) prezintă particule cu formă rotundă, având mărime şi morfologie similare cu cele ale ACP^4. Modelul SAED colectat pentru astfel de nanoparticule (insertul din dreapta sus din Fig. 2A) le demonstrează natura amorfă, datorită prezenţei aripilor difuze, mai degrabă decât a petelor. Spectrele de XRD ale F-ACP^4 (Fig. 2B) arată acelaşi pic de difracţie lat la aproximativ 30° (2θ) din cel înregistrat pentru ACP^4 indicând că prezenţa ionilor de F$^-$ nu a produs precipitarea sării fluorură sau a altor faze cristaline de CaP. Spectrele FT-IR ale F-ACP^4 prezintă de asemenea o bandă lată, nerezolvată, similară cu cele raportate în spectrul FT-IR al ACP^4 (Fig. 2C).

Exemplul 5: Evaluarea caracteristicilor fizice şi ale compoziţiilor de particule de ACP şi F-ACP preparate în exemplul 2

După cum a fost raportat mai sus, două probe de ACP au fost preparate, schimbând raportul nominal Cit/Ca al reactivilor în conformitate cu invenţia, care a fost setat la 4, în conformitate cu stadiul tehnicii, la 2 sau 1 (de aici înainte denumite ACP^2 şi ACP^1, în mod corespunzător) în conformitate cu invenţia, pentru a evalua efectul raportului molar Cit/Ca asupra caracteristicilor chimico-fizice ale acestor materiale amorfe. Mai mult, aceeaşi cantitate de NaF utilizată pentru sinteza F-ACP^4 a fost utilizată pentru a dopa ACP^2 şi ACP^1, şi aceste probe au fost denumite F-ACP^2 şi F-ACP^1 în mod corespunzător.

Imaginile de TEM ale ACP^2 (nearătate) şi ACP^1 (Fig. 3A) prezintă particule cu formă rotundă, având mărimea şi forma comparabile cu cele ale ACP^4. Modelul SAED colectat pentru ACP^1 (insertul din dreapta sus din Fig. 3A) le demonstrează natura amorfă, datorită aripilor difuze, mai degrabă decât petelor. De asemenea, în acest caz, adăugarea de F$^-$ nu a indus schimbări ale morfologiei şi mărimii, comparativ cu contrapărţile nedopate ale acestora. Spectrele de XRD ale ACP^2, ACP^1, F-ACP^2 şi F-ACP^1 (Fig. 3B) au prezentat aceeaşi bandă de difracţie lată, caracteristică unei faze amorfe pure. Spectrele FT-IR ale ACP^2, ACP^1, F-ACP^2 şi F-ACP^1 (Fig. 3C) au prezentat de asemenea benzi late, nerezolvate, similare cu cele raportate în alte spectre FT-IR.

Particulele de ACP sau F-ACP în conformitate cu invenţia, de aceea au avut formă rotundă, şi au avut dimensiuni similare cu cele din stadiul tehnicii.

Exemplul 5 bis

Spectrele de XRD ale SrF-ACP^2, MgF-ACP^2, SrMgF-ACP^2, SrF-ACP^1, MgF-ACP^1, SrMgF-ACP^1 (Fig. 8) au prezentat aceeaşi bandă de difracţie lată, caracteristică unei faze amorfe pure. Spectrele FT-IR ale SrF-ACP^2, MgF-ACP^2, SrMgF-ACP^2, SrF-ACP^1, MgF-ACP^1, SrMgF-ACP^1 (Fig. 9) au prezentat de asemenea benzi late, nerezolvate, similare cu cele raportate în celelalte spectre FT-IR.

Exemplul 6: Compoziţia chimică a probelor preparate în exemplul 1 şi în Exemplul 2 şi în Exemplul 2bis

Compoziţia chimică a probelor preparate în exemplul 2 este rezumată în tabelul 2.

