



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024013630-6 A2

(22) Data do Depósito: 02/07/2024

(43) Data da Publicação Nacional:
13/01/2026

(54) Título: HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HPS) E MÉTODO DE SÍNTESE COM CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS QUE MIMETIZAM A POROSIDADE ÓSSEA PARA USO COMO ENXERTO ÓSSEO

(51) Int. Cl.: C01B 25/32; A61L 27/12.

(52) CPC: C01B 25/325; C01B 25/32; A61L 27/12.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; ASSOCIAÇÃO SÃO BENTO DE ENSINO.

(72) Inventor(es): LEANDRO FERNANDES; ANA PAULA BOSCO GOMES; CRISTIANO SILVA PONTES; ELIANE TROVATTI; LUIS GERALDO VAZ; RAFAEL SALOMÃO.

(57) Resumo: HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HPS) E MÉTODO DE SÍNTESE COM CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS QUE MIMETIZAM A POROSIDADE ÓSSEA PARA USO COMO ENXERTO ÓSSEO. O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Saúde Humana, descreve a síntese para obtenção do biomaterial denominado hidroxiapatita sintética porosa (HPS) com elevada área superficial específica, elevada pureza (acima de 99%), baixa cristalinidade e elevada porosidade total para ser usado como enxerto ósseo, uma vez que o osso humano ou animal apresenta baixa cristalinidade. Os enxertos ósseos são materiais amplamente utilizados nas áreas de Ortopedia, cirurgia buco-maxilar e Odontologia. A vantagem do processo desenvolvido é a obtenção de elevada porosidade total e elevada área superficial específica, além de não gerar resíduos orgânicos como no processo de extração do enxerto ósseo via osso bovino, o material formado apresenta elevada pureza (>99%) uma vez que é sintetizado usando reagentes analíticos e apresenta baixo custo de obtenção.

Amostra	D_{50} (mm) ^(a)	D_{10} (mm) ^(b)	D_{90} (mm) ^(c)	D_{10} até D_{90} (mm) ^(d)	$(D_{90} - D_{10})/(D_{50})$
H120-3H	5,9	155	531	5,90 - 531	3,38
H300-3H	8,4	211	509	8,44 - 509	2,37
H700-3H	4,1	72	513	4,13 - 513	3,26
Bio-Oss® ^(e)	510	740	1030	510 - 1030	0,70

HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HPS) E MÉTODO DE SÍNTESE COM CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS QUE MIMETIZAM A POROSIDADE ÓSSEA PARA USO COMO ENXERTO ÓSSEO

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente refere-se a um processo de síntese de hidroxiapatita sintética porosa (HPS) e obtenção de biomaterial com elevada área superficial específica, elevada pureza (acima de 99%), baixa cristalinidade e elevada porosidade total.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O campo de aplicação está relacionado com a Saúde Humana, mais especificamente para utilização como enxerto ósseo em áreas da Odontologia como implantodontia, cirurgia bucomaxilofacial, em estética para estimulação para a produção de colágeno e em cirurgia de Ortopedia para o preenchimento de regiões afetadas, bem como a ligação via blocos de hidroxiapatita com resistência mecânica adequada e com microestrutura do tipo “coral-like” para permeação de células ósseas para crescimento e proliferação.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O enxerto autógeno que é o do próprio paciente é o melhor material devido à capacidade de ser osteoindutor pela presença de sangue, células, fatores de crescimento e proteínas que estimulam e facilitam a cicatrização [Laurencin CT, Khan Y, Veronick J. *Bone Graft Substitutes: Past, Present, and Future. In: Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering, 2nd Edition. 2014*], uma desvantagem é a pequena quantidade que pode ser retirada e a necessidade de uma segunda cirurgia aumentando o tempo cirúrgico, causando prejuízo ao paciente [(Galia CR, Macedo CA de S, Rosito R, Mello TM de, Diesel C, Moreira LF. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. *Rev Col Bras Cir.* 2009;36(2):157–60)].

[004] Devido às dificuldades para a utilização do enxerto autógeno, existem alternativas como os enxertos de origem animal (bovino e suíno), tendo como

expoente dessa tecnologia o Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG), sendo proveniente de osso bovino, tratado com agente oxidante de hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além de tratamento térmico em 300 °C para a completa remoção da matéria orgânica composta por colágeno, contudo, mesmo após este tratamento sobram cerca de 1180-1200 ppm (partes por milhão, onde 620 ppm são proteínas, 500 ppm são colágeno e 60 ppm), sendo este um método agressivo para remoção de matéria orgânica com geração de resíduo e com presença de resíduos orgânicos no enxerto (Lee SH, Pai Y, Park K, Kyu D. *Process for extracting natural hydroxyapatite granules from bovine bone*. US 2015/0098875 A1, 2015. p. 1–9).

[005] A hidroxiapatita extraída dos ossos bovinos, suínos, recebe tratamento para a sua purificação onde são empregados fortes agentes oxidantes como o hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, gerando efluentes tóxicos. A rota de produção sintética de hidroxiapatita apresenta menor geração de resíduos, uma vez que a quantidade estequiométrica dos componentes é submetida a reação do estado sólido onde os precursores (sais de cálcio e fosfato) são misturados, secos e tratados termicamente em 1000°C, obtendo uma única fase com elevada cristalinidade (Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta Biomater. 2013;9:7591–621) (Pramanik S, Agarwal AK, Rai KN, Garg A. *Development of high strength hydroxyapatite by solid-statesintering process*. Ceram Int. 2007;33:419–26).

[006] Diversas são as características Físico-Químicas presentes em um enxerto ósseo, dentre elas o tamanho médio das partículas (D₅₀) com valores entre 367-980 µm, área superficial específica que pode ser importante para adesão e crescimento celular. O material Bio-Oss® apresenta valor em torno de 59,7 m².g⁻¹, além de elevada porosidade total (63,5%) o que pode favorecer a angiogênese, proliferação osteoblástica e geração de osso novo e a sua cristalinidade não compromete a sua eficácia em uso clínico conforme indicado por Figueiredo [Figueiredo M, Henriques

J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. *Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes - Comparison with human bone*. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2010;92B:409–19.] e Bouyne [Boyne PJ. *Osseous Reconstruction of the Maxilla and the Mandible: Surgical Techniques Using Titanium Mesh and Bone Mineral*. Implant Dent. 1998;]. A morfologia do Bio-Oss® é semelhante ao osso esponjoso humano o que favorece a osteocondução devido ao grande tamanho dos poros dos grânulos [Abbas A. *Is Bio-Oss an Osteoconductive Material When Used as an Onlay Graft in Combination with a Resorbable Membrane? A Prospective Experiment in a Rabbit Model*. ProQuest Diss Theses. 2011].

