

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 637**

51 Int. Cl.:

C30B 29/14 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61K 6/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2013 E 13380041 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2853622**

54 Título: **Método de obtención de nanocristales de fluorapatita facetados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo, Pontevedra, ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, PÍO MANUEL;
SERRA RODRÍGUEZ, JULIA;
LÓPEZ ÁLVAREZ, MIRIAM;
RODRÍGUEZ VALENCIA, COSME;
BALBOA FRANCO, MARÍA ESTELA y
CHIUSSI, STEFANO**

ES 2 565 637 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de nanocristales de fluorapatita facetados.

5 Sector de la técnica

La invención da a conocer la obtención de nanocristales de fluorapatita (FA) a partir de secciones de pseudoesmalte de dientes de tiburón para su aplicación como material de relleno óseo en cirugía ortopédica, la regeneración del esmalte y otros tratamientos dentales y maxilofaciales en el campo médico.

Antecedentes

La hidroxiapatita (HA) es un mineral de apatita que corresponde a un fosfato de calcio de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Es esencialmente un fosfato de calcio con una razón Ca:P media de 1,67:1, que contiene grupos hidroxilo. La estructura cristaliza en el sistema monoclinico o hexagonal. Los materiales apatíticos en la forma de HA son muy solicitados en ingeniería de tejido óseo para reparar, reemplazar o regenerar defectos en los huesos o dientes humanos ya que muestra una composición similar a la parte mineral del hueso humano.

La HA que constituye el compuesto principal de la parte inorgánica de los huesos presenta una estructura cristalina específica que difiere de las apatitas sintéticas tanto en la morfología, tamaño como orientación de los cristales que la forman. Estas apatitas biológicas derivadas de hueso presentan una baja cristalinidad, la cual permite ciclos continuos de disolución y cristalización para una regeneración ósea constante.

Los dientes representan el tejido más altamente mineralizado y duro en los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Sus extraordinarias propiedades mecánicas se deben también a una específica disposición jerárquica de los cristales de hidroxiapatita carbonatada (bioapatita) deficiente en calcio. La parte exterior y compacta de los dientes humanos esta formada por el esmalte, que consta de barras de apatita de tamaño micrométrico en una disposición específica con un contenido de matriz orgánica de aproximadamente un 1% en peso.

La fluorapatita (FA), de fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, presenta una mayor rigidez, mayor módulo elástico y mayor dureza que la HA. La incorporación de fluoruro promueve la cristalización del fosfato de calcio, mejorando la estabilidad térmica y reduciendo la disolución del mineral. La FA de los dientes de tiburón presenta la particularidad de incorporar flúor en la red del modo más alto y eficiente comparado con cualquier otra fuente biológica, incluyendo los dientes de bovino o humano.

El espectro infrarrojo (IR) del pseudoesmalte de tiburón se reconoce especialmente por la presencia de las bandas del hidróxido y del carbonato. Tanto el pseudoesmalte de tiburón como la geo-apatita son ricos en flúor, mostrando esta última la mayor concentración de fluoruro. Hay, sin embargo, indicios de que la concentración de hidróxido también es mayor en la geo-apatita que en el pseudoesmalte de tiburón, lo que es poco probable. Esto puede explicarse por el mayor contenido de carbonato y, en parte, también por la mayor cantidad de agua en el pseudoesmalte de tiburón.

La obtención sintética de recubrimientos densos y bien adheridos de flúor-hidroxiapatita, con la cantidad de flúor variable $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2-x\text{Fx}$ (FHA), se llevaron a cabo sobre titanio puro comercial mediante depósito con aerosol usando polvos de FHA, con la intención de investigar el efecto del contenido de flúor en las propiedades de la solución salina y como este flúor puede afectar a la diferenciación celular (Hahn BD *et al*, "Effect of fluorine addition on the biological performance of hydroxyapatite coatings on Ti by aerosol deposition", *Journal of Biomaterials Applications*, 2011, 27(5), 587-594). Los iones de flúor fueron incorporados con éxito en la red de HA, tanto en forma de polvos de FHA como en recubrimientos de FHA, reemplazando los grupos hidroxilo de acuerdo con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2-x\text{Fx}$ ($x = 0.5, 1.0$ o 1.5), y posteriormente fueron testados con osteoblastos. Se comprobó un estímulo positivo de los osteoblastos. Es importante resaltar que el recubrimiento obtenido está compuesto por HA dopada con flúor y no por fluorapatita. Los autores no plantean ninguna sugerencia sobre la obtención de nanoestructuras de fluorapatita.