Tabelul 2

Probă	Ca[a] (% de gr.)	P[a] (% de gr.)	Calciu + Stronţiu +Magneziu /Fosfat[a] (moli)	F[b] (% de gr.)	Mg[a] (% de gr.)	Sr[a] (% de gr.)	Citrat[c] (% de gr.)	Carbonat[c] (% de gr.)	SSA_{BET}[d] (m^2g^{-1})
ACP[2]	29,1±1,0	13,2±0,3	1,70±0,02	-			2,2±0,2	3,8±0,4	287±29
F-ACP[2]	32,1±0,5	13,1±0,2	1,89±0,01	2,2±0,1			2,0±0,2	3,4±0,3	328±33
ACP[1]	28,0±0,6	12,7±0,2	1,70±0,04	-			1,8±0,2	3,2±0,3	309±31
F-ACP[1]	31,9±0,8	13,1±0,3	1,88±0,01	1,8±0,1			2,4±0,2	3,1±0,3	293±29
SrF-ACP[2]	29,4 ±0,1	12,9±0,1	1,86±0,02	2,5±0,1	-	3,8±0,1	2,3±0,2	3,4±0,3	287±29
MgF-ACP[2]	27,3 ±0,4	14,2 ±0,2	1,82±0,01	3,4±0,1	3,7±0,1	-	2,1±0,2	3,2±0,3	289±29
SrMgF-ACP[2]	25,3 ±0,3	13,2 ±0,2	1,86±0,03	4,1±0,1	3,1±0,1	3,6±0,1	2,4±0,2	3,5±0,3	273±27
SrF-ACP[1]	30,0±0,9	13,4±0,4	1,83±0,01	2,2±0,1	-	3,6±0,1	2,2±0,2	3,3±0,3	352±35
MgF-ACP[1]	26,7±0,1	14,2±0,1	1,80±0,01	3,7±0,1	3,8±0,1	-	2,3±0,2	3,6±0,3	304±30
SrMgF-ACP[1]	24,8±0,2	13,7±0,1	1,81±0,01	3,7±0,1	3,6±0,1	3,1±0,2	1,9±0,2	3,4±0,3	318±32

(a) Cuantificat prin ICP-OES;
(b) Cuantificat prin electrodul cu ioni de fluorură;
(c) Cuantificat prin TGA;
(d) Calculat din adsorbţia BET.

SSA_{BET} a fost determinat de asemenea pentru proba din stadiul tehnicii așa cum a fost preparată în exemplul 1.

Următoarele valori au fost obținute:

ACP^4	$200\pm20\ m^2g^{-1}$
$F\text{-}ACP^4$	$213\pm21\ m^2g^{-1}$

Valoarea SSA_{BET} a rezultat a fi o caracteristică ce diferențiază ACP și F-ACP obținuți prin procesul din stadiul tehnicii și prin procesul din invenție.

Curba de TGA a probelor în conformitate cu invenția prezintă patru pierderi de greutate, care pot fi atribuite apei adsorbite (de la temperatura camerei la 150 °C), apei structurale (de la 150 la 350 °C), citratului (de la 350 la 700 °C) și carbonatului (de la 700 la 1000 °C). În conformitate cu aceste pierderi, conținutul de citrat și carbonat au fost estimate și raportate în tabelul 2.

Raportul calciu/fosfat al ACP^2 a fost similar cu cel al ACP^1, în timp ce $F\text{-}ACP^2$ și $F\text{-}ACP^1$ au prezentat conținut de calciu mai mare și raport Ca/P mai mare decât contrapărțile nedopate ale acestora. Raportul calciu/fosfat al $F\text{-}ACP^2$ a fost similar cu cel al $F\text{-}ACP^1$.

Raportul calciu+stronțiu+magneziu/fosfat al $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ a fost similar cu valoarea calculată pentru probele de $F\text{-}ACP^2$ și $F\text{-}ACP^1$. Conținutul de citrat și carbonat nu s-a schimbat între aceste probe dopate cu Sr și Mg și a fost similar cu valoarea calculată pentru probele de $F\text{-}ACP^2$ și $F\text{-}ACP^1$. Interesant, s-a descoperit că atunci când Mg, singur sau în combinație cu Sr, este inclus în preparat, cantitatea de fluor a crescut.

Fără a fi legați de nici o teorie, inventatorii consideră că ariile suprafețelor mai mari au fost datorate procesului din invenția, care a furnizat un raport molar dintre ionul citrat și ionul de calciu în intervalul de la 1 la 2.

Datele de mai sus demonstrează că particulele acoperite cu citrat și particulele acoperite cu citrat și dopate cu fluor obținute prin procesul din invenție sunt diferite, și astfel noi, față de particulele acoperite cu citrat și dopate cu fluor din WO2016/012452.