[007] A literatura científica relata diversas características Físico-Químicas do padrão ouro usado como enxerto ósseo (Bio-Oss® da fabricante Geistlich). A primeira a ser mencionada é a porosidade total ao redor de 63,5% e área superficial específica $59,7 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, essa elevada área é devido a parte esponjosa do osso de origem bovina utilizada, e apresenta aspecto de grânulos sendo produzido pelo tratamento com solução alcalina e solventes orgânicos e tratamento térmico em 300°C . Os agravantes desse processo é a possibilidade de não retirar totalmente a parte orgânica do osso bovino e posteriormente o efluente gerado no processo, agressivo ao meio ambiente.

[008] Rotas sintéticas foram desenvolvidas para obter hidroxiapatita porosa [Mour M, Das D, Winkler T, Hoenig E, Mielke G, Morlock MM, et al. *Advances in porous biomaterials for dental and orthopaedic applications*. Materials (Basel). 2010;3:2947–74.], onde utilizou-se esponjas poliméricas de poliuretano que após tratamento térmico passam para a forma de vapor e geram poros na matriz de hidroxiapatita. Trabalhos semelhantes chegam a indicar a formação entre 40 até 95% de porosidade e poros interconectados com 200 microns até 3 mm [Studart R, Gonzenbach UT, Tervoort E, Gauckler LJ. *Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review*. 2006;1789.], o inconveniente desse processo é a geração de gases tóxicos no momento do tratamento térmico. Outro método sintético, utiliza

carbonato de cálcio para a formação de hidroxiapatita, sem o emprego de agentes de superfície ou surfactantes para formar poros com dimensões entre 20 até 700 microns, ou seja, imitando os corais, onde ocorre a conversão de carbonato de cálcio sintético em hidroxiapatita, o método usado foi o hidrotérmico com controle do pH em 10,5 e na temperatura de 150 °C e pressão de 15 kgf.cm⁻² por períodos de 1 até 8 horas, o estudo de viabilidade celular e adesão celular, demonstraram a sua compatibilidade celular [Mohan N, Palangadan R, Fernandez FB, Varma H. *Preparation of hydroxyapatite porous scaffold from a 'coral-like' synthetic inorganic precursor for use as a bone substitute and a drug delivery vehicle*. Mater Sci Eng C. 2018;92:329–37.], [Souza ADV, Arruda CC, Fernandes L, Antunes MLP, Kiyohara PK, Salomão R. *Characterization of aluminum hydroxide Al(OH)₃ for use as a porogenic agent in castable ceramics*. J Eur Ceram Soc. 2015;35(2)].

[009] O presente processo realizou a síntese de hidroxiapatita porosa sintética (HPS) visando obter elevados níveis de porosidade total e elevada área superficial específica. A rota escolhida foi o método sol-gel adaptado uma vez que não foram usados os precursores convencionais e realizou o tratamento térmico entre 120 até 800 °C [Souza ADV, Salomão R. *Evaluation of the porogenic behavior of aluminum hydroxide particles of different size distributions in castable high-alumina structures*. J Eur Ceram Soc. 2016;36(3):885–97.].

[010] O documento MX PA02009720 refere-se a um procedimento para preparar produtos sintéticos hidroxiapatita (HA) por meio de um método simples e econômico que confere maior pureza, que consiste na preparação de uma solução aquosa, com a qual outra solução de hidróxido de cálcio é titulada, que compreende as seguintes etapas: a) Preparação de duas soluções: um de 0,3 M de ácido fosfórico em água deionizada e outro de 1,3 M de hidróxido de cálcio em água deionizada. b) Titulação da primeira solução sobre a segunda em agitação constante. c) Medição constante o pH da solução resultante até atingir um valor superior a 7,0 e inferior a 9. d) Uma vez atingido o pH desejado, deixe-o repousar por pelo menos uma

semana. e) Filtrar e secar a uma temperatura não superior a 100 °C uma vez que a solução tenha sido deixada em repouso.

[011] O documento RU2440149 refere-se à medicina, em especial aos materiais cerâmicos de fosfato de cálcio, destinados fabricação de implantes ósseos e/ou substituição de defeitos em caso de diversas patologias ósseas. Para reduzir o grau de agregação e aumento da área superficial específica dos pós precipitados, obtidos como resultado da interação química, são mantidos no licor-mãe por pelo menos mais de 14 dias e lavados com etanol. Depois de secar ultradispersivo obtêm-se pós com área superficial específica não inferior a 210 m²/g. Pela sua composição os pós nanométricos consistem em hidroxiapatita e carbonato de cálcio.

[012] O documento WO2023006969 divulga compósitos hidrofílicos porosos para utilização na promoção do crescimento ósseo, juntamente com métodos para a sua preparação. Os compósitos compreendem uma matriz polimérica biodegradável porosa e fosfato de cálcio nanométrico (CaP) homogeneamente disperso por toda a matriz polimérica. O CaP tem uma área superficial específica na faixa de cerca de 180 a cerca de 380 m²/g.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[013] O presente pedido de patente tem por objetivo, sintetizar a hidroxiapatita porosa para ser utilizada como enxerto ósseo, e caracterizar a porosidade total das partículas, a densidade, distribuição de poros por porosimetria de intrusão de mercúrio, fases cristalinas por difratometria de raios-X, viabilidade celular e a morfologia das partículas por microscopia eletrônica de varredura.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[014] A vantagem do processo desenvolvido é a obtenção de elevada porosidade total e elevada área superficial específica, além de não gerar resíduos orgânicos como no processo de extração do enxerto ósseo via osso bovino, o material formado apresenta elevada pureza (>99%) uma vez que é sintetizado usando reagentes analíticos e apresenta baixo custo de obtenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[015] As Figuras descrevem os resultados da invenção e suas vantagens comparativas em relação ao material mais usado comercialmente em grande escala.

[016] A Figura 1 é uma tabela que indica as medidas de distribuição dos tamanhos das partículas e comparação com dados da literatura da amostra referência.

[017] A Figura 2 são difratogramas que apresentam os resultados do teste de difratometria de raios X dos diferentes pós de hidroxiapatita; Figura 2a: H120-3H; Figura 2b: H300-3H; Figura 2c: H500-3H; Figura 2d: H700-3H e Figura 2e: H800-3H.

[018] A Figura 3 são gráficos que ilustram os espectros de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX): Figura 2a: H120-3H; Figura 2b: H300-3H; Figura 2c: H700-3H e Figura 2d: H800-3H.

[019] A Figura 4 é uma tabela que indica as porcentagens atômicas dos elementos presentes na amostra como o cálcio e fósforo.

[020] A Figura 5 é um gráfico que apresenta a comparação entre a área superficial específica (ASE) do material obtido com um material comercial.

[021] A Figura 6a e 6b são gráficos que apresentam as curvas de intrusão de mercúrio das amostras de hidroxiapatita: volume da intrusão acumulada pelo diâmetro dos poros vista de uma seção transversal de uma modalidade do instrumento cirúrgico.

[022] A Figura 7 é uma tabela que indica o resumo das propriedades físico-químicas como a área superficial específica e volume de intrusão de mercúrio da hidroxiapatita porosa.

[023] A Figura 8 demonstra a relação entre a porosidade total (PT; %) e volume de intrusão de mercúrio das HAP's e Bio-Oss®.