Recientemente se ha publicado la fabricación de fluorapatita nanocrystalina con sustituciones de Mg para mejorar la pobre termoestabilidad y propiedades mecánicas de la hidroxiapatita sintética, reemplazándola por fluorapatita (Kheradmandfard M, Fathi MH. "Fabrication and characterization of nanocrystalline Mg-substituted fluorapatite by high energy ball milling", *Ceramics International*, 2013, 39, 1651-1658). La sustitución con flúor puede favorecer la cristalización del fosfato cálcico, mejorando la estabilidad térmica y reduciendo la disolución del mineral. Sin embargo, las zonas cristalinas crecen formando agregados:

"La morfología de los polvos indica que cada uno de ellos está compuesto por aglomerados con forma y distribución de dimensiones irregulares".

Estos agregados, típicos de la síntesis química, presentan un peor comportamiento como material biocompatible en comparación con apatitas cristalinas naturales.

La fluorapatita también se ha obtenido de espinas de bacalao usando soluciones de CaCl_2 y NaF (Piccirillo C *et al*, "Extraction and characterisation of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones". *Materials Science and Engineering*, 2013, C33, 103-110). Sin embargo, el tratamiento de las espinas en solución, previo a su recocido, modifica la composición del material.

Los iones de flúor pueden reducir la formación de caries dental en un ambiente contaminado por bacterias y mejorar la formación de hueso mediante la estimulación de la actividad osteoblástica. Estas propiedades son de gran interés en ingeniarla de tejidos dental y máxilofacial.

Chen se planteó replicar la habilidad anticaries natural de los dientes mediante el desarrollo de nuevos materiales eficientes contra las caries usando nanovarillas o nanohilos de fluorapatita (Chen H *et al*, "Synthesis of fluorapatite nanorods and nanowires by direct precipitation from solution", *Crystal Growth & Design*, 2006, 6(6), 1504-1508). Esta publicación desvela las condiciones necesarias para sintetizar nanovarillas de fluorapatita de distinto tamaño, forma y composición para obtener un conglomerado cristalino capaz de incorporarse en los materiales dentales. De nuevo, todas estas nanoestructuras sintéticas son obtenidas en forma de agregados, de los cuales no es posible obtener nanocristales aislados y facetados como en la presente invención.

El pseudoesmalte de diente de tiburón esta construido por dos tipos de cristales de apatite de diferentes tamaños y formas (Kallaste T. Nemliher J. "Apatite varieties in extant and fossil vertebrate mineralized tissues", Journal of Applied Crystallography, 2005, 38, 587-594). Los cristales mas grandes representan hasta el 15% del total con un tamaño de 500 a 1000 Å^o aprox., mientras que los mas pequeños son de 400 a 500 Å^o. Sin embargo, estas estructuras no están aisladas en monocristales individuales sino organizadas en macroestructuras y apilamientos que contienen FA cristalina. La presencia de nanocristales facetados de FA en el pseudoesmalte de tiburón ha resultado ser del todo sorprendente.

El problema de la técnica es pues la obtención de nanocristales de fluorapatita aislados y facetados ya sea de una fuente natural o de origen sintético. La solución propuesta por la presente invención es aislar los nanocristales de dientes de tiburón.