Exemplul 7: Eliberarea de ioni în saliva artificială a probelor preparate în Exemplul 1 și în Exemplul 2

Aplicarea ACP în produsele de tratament pentru dinți se bazează pe principiul eliberării ionilor de calciu și fosfat, pentru a genera o suprasaturare locală, pentru declanșarea remineralizării emailului. De aceea, acest efect a fost testat *in vitro*. Eliberarea de ioni *in vitro* în salivă artificială acidă (o soluție care mimează saliva umană după masă, fără componentele macromoleculare ale acesteia) a fost testat.

200 mg de pulberi de ACP sau F-ACP preparate în exemplele 1 și 2, au fost dispersate în 10 ml de salivă artificială preparată ca soluție Tani-Zucchi modificată, conținând KCl 20 mM, KSCN 5,3 mM, Na_2HPO_4 1.4 mM, $NaHCO_3$ 15 mM, și acid lactic 10 mM. Suspensia a fost menținută la 37 °C sub agitare. La momente de timp programate, 8 ml de supernatant (care a fost bine separat din faza solidă prin centrifugarea la 5000 rpm timp de 15 min) au fost îndepărtați pentru cuantificarea Ca^{2+} și F^- prin ICP-OES și electrod cu ioni de fluorură, în mod corespunzător. După aceea, probele au fost clătite cu 8 ml de salivă artificială proaspătă, și suspensia a fost menținută la 37 °C sub agitare, și tratată așa cum a fost descris anterior la momentul de timp următor.

Toate probele din exemplele 1 și 2 au prezentat o eliberare susținută a ionilor de Ca^{2+} și F^- în primele două ore (Fig. 4). Probele cu un raport Cit/Ca în conformitate cu invenția au prezentat, în mod surprinzător, viteze mai mari de eliberare a ionilor, revelându-se astfel ca produs îmbunătățit și avantajos în raport cu stadiul tehnicii.

Fără a fi legați de nici o teorie, inventatorii consideră că acest efect surprinzător a fost datorat probabil caracteristicilor deosebite ale particulelor din invenție, care au avut arii ale suprafeței mai mari, datorită raportului molar specific utilizat în procesul de producere a nanoparticulelor.

Exemplul 7bis

Eliberarea ionilor *in vitro* în salivă artificială acidă a $SrF\text{-}ACP^2$, $MgF\text{-}ACP^2$, $SrMgF\text{-}ACP^2$, $SrF\text{-}ACP^1$, $MgF\text{-}ACP^1$, $SrMgF\text{-}ACP^1$ preparați în conformitate cu exemplul 2bis, a fost testată în aceleași condiții ca cele din exemplul 7.

Toate probele din exemplul 2bis, similare cu cele din exemplele 1 și 2, prezintă o eliberare susținută a ionilor de Ca^{2+} și F^- în primele două ore (Fig. 10A și 10B). Probele din exemplul 2bis în conformitate cu invenția au prezentat viteze de eliberare a ionilor comparabile cu cele ale probelor din exemplul 2, revelându-se astfel ca produs îmbunătățit și avantajos în raport cu stadiul tehnicii.

Exemplul 8: Prepararea nanoparticulelor din invenție aglomerate în microparticule (aglomeratul de nanoparticule din invenție)

Pentru a evalua fezabilitatea probelor uscate din exemplul 2 cu un uscător prin pulverizare fără a le afecta caracteristica amorfă, ACP^2, ACP^1, $F\text{-}ACP^2$ și $F\text{-}ACP^1$ după spălări, și așa cum au fost obținute

în Exemplul 2, au fost resuspendaţi în apă la 3,5 % de gr./v, şi uscate prin uscare prin pulverizare (Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) în următoarele condiţii: diametrul duzei 0,7 mm, viteza de alimentare 3 ml/min, debitul argonului 450 l h^{-1}, temperatura de admisie 120 °C şi viteza aspiratorului 70%. Spectrul de XRD al pulberii de F-ACP^1 uscate prin pulverizare (Fig. 5) a prezentat o bandă lată la aproximativ 30° (2θ), coroborând faptul că faza amorfă este păstrată. Micrografiile de SEM ale pulberii de F-ACP^1 uscate prin pulverizare (Fig. 6), au relevat că proba constă din particule sferice cu diametru de aproximativ 2-25 μm care, la rândul lor, sunt compuse din nanoparticule independent de raportul Cit/Ca şi prezenţa fluorurii. Valoarea lui SSA_{BET} a pulberii uscate a fost în intervalul de 3-10 m^2 g^{-1} independent de raportul Cit/Ca şi prezenţa fluorurii.