[024] A Figura 9 são imagens de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG) indicando a morfologia das seguintes amostras: Figuras 9a, 9b e 9c: amostra referência Bio-Oss®; Figuras 9d, 9e e 9f: H120-3H;

Figuras 9g, 9h e 9i: H300-3H; Figuras 9j, 9k e 9l: H700-3H e Figuras 9m, 9n e 9o: H800-3H.

[025] A Figura 10 é uma tabela que demonstra a estatística utilizada para a determinação das similaridades entre o material hidroxiapatita porosa sintética e o material comercial Bio-Oss®, os testes realizados foram a determinação da média, desvio padrão da densidade óptica, também realizou a determinação da presença de outliers pelo teste de Grubbs, determinação da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk (SW) em seguida realizou o teste ANOVA *one-way* ($\alpha = 0,05$) e teste de Tukey para determinação das semelhanças.

[026] A Figura 11 é um gráfico que indica a comparação da viabilidade celular entre o grupo hidroxiapatita porosa sintética e do grupo comercial Bio-Oss®.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[027] A invenção descreve um método de síntese de hidroxiapatita porosa sintética (HPS) com elevada área superficial específica, elevada pureza (acima de 99%) e elevada porosidade total para ser usado como enxerto ósseo.

[028] EXEMPLO 1: Para a síntese da HPS utilizou-se as seguintes matérias-primas: a) hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$, Neon, Brasil] e b) ácido fosfórico (85% H_3PO_4 ; PA e ACS, Neon, Brasil). Para o estudo de comparação foi adquirido comercialmente um enxerto ósseo da marca Bio-Oss® (Fabricante: Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça, grânulos de 250 - 1000 microns, lote 81901109).

Preparação

[029] Uma solução com concentração de $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido fosfórico foi lentamente adicionada em uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de hidróxido de cálcio, até atingir a relação entre os elementos cálcio e fósforo (Ca:P) de 1,67 e após o tratamento térmico ocorre a formação de hidroxiapatita conforme equação estequiométrica $[10\text{Ca}(\text{OH})_2 + 6\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 1\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18\text{H}_2\text{O}]$. A suspensão permanece sob agitação em agitador magnético por 2 horas sob aquecimento de 50°C . Após essa etapa a suspensão passa por etapa de envelhecimento, durante 1-7 dias, mais preferencialmente 3 dias, em seguida passa por filtração à vácuo,

secada em estufa a 60 °C por 24 horas. Para obter a forma estequiométrica é necessário realizar a etapa de tratamento térmico nas temperaturas de 120; 300; 500; 700 e 800 °C, mais preferencialmente entre 500 até 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, e patamar de 180 minutos e taxa de resfriamento de 10 °C.min⁻¹.

[030] Para obter a distribuição do tamanho das partículas realizou-se a técnica de granulometria por difração a laser (laser scattering, Analysette 22, Fritsch GmbH, Alemanha), a Figura 1 demonstra as distribuições de tamanho das partículas das amostras de hidroxiapatita. A amostra H120-3H apresentou D₅₀ de 155,3 microns, ao ser submetida a tratamento térmico em 300 °C aumentou para 211 microns que pode ser devido a aglomeração das partículas, com o aumento da temperatura esses aglomerados foram reduzidos para um D₅₀ de 72,3 microns. A amostra referência possui faixa de tamanho ao redor de 740 microns, esses resultados indicam a formação de aglomerados de partículas.

[031] Para a identificação das fases cristalinas utilizou-se a técnica de difratometria de raios-X (DRX) em equipamento Brunker D8 Advance ECO (Alemanha) usando radiação CuK α (Filtro de Ni, comprimento de onda de 1,5418 angstroms, faixa de 4-90°, velocidade de varredura de 2°.min⁻¹). A Figura 2a mostra o início da formação dos picos referentes a hidroxiapatita, devido a etapa de envelhecimento em temperatura ambiente durante sete dias que atua na interação dos sais precursores aumentando a efetividade da reação seguida de tratamento térmico a 120 °C-3h. Os difratogramas das Figuras 2b, 2c e 2d, conforme ocorre o aumento da temperatura do tratamento térmico, simultaneamente ocorre o aumento das intensidades dos picos cristalinos, principalmente em 31,8° (JCPDS n° 73-1731) característico da hidroxiapatita. A amostra H800-3H foi a que apresentou a maior cristalinidade devido a maior temperatura do tratamento térmico (800 °C) favorecendo o processo de síntese da fase hidroxiapatita, observa-se na Figura 2e a grande quantidade de picos coincidentes inclusive os picos de maiores intensidades localizados nos intervalos de 2 θ de 30-35°. O método de síntese

utilizado apresentou a vantagem de haver praticamente nenhuma fase secundária além da possibilidade de formação de picos de hidroxiapatita em baixas temperaturas na faixa de 120-500 °C (Figura 2a), indicando que a invenção obteve a hidroxiapatita em baixas temperaturas, importante do ponto de vista energético além de obter uma cristalinidade baixa e semelhante ao Bio-Oss® (8), uma vez que não existe a necessidade de elevada cristalinidade, outro fator importante em menores é a presença de maior porosidade, uma vez que não ocorrem os processos de formação dos pescoços da sinterização (22)(23), com isso poderemos ter regiões com maior área de superfície favorecendo o processo de adesão e proliferação celular.

[032] Para a determinação da relação entre os elementos de Cálcio/Fósforo utilizou-se a técnica de espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS) que relaciona o comprimento de onda da radiação característica de raios-X com o elemento do qual se originou, constitui a base para a análise elementar de microrregiões de uma matéria, foi realizado em equipamento MEV-FEG (Jeol JSM-7500F, Japão). As Figuras 3 e 4, indicam as relações entre as composições químicas elementares entre os átomos de Cálcio/Fosfóro (Ca/P), encontrada pela técnica de EDS em três diferentes microrregiões. A amostra H700-3H apresentou a relação Ca/P de 1,68, sendo a mais próxima da proporção estequiométrica da hidroxiapatita com 1,67, e do osso humano com 1,71 [Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. Vol. 23, Biomaterials Research. 2019.]. O BioOss® apresenta relação Ca/P na faixa de 1,62 (Figura 4), portanto a H700-3H apresenta uma elevada similaridade da entre os átomos de cálcio e fósforo.

[033] A distribuição do tamanho dos poros, área superficial específica, diâmetro médio dos poros, a porosimetria de intrusão de mercúrio é uma técnica que possui ampla capacidade de avaliação dos tamanhos de poros com abrangência entre 3,5 nanômetros até 500 microns, as medidas foram determinadas em um porosímetro de mercúrio modelo AutoPore III, marca Micromeritics GmbH, Estados Unidos. A

Figura 5 indica a variação da ASE sobre diferentes amostras, observa-se que as amostras H500-3H e H700-3H foram as que apresentaram os maiores resultados e superiores a ASE encontrada para o Bio-Oss® usado como referência, indicando que foi possível obter ASE semelhante e otimizar para aplicações como enxerto ósseo.