Descripción de la Invención

La invención da a conocer el hallazgo de una nueva fuente de nanocristales de fluorapatita obtenidos del pseudoesmalte de dientes de tiburón. Esta fuente presenta las ventajas de su origen biológico y la importante incorporación de flúor en la estructura del pseudoesmalte en forma de fluorapatita como una fase biomineral con sustitución parcial de fosfato y carbonato por lones fluoruro. La enorme cantidad de material disponible debido a la liberación continua de dientes de tiburones al fondo del mar para su renovación hace que sea una fuente abundante, barata y totalmente asegurada durante todo el año. Por lo tanto, se puede implementar fácilmente a escala industrial.

La microestructura de esta fuente biológica esta compuesta en el interior del diente por la dentina, una fase de hueso con nanocristales de apatita incrustadas en una matriz orgánica de colágeno que ronda el 29% en peso, con una estructura porosa con tubos de dentina de tamaño micrométrico. Dentro del esmalte han sido reportados en la técnica algunas estructuras estratificadas de HA con un cierto contenido de flúor, aunque no nanocristales facetados de FA. Conforme a los mamíferos, los elementos estructurales de los dientes del tiburón se producen de una manera altamente jerarquizada. El pseudoesmalte duro y altamente mineralizado esta en la capa externa de los dientes.

Por lo tanto, la presente invención es un método de obtención de nanocristales de fluorapatita facetados, el método comprende el aislamiento del pseudoesmalte de dientes de tiburón, la pirólisis de dicho pseudoesmalte a una temperatura de entre 1000-1200°C, la molienda mecánica del material obtenido y la separación final de los nanocristales.

Un beneficio de la FA es su mayor estabilidad en comparación con la hidroxiapatita pura, siendo menos soluble que el segundo y apto para ser utilizado en un entamo biológico para ciertas aplicaciones que requieren estabilidad a largo plazo.

La incorporación de fluoruros en la red de apatita promueve la cristalización del fosfato de calcio, mejora la estabilidad térmica en un entorno biológico y reduce la disolución del mineral. La fluorapatita presenta la capacidad de formar una solución sólida de HA fluorada con sustituciones parciales de OH-por F-. Esto es de Interés ya que la sustitución de F-provoca una reducción en el volumen de la celda unidad del cristal dando estabilidad química a la red de apatita, mejorada por los enlaces electroestáticos fuertes entre iones adyacentes y el fluoruro. Todo esto representa ventajas tecnológicas como material de relleno óseo sobre la HA y otros materiales utilizados en la técnica.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Espectroscopia de Rayos X (EDS) de nanocristales de fluorapatita obtenidos de pseudoesmalte de diente de tiburón.

Figura 2: FT-RAMAN de nanocristales de fluorapatita obtenidos de pseudoesmalte de diente de tiburón.

Figura 3: Espectros de difracción de Rayos X (XRD) de nanocristales de fluorapatita obtenidos de pseudoesmalte de diente de tiburón.

Descripción detallada de casos prácticos

Los siguientes ejemplos son mostrados con el objetivo de demostrar e ilustrar ciertos casos y aspectos de la presente invención, aunque no se considera limitado a esta visión.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de nanocristales a partir de pseudoesmalte de diente de tiburón.

Un espécimen de diente de tiburón de la especie *Isurus oxyrinchus* se calentó a 50°C durante 15 minutos, y luego se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 segundos. Utilizando un taladro fino y una herramienta de pulido se procedió a desgastar la parte posterior y los lados afilados de los dientes hasta que la dentina quedo a la vista Posteriormente y aplicando un golpe en las ranuras laterales del diente se consiguió separar el pseudoesmalte de la dentina. El pseudoesmalte obtenido se sometió a una pirólisis a 1000°C durante 12 horas, con una rampa de calentamiento de 2°C/min y una rampa de enfriamiento final de 20°C/min; este proceso elimina la materia orgánica restante. La pieza resultante de color blanco se somete a un molino de bolas (Retsch MM2000) durante 5 minutos para obtener un polvo de fluorapatita con cristales de 35-80 nm en una dimensión por 50 a 700 nm en las otras dimensiones. La obtención final de los diferentes tamaños se consiguió por centrifugación.

Ejemplo 2: Caracterización del cristal.