Exemplul 9: Stabilitatea pulberii uscate a probelor preparate în exemplul 2

ACP este mai instabil decât polimorfii cristalini ai CaP, aşa că se transformă în faza cristalină chiar şi în stare uscată, reacţionând cu apa din atmosferă. De aceea, utilizarea şi manipularea acestuia sunt dificile, dacă nu este dezvoltat un material stabil. Stabilitatea pulberilor de ACP^2, ACP^1, F-ACP^2 şi F-ACP^1 depozitate la temperatura camerei a fost evaluată analizând structura acestuia, prin colectarea XRD un timp de până la un an (Fig. 7). Interesant, spectrul de XRD a rămas neschimbat, stabilind că natura amorfă a tuturor probelor se păstrează în timpul acestei perioade de timp.

(56) Referinţe bibliografice citate în raportul de documentare:

- DATABASE WPI Week 201457 Thomson Scientific, London, GB; AN 2014-Q60018 XP002789652, & CN 103 876 945 A (UNIV XIAMEN) 25 June 2014 (2014-06-25)
- WO-A1-2016/012452
- WO-A1-2017/025359
- US-A1- 2006 110 306

(57) Revendicări:

1. Proces pentru prepararea unei nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat care cuprinde următoarele etape:

1) furnizarea unei prime soluţii de sare de calciu şi de sare de citrat, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu se află în intervalul de la 1 la 2 obţinând astfel o primă soluţie transparentă;

2) furnizarea unei a doua soluţii de sare capabile de a dona anion fosfat şi o sare carbonat;

3) amestecarea împreună a primei soluţii transparente cu cea de-a doua soluţie la un pH în intervalul de la 8 la 11;

4) precipitarea nanoparticulei; şi

5) uscarea nanoparticulei obţinute în etapa 4).

2. Procesul în conformitate cu revendicarea 1, în care sarea de calciu este fabricată dintr-un anion selectat din grupul constând din clorură, nitrat, hidroxid, acetat, oxalat, lactat, de preferinţă, anionul este clorură.

3. Procesul în conformitate cu revendicarea 1 sau revendicarea 2, în care sarea de citrat este fabricată dintr-un cation selectat din grupul constând din sodiu şi potasiu, de preferinţă, cationul este sodiu.

4. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-3, în care raportul molar dintre ionul citrat şi ionul de calciu este aproximativ 2.

5. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-4, în care prima soluţie din etapa 1) cuprinde cel puţin o sare suplimentară selectată din grupul constând din: o sare de stronţiu, şi o sare de magneziu.

6. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-5, în care sarea capabilă de a dona anion fosfat este o sare de fosfat, hidrogen fosfat sau hidrogen fosfat, de preferinţă, fabricată

dintr-un cation selectat din grupul constând din sodiu, potasiu şi amoniu.

7. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6, în care pH-ul din etapa 3) se află în intervalul de la 8,5-10,7.

8. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-7, în care în etapa de amestecare 3) a doua soluţie se adaugă la prima soluţie transparentă.

9. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-8, în care în etapa 4) precipitarea este executată prin furnizarea de cicluri de sedimentare prin îndepărtarea prin centrifugare a supernatantului, colectarea şi spălarea precipitatului.

10. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-9, în care etapa de uscare 5) este selectată dintre uscare prin îngheţare, uscare prin pulverizare şi uscare în cuptor ventilat.

11. Procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-10, în care în etapa 1) se adaugă un compus de fluorură.

12. Procesul în conformitate cu revendicarea 11, în care compusul de fluorură este o fluorură a unui cation selectat din grupul constând din sodiu şi potasiu.

13. Nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat, care poate fi obţinută prin procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-10, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare, nanoparticula menţionată fiind **caracterizată printr-o** arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 360 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

14. Aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat, care poate fi obţinut prin procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-10, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menţionat fiind **caracterizat printr-o** arie superficială de la 2 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă, cu un diametru în intervalul de la 2 la 25 μm, după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

15. Nanoparticulă de fosfat de calciu amorf acoperită cu citrat dopată cu fluor, care poate fi obţinută prin procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin îngheţare, nanoparticula menţionată fiind **caracterizată printr-o** arie superficială de la 250 m^2g^{-1} la 370 m^2g^{-1} după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă cu un diametru în intervalul de la 30 la 80 nm după cum a fost măsurat prin imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM).