[034] Os resultados apresentados foram superiores a diversos trabalhos da literatura (Figura 5) que ficaram com ASE entre $59,7\text{-}86\text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, que pode estar relacionado ao processo produtivo que utiliza agentes oxidantes para a extração do colágeno e contaminantes orgânicos e após a etapa de tratamento térmico ($330\text{-}350\text{ }^{\circ}\text{C}$) ocorre o colapso das estruturas porosas e consequentemente reduzindo a ASE, o volume acumulado ($\text{mL}.\text{g}^{-1}$) indicado na Figura 6 e 7, indicou que a hidroxiapatita H500-3H apresentou o maior volume acumulado ($2,27\text{ mL}.\text{g}^{-1}$), dobrando o valor da amostra referência (Bio-Oss® com $1,08\text{ mL}.\text{g}^{-1}$), além de apresentaram distribuição do tamanho dos poros similares, com isso, é possível obter de forma sintética uma hidroxiapatita na mesma faixa de distribuição de tamanho dos poros e com maior volume de acumulado, indicando maior capacidade de adsorção/absorção de fluídos/células, otimizando esse parâmetro do Bio-Oss® que devido ao seu processo de limpeza pode colapsar estruturas porosas reduzindo parcialmente a quantidade de poros, enquanto que no processo de formação das hidroxiapatitas sintéticas as partículas primárias devido ao processo térmico formam partículas maiores e aglomeradas com estruturas porosas e estáveis. Graficamente é possível ver na Figura 8 que todas as hidroxiapatitas sintéticas apresentaram maior volume de intrusão de mercúrio do que a amostra referência.

[035] A morfologia das partículas de hidroxiapatita foi observada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG) em equipamento Jeol JSM-7500F, Japão. A Figura 9 demonstra as imagens feitas via MEV-FEG, pode-se observar nas Figuras 9a, 9b e 9c) que representam a morfologia do BioOss® sendo formadas por partículas primárias nanométricas e aglomeradas (Figura 9c). A hidroxiapatita H120-3H, apresentou partículas com

menor grau de aglomeração uma vez que a temperatura de processamento de 120 °C não é considerada alta para a aglomeração das partículas, apresentam dimensões nanométricas (~20-100 nm, Figura 9f) e com formato de agulhas, típico dos cristais de hidroxiapatita, alguns picos foram confirmados pelo DRX, apesar da baixa temperatura a etapa de envelhecimento foi importante para o início da formação dessa fase cristalina uma vez que favorece as interações em nível atômico/molecular dos elementos cálcio e fósforo. A morfologia da amostra H300-3H, presente nas Figuras 9g, 9h e 9i) demonstrou o início do processo de cristalização da hidroxiapatita bem como a sua aglomeração, esse processo tem continuidade com o aumento da temperatura para 700 °C conforme observa-se nas Figuras 9j, 9k e 9l) com formação de aglomerados estáveis e com a presença de poros na parte interna, chamados de poros co-contínuos [Salomão R, Fernandes L. *Porous co-continuous mullite structures obtained from sintered aluminum hydroxide and synthetic amorphous silica*. J Eur Ceram Soc. 2017;37(8).], ou seja, sendo importantes uma vez que apresentam interconectividade na parte interna do material, favorecendo a circulação de fluídos. A amostra H800-3H, submetida a tratamento térmico a 800 °C apresentou um aumento do tamanho das partículas (Figura 9m), com formação de ligações entre as partículas acarretando em redução da ASE, porosidade total e volume acumulado, resultado esperado uma vez que com o aumento da temperatura parte das estruturas nanométricas são colapsadas, por outro lado o material formado apresenta aglomerados estáveis e com maior resistência mecânica ideais para uso em cirurgias Ortopédicas.

[036] O ensaio de citotoxicidade foi realizado em duas amostras sendo uma delas o enxerto ósseo comercial Bio-Oss® e a hidroxiapatita tratada termicamente em 700 °C por 3 horas (H700-3H) uma vez que apresentou os resultados físico-químicos com maior similaridade do enxerto ósseo comercial.

Célula e condições de cultivo

[037] Para a realização dos ensaios de biocompatibilidade *in vitro* foram selecionados queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (Normal

Oral Keratinocytes spontaneously immortalized - NOK-si). As células foram descongeladas e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina; 10% de soro de bovino fetal, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina G - 10 000 µg.mL⁻¹, estreptomicina - 10 000 µg.mL⁻¹ e anfotericina B - 25 µg.mL⁻¹). O cultivo das células foi realizado em garrafas para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂ (Costar, CorningIncorporated, Corning, NY, EUA). Essas garrafas foram incubadas em estufa para cultura de células (Thermo Scientific) com 5% de CO₂, à temperatura de 37 °C e ambiente com umidade controlada. Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de três dias de incubação, antes do teste de citotoxicidade. O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio de um microscópio de bancada invertido. As células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência, lavadas com tampão PBS, retiradas da placa com solução de tripsina (0,005%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) e então submetidas à centrifugação a 400.g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de DMEM com 10% de SFB. Dessa suspensão de células, 1 mL foi colocado em nova garrafa, sendo acrescidos 14 mL de meio de cultura suplementado e levada à estufa para a formação de nova confluência de células. Para todos os experimentos foram utilizadas células entre a 3^a e a 12^a passagem.

Quantificação das células

[038] Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de 10⁵ células/mL de meio de cultura foi preparada. Efetuou-se os procedimentos descritos anteriormente para obtenção do pellet, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina - Gibco, NY, EUA). Posteriormente, 50 µL foram retirados e adicionados a 50 µl de corante azul de Tripán (Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro, RJ,

Brasil). Dessa solução, 10 µL foram introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) para contagem das células viáveis e ajuste da suspensão à concentração de interesse (10^5 células.mL⁻¹ de meio de cultura para o ensaio MTT).

Obtenção dos extratos

[039] Foi realizada a inserção dos biomateriais (H700-3H e Bio-Oss®) em meio de cultura DMEM sem suplementação na concentração final de 0,2 g.mL⁻¹, e incubados à 37 °C por um período de 24 horas. Após esse período, as suspensões foram esterilizadas por filtração com membranas contendo um filtro especial de acetato de celulose com porosidade inferior a 0,22 µm², e as soluções obtidas foram diluídas em DMEM suplementado com 1% de SFB para se obter concentrações decrescentes dos extratos (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%).