La composición de los nanocristales obtenidos del pseudoesmalte de los dientes de tiburón se analizo mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES; Perkin Elmer Optima 4300 DV) y la cromatografía iónica (Metrohm 733), estando compuesto principalmente por calcio, fósforo y flúor. El magnesio y el potasio también se detectaron, pero en concentraciones traza. Los resultados se dan con respecto a la composición de peso total, el resto del porcentaje hasta el total corresponde a la matriz orgánica del pseudoesmalte.

Composición de los cristales (%)	Ca	P	F-
	33.3	16.4	2.26

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de nanocristales de fluorapatita facetados, que comprende el aislamiento del pseudoesmalte de dientes de tiburón, la pirólisis de dicho pseudoesmalte a una temperatura de entre 1000-1200°C, la molienda mecánica del material obtenido y la separación final de dichos nanocristales.
- 5

Figura 1

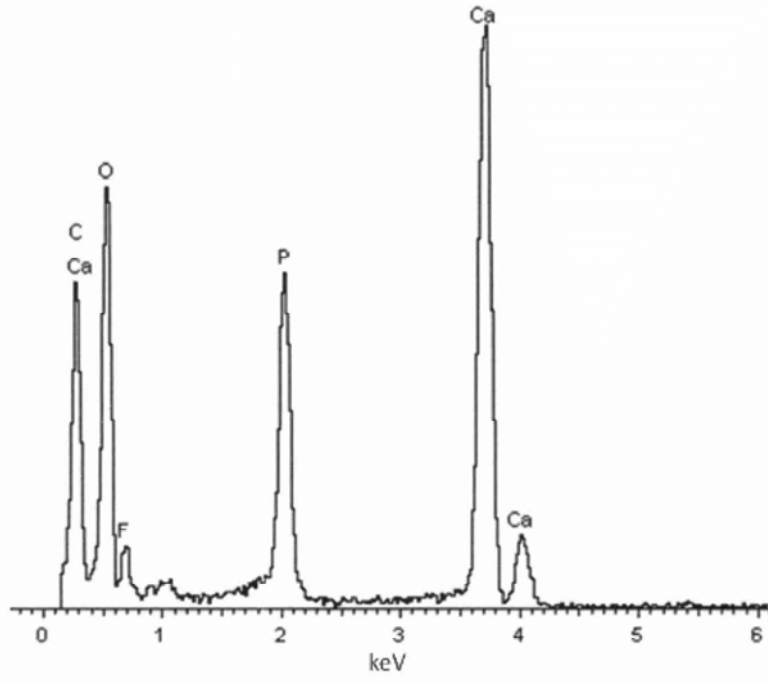


Figura 2

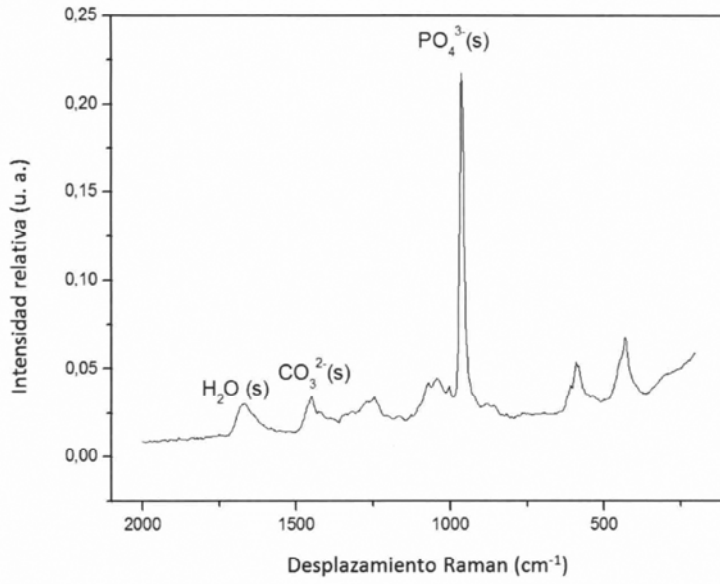


Figura 3