16. Aglomerat de nanoparticule de fosfat de calciu amorf acoperite cu citrat dopate cu fluor care poate fi obţinut prin procesul în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12, în care etapa de uscare 5) este o etapă de uscare prin pulverizare, aglomeratul de nanoparticule menţionat fiind **caracterizat printr-o** arie superficială de la 3 m^2g^{-1} la 10 m^2g^{-1} - după cum a fost măsurat prin metoda de adsorbţie a gazului Brunauer-Emmett-Teller (BET), şi având o morfologie de formă rotundă cu un diametru în intervalul de la 2 la 25 μm după cum a fost măsurat prin microscopie electronică de scanare (SEM).

17. Nanoparticulă sau aglomerat de nanoparticule în conformitate cu oricare dintre revendicările 13-16, ca biomaterial pentru utilizare în aplicaţii stomatologice.

18. Nanoparticula ca biomaterial pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 17, în care biomaterialul este utilizat ca agent de remineralizare sau ca desensibilizator al dentinei.

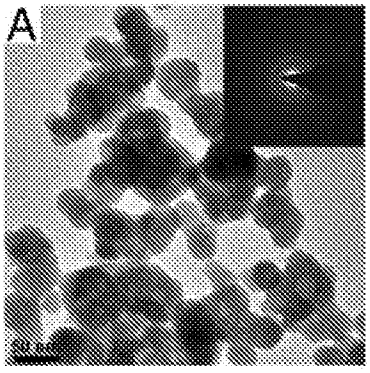


Figura 1A

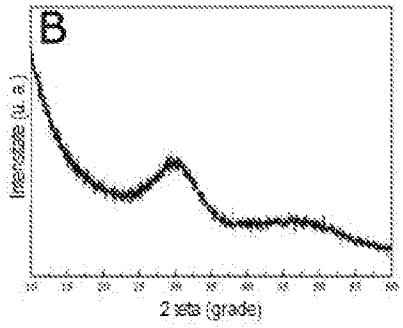


Figura 1B