Avaliação quantitativa de MTT

[040] A técnica, o sal metiltetrazólio (MTT; 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazóliobromido) foi incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazólio, produzindo cristais de formazan de cor azul, determinando dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis. Para a realização do teste, 100 µL da suspensão composta de 10^5 células/mL, foram introduzidos em poços de uma placa com 96 orifícios (TPP, Trasadingen, Suíça), incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 100 µL dos extratos contendo as substâncias liberadas pelos biomateriais foram adicionados à placa, sendo incubados por 24 horas. Para cada repetição do teste, foram destinados três compartimentos da placa contendo meio de cultura novo suplementado com 1% de soro fetal bovino (controle negativo), e três poços receberam 100 microlitros de H₂O₂ a 3% (controle positivo). Após o período de incubação de 24 horas,

removeram-se as soluções dos grupos experimentais, e 100 microlitros da solução de sal metiltetrazólio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados a cada orifício da placa, a qual permaneceu incubada por um período de 4 horas a 37 °C para a formação dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial. Em seguida, 100 µl de solução solubilizadora de MTT (álcool isopropílico acidificado) foram adicionados a cada orifício da placa a qual foi agitada levemente até ocorrer a dissolução dos cristais de formazan. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. É importante ressaltar que todos os procedimentos foram realizados em triplicata e em três momentos diferentes (n = 9).

Análise estatística dos resultados do estudo de citotoxicidade

[041] Os dados coletados da densidade óptica foram inicialmente submetidos a determinação da média, desvio padrão e submetido ao teste de Grubbs para a determinação da presença de outliers e posteriormente os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a determinação da normalidade, os resultados obtidos estão na Figura 10. O teste de Grubbs não indicou a presença de outliers no conjunto de dados e o teste de Shapiro-Wilk demonstrou que os dados apresentam normalidade. A hipótese nula utilizada foi a comparação entre as médias da densidade óptica tanto do grupo controle negativo (DMEN) com os outros grupos (H700-3H com diluições de 100 até 6,25% e Bio-Oss® 100-6,25%). Caso o $F_{\text{observado}} > F_{\text{crítico}}$ é rejeitada a hipótese nula e se $F_{\text{observado}} < F_{\text{crítico}}$ aceita-se a hipótese nula. De acordo com os resultados estatísticos (Figura 10) comparando o controle negativo (DMEN) com os grupos H700-3H em cinco diferentes diluições (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%), indicando tanto pelo teste ANOVA oneway quanto pelo teste de Tukey a similaridade estatística (alfa = 0,05%) em relação ao grupo controle. Comparando os resultados do controle negativo (DMEN) do grupo BioOss® com diversas diluições (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%). De acordo com os resultados (Figura 10) foi possível observar pelo teste de variâncias ANOVA one-way que existem diferenças significativas entre os grupos. O teste de Tukey-

HSD indicou a significância estatística entre os grupos e apenas o grupo controle negativo e o grupo Bio-Oss®: 100% foram semelhantes os demais grupos não apresentaram similaridade. A viabilidade celular foi obtida pela divisão dos valores das densidades ópticas dos poços experimentais por aqueles do controle negativo e multiplicando-se por 100 e indicados graficamente pela Figura 10.

[042] Os biomateriais são classificados de acordo com a ISO 10993-5 [*International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Iso 10993–5. 2009. p. 1–52.] como: 0 - não citotóxico (viabilidade celular superior a 75%), 1 - ligeiramente citotóxica (entre 75% e 50% de viabilidade celular), 2 - moderadamente citotóxica (entre 50% e 25% de viabilidade) e 3 - fortemente citotóxica (viabilidade celular inferior a 25%). Conforme a classificação o grupo Bio-Oss® 12,5-100% e o grupo H700-3H: 12,5-100% foram considerados não citotóxicos, portanto, biocompatíveis com viabilidade celular acima de 80% em relação ao controle negativo.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA, refere-se à um processo sol-gel adaptado sem utilização de precursores convencionais a partir de hidróxido de cálcio e ácido fosfórico, **caracterizado pela** adição lenta de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de hidróxido de cálcio a uma solução de $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido fosfórico até atingir a relação entre os elementos cálcio e fósforo (Ca:P) de 1,67, mantida sobre agitação em agitador magnético por 2 horas sob aquecimento de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de envelhecimento durante 1-7 dias, mais preferencialmente 3 dias, e então realizada a filtração à vácuo e seca em estufa a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, seguido de tratamento térmico nas temperaturas de 120; 300; 500; 700 e $800 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mais preferencialmente entre 500 até $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, e patamar de 180 minutos e taxa de resfriamento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$.
2. HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HPS), **caracterizada por** uma área superficial específica (ASE) acima de $160 \text{ m}^2/\text{g}$ e porosidade total acima de 93,5%.

Amostra	D₁₀ (mm)^(a)	D₅₀ (mm)^(b)	D₉₀ (mm)^(c)	D₁₀ até D₉₀ (mm)^(d)	(D₉₀ – D₁₀)/(D₅₀)
H120-3H	5,9	155	531	5,90 – 531	3,38
H300-3H	8,4	211	509	8,44 - 509	2,37
H700-3H	4,1	72	513	4,13 - 513	3,26
Bio-Oss [®] (e)	510	740	1030	510 - 1030	0,70

FIGURA 1

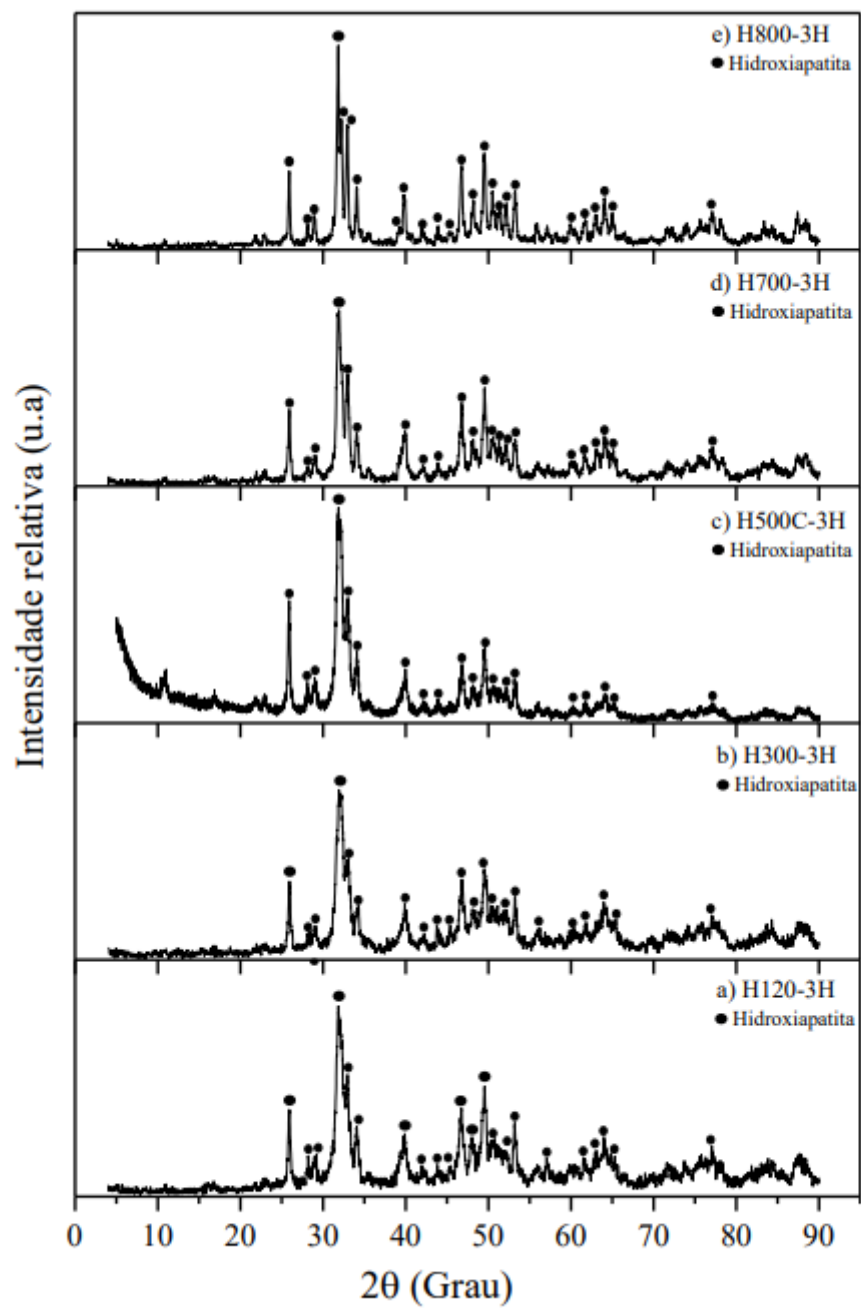


FIGURA 2

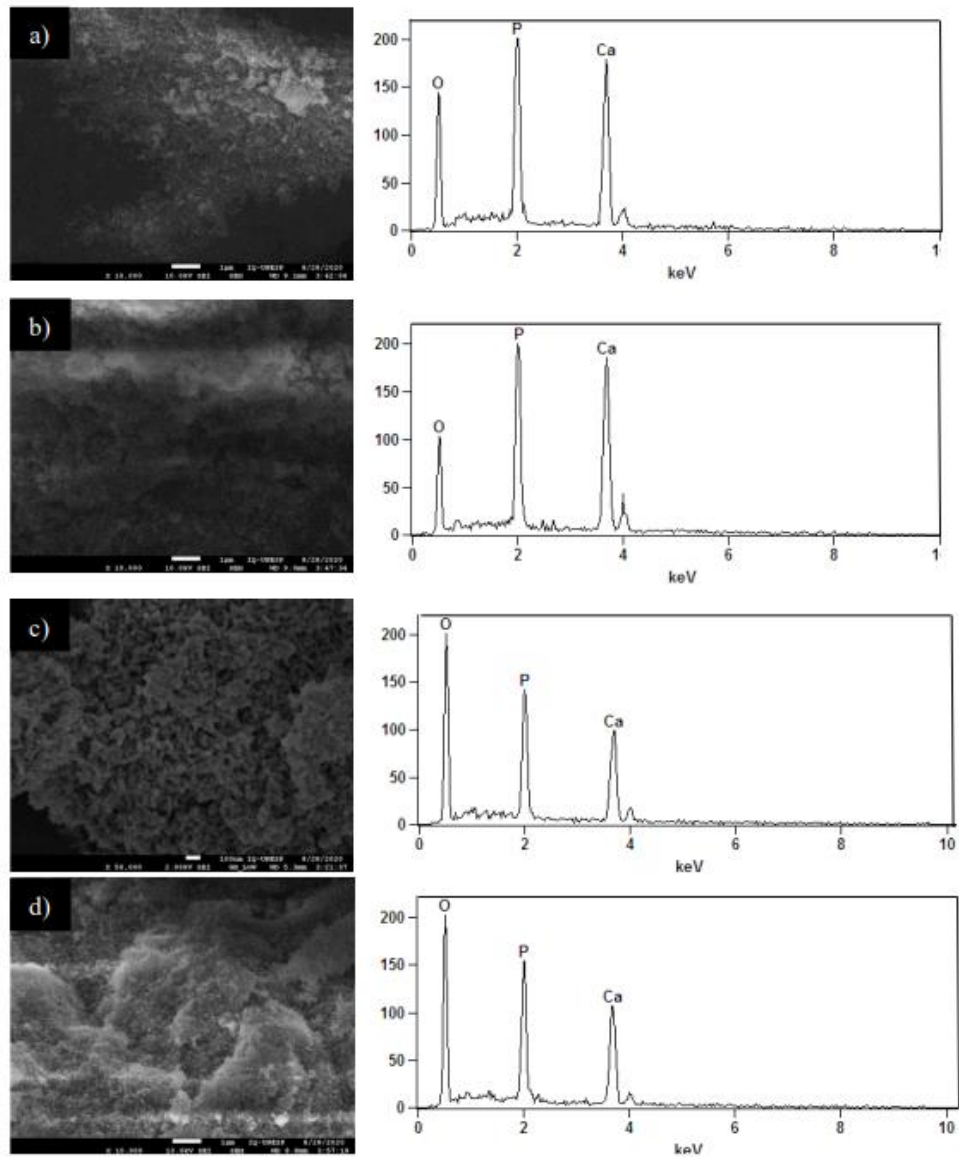


FIGURA 3

Amostra analisada	% atômica de Cálcio	% atômica de Fósforo	Relação Ca/F
H120-3H	30,67	16,95	1,81
H300-3H	37,47	18,30	2,04
H700-3H	21,13	12,59	1,68
H800-3H	22,20	12,12	1,83
Bio-Oss®	ND	ND	1,62 ± 0,003 (25)
ND = Não Determinado			