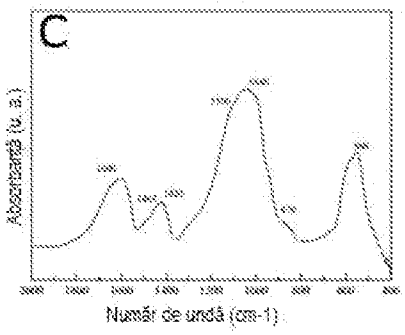


Figura 1C

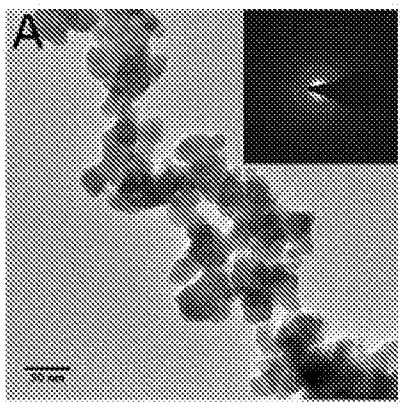


Figura 2A

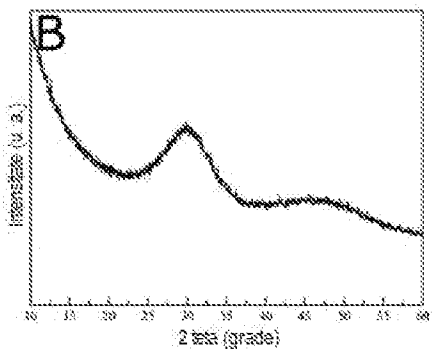


Figura 2B

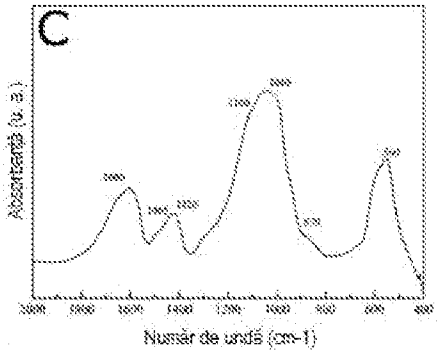


Figura 2C

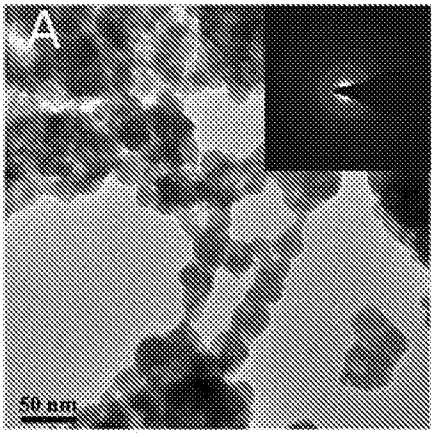


Figura 3A

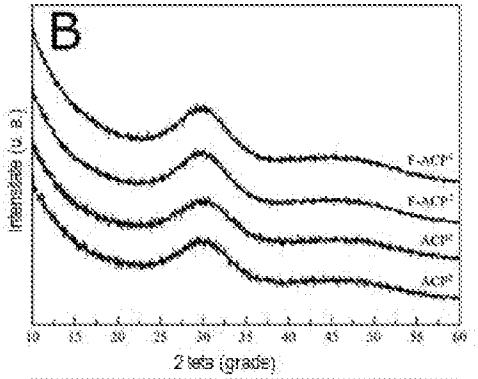


Figura 3B

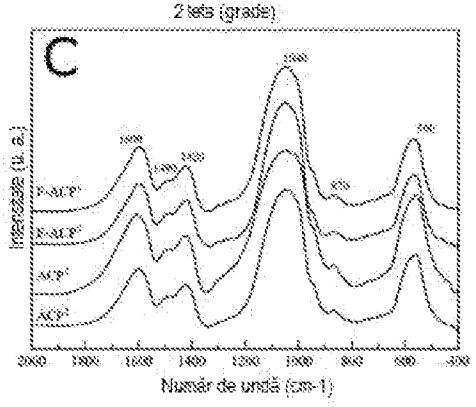


Figura 3C

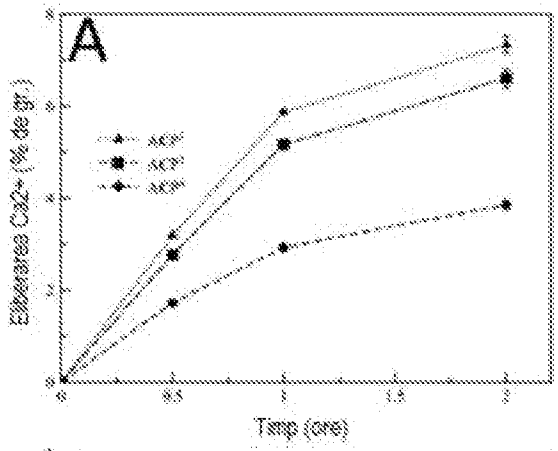


Figura 4A

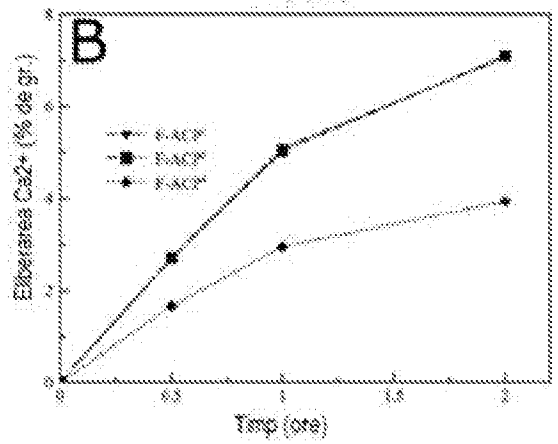


Figura 4B

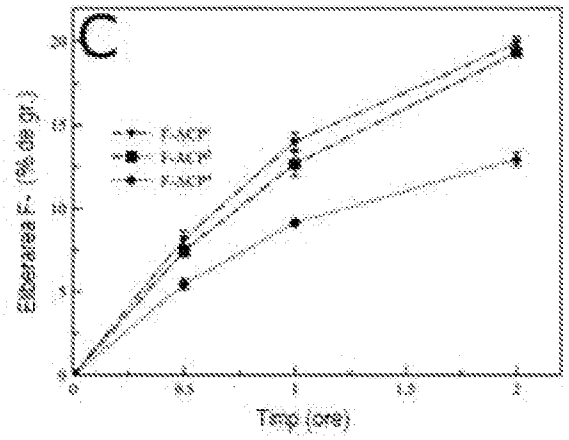


Figura 4C