FIGURA 4

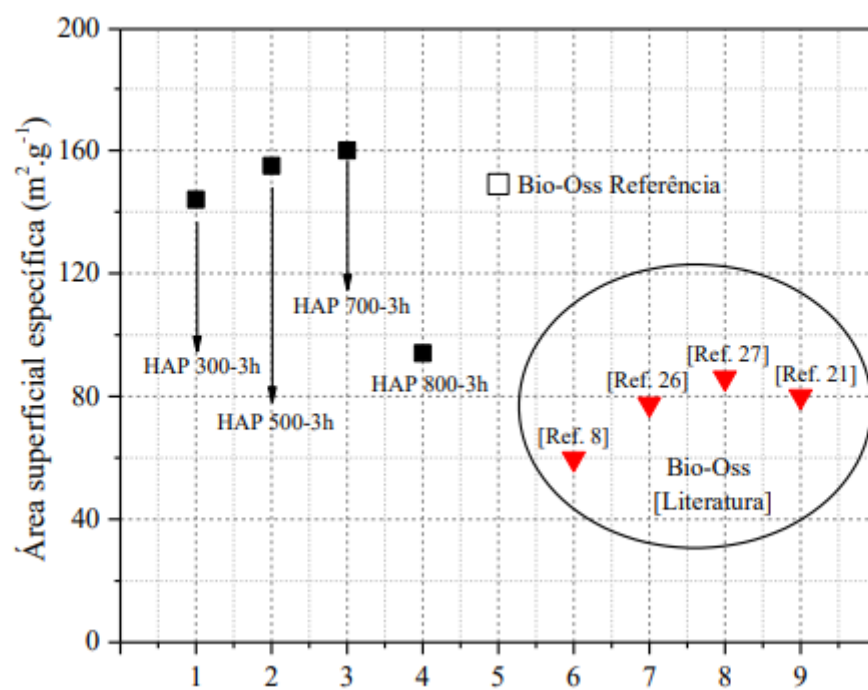


FIGURA 5

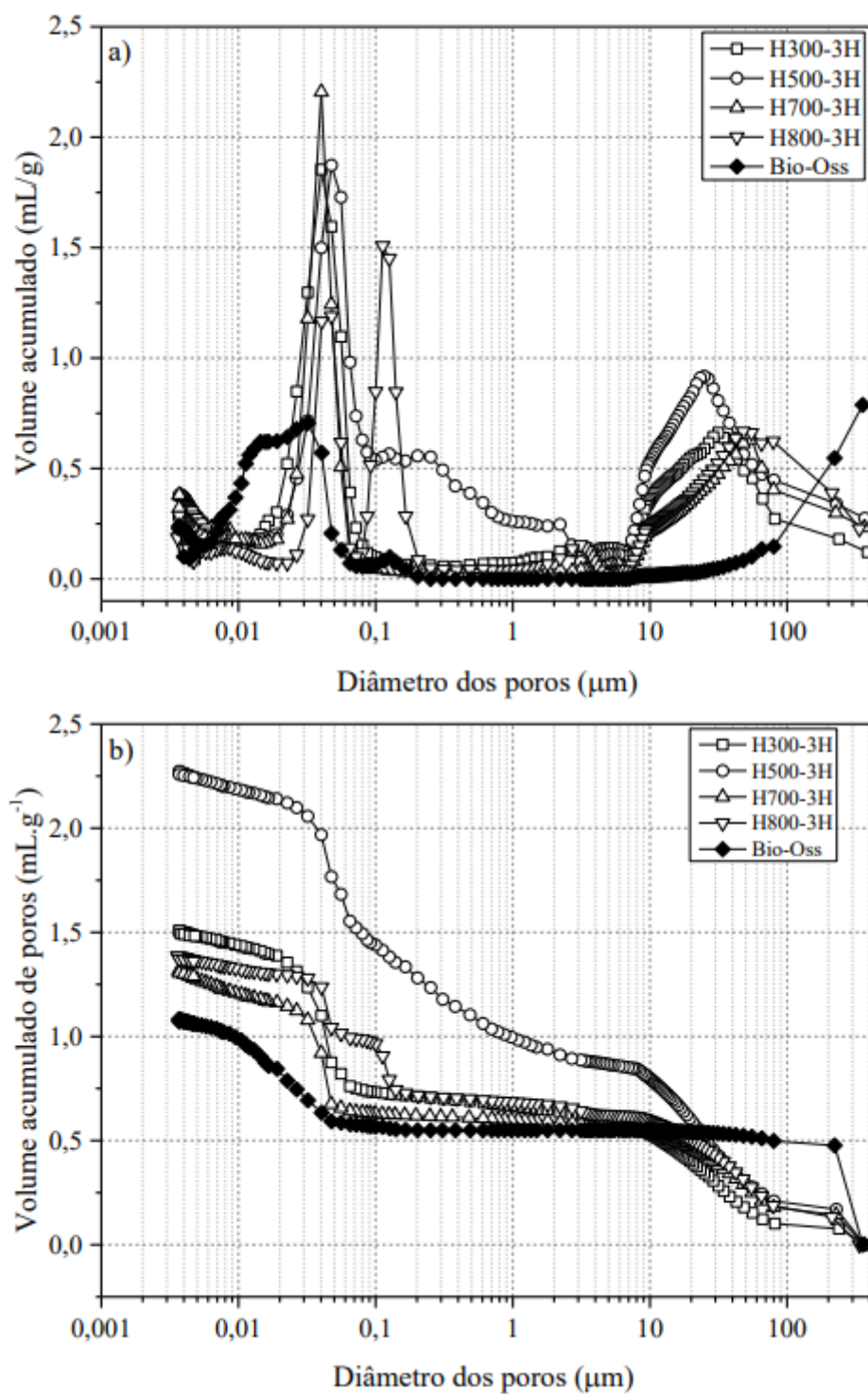


FIGURA 6

Material	ASE ^(a)	VI-Hg ^(b) (mL/g)	Densidade do “Bulk” (g/cm³)	Diâmetro médio dos poros (nm)	Porosidade total (%) ^(c)	Referência
H300-3H	144	1,50	0,5877	41,8	88,6	Este Pedido de Patente
H500-3H	155	2,27	0,3948	58,5	89,7	
H700-3H	160	1,31	0,7089	32,8	93,5	
H800-3H	94	1,38	0,6223	58,6	86,2	
^(d) Bio-Oss®	149	1,08	0,8266	11,0	89,6	
Bio-Oss®	59,7	0,546	ND	ND	63,5	Ref. 1
Bio-Oss®	77,5	ND	ND	ND	ND	Ref. 2
Bio-Oss®	86	ND	ND	ND	ND	Ref. 3
Bio-Oss®	80	ND	ND	ND	ND	Ref. 4
Enxerto ósseo suíno	69,9	ND	ND	ND	78,4	Ref. 5