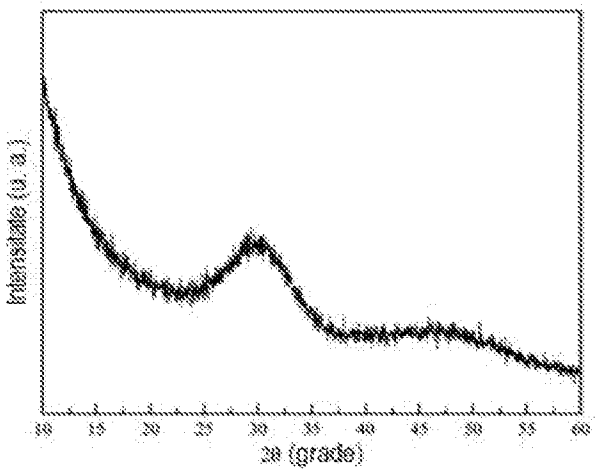


Figura 5

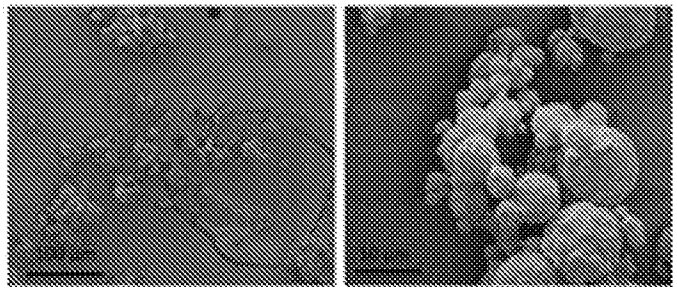


Figura 6

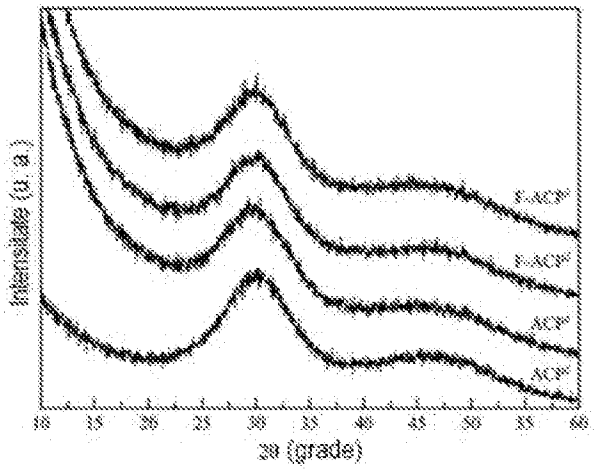


Figura 7

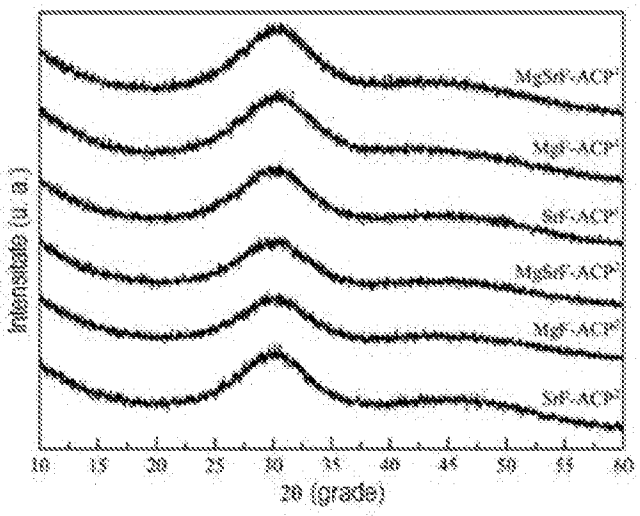


Figura 8

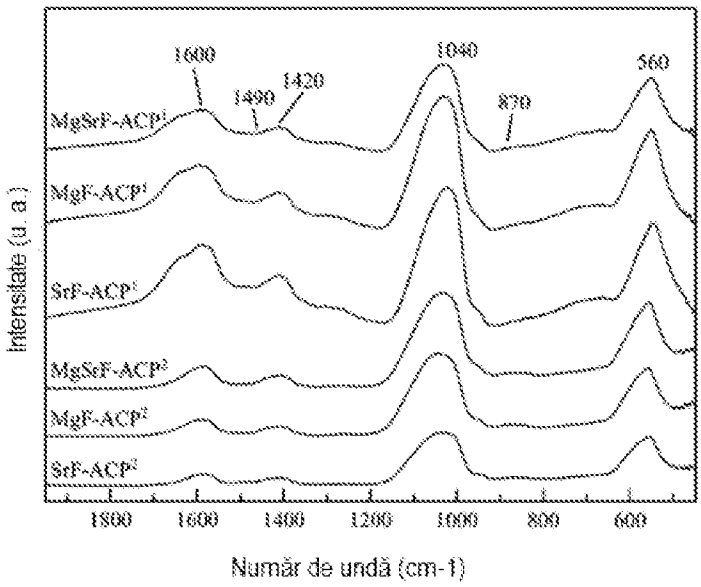

1600
1490
1420
1040
870
560
MgSrF-ACP1
MgF-ACP1
SrF-ACP1
MgSrF-ACP2
MgF-ACP2
SrF-ACP2
Intensitate (u. a.)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
Număr de undă (cm-1)

Figura 9

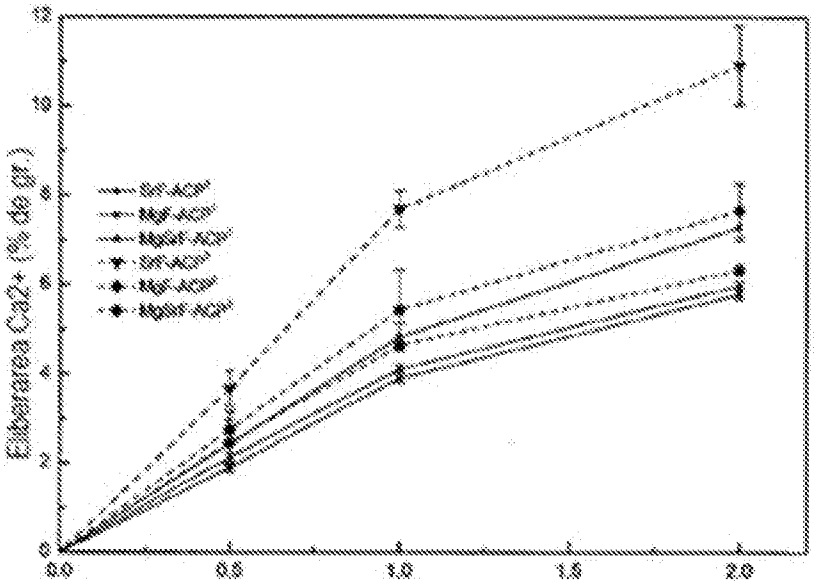


Figura 10A

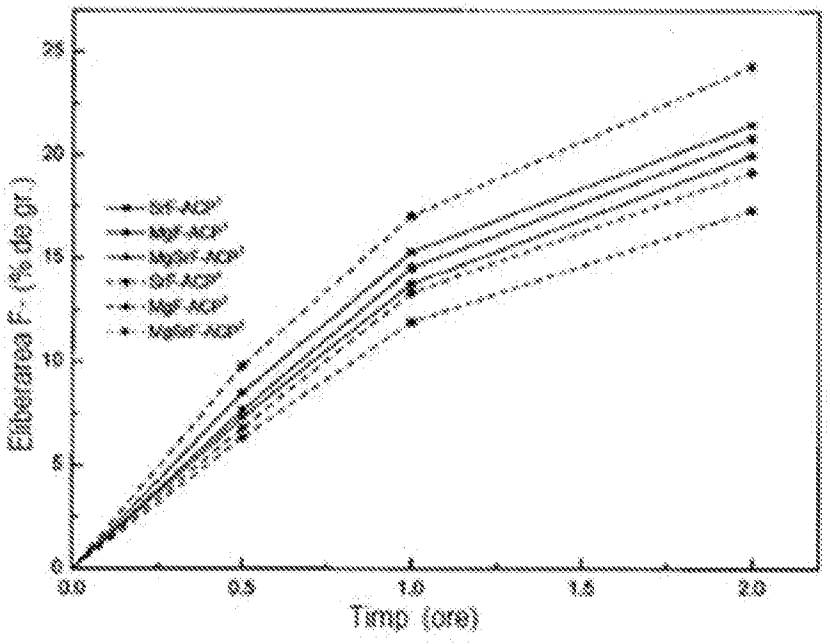


Figura 10B