FIGURA 7

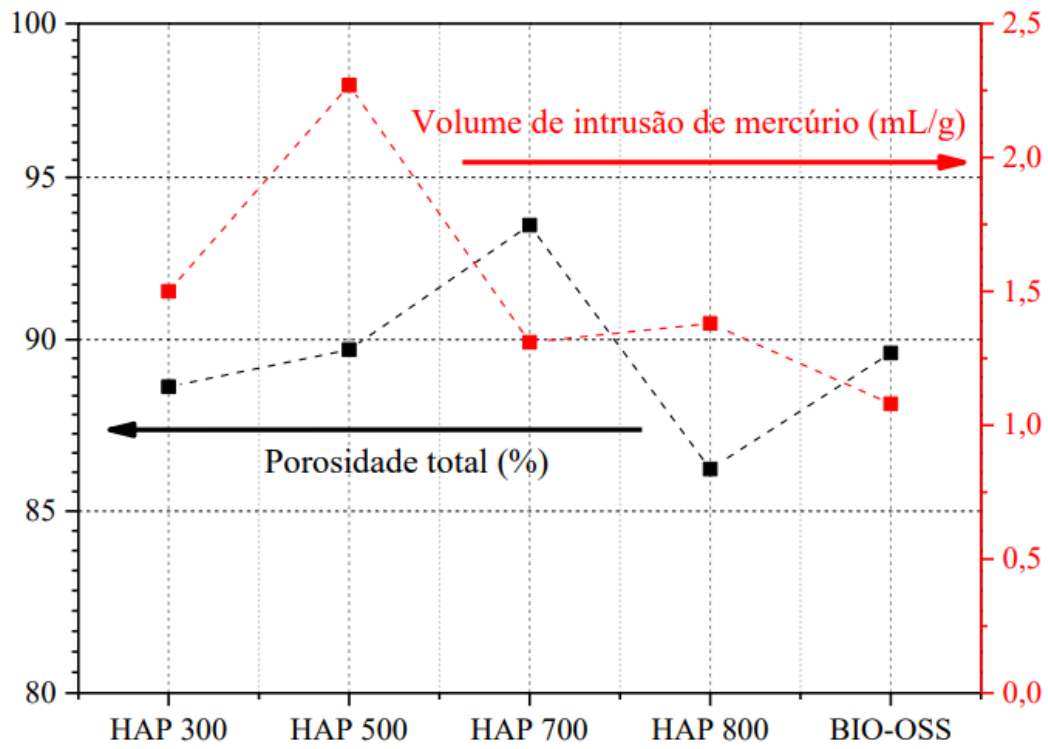


FIGURA 8

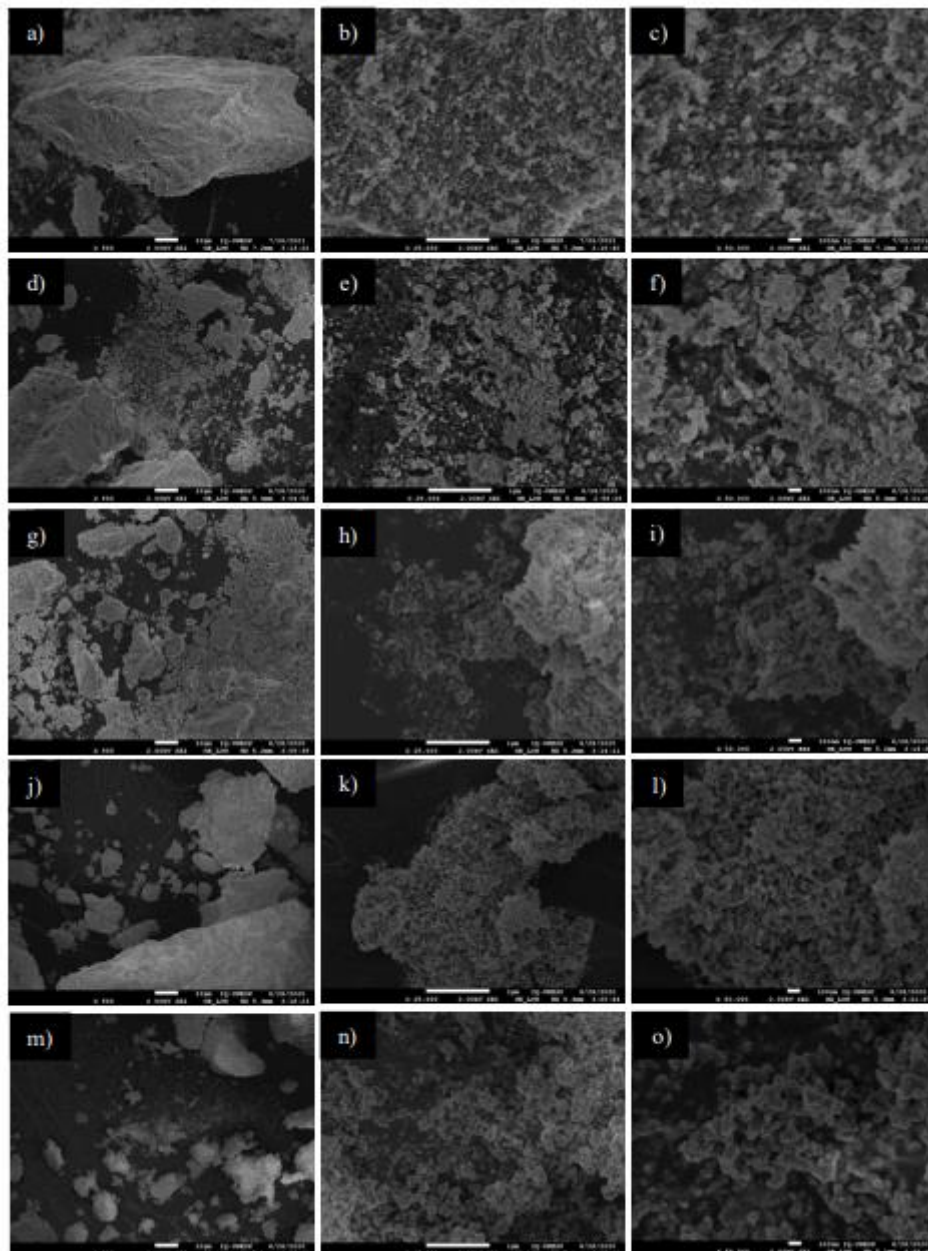


FIGURA 9

Material	Média da densidade óptica	Desvio padrão	Teste de Grubbs	SW test (1)
DMEM	3,4550	0,1056	Não	Sim (p = 0,6538)
H ₂ O ₂ 3%	0,0941	0,0138	Não	Sim (p = 0,2531)
H700-3H : 100%	3,3353	0,3113	Não	Sim (p = 0,2052)
H700-3H : 50%	3,6612	0,1674	Não	Sim (p = 0,8549)
H700-3H : 25%	3,6457	0,2119	Não	Sim (p = 0,8529)
H700-3H : 12,5%	3,5885	0,2903	Não	Sim (p = 0,1297)
H700-3H : 6,25%	3,2452	0,5110	Não	Sim (p = 0,0626)
Bio-Oss® 100%	3,6497	0,1964	Não	Sim (p = 0,1111)
Bio-Oss® 50%	3,8970	0,0597	Não	Sim (p = 0,5430)
Bio-Oss® 25%	3,7793	0,0274	Não	Sim (p = 0,9177)
Bio-Oss® 12,5%	3,8687	0,0631	Não	Sim (p = 0,7350)
Bio-Oss® 6,25%	3,7230	0,0460	Não	Sim (p = 0,0847)

(1) Teste para a determinação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk com alfa de 0,05.

Material	ANOVA one-way (alfa = 0,05)
DMEM	Se $F_{\text{observado}} (2,3345) < F_{\text{crítico}} (2,4377)$; p = 0,05866 Hipótese nula H_0 $H_0 = m_{\text{DMEM}} = m_{\text{H700-3H:100\%}} = m_{\text{H700-3H:50\%}} = m_{\text{H700-3H:25\%}} = m_{\text{H700-3H:12,5\%}} = m_{\text{H700-3H:6,25\%}}$ Hipótese nula H_0 aceita
H700-3H : 100%	
H700-3H : 50%	
H700-3H : 25%	
H700-3H : 12,5%	
H700-3H : 6,25%	
Bio-Oss® 100%	Se $F_{\text{observado}} (10,90154) > F_{\text{crítico}} (2,7728)$; p = $6,0469 \times 10^{-5}$ Hipótese nula H_0 $H_0 = m_{\text{DMEM}} = m_{\text{Bio-Oss : 100\%}} = m_{\text{Bio-Oss : 50\%}} = m_{\text{Bio-Oss : 25\%}} = m_{\text{Bio-Oss : 12,5\%}} = m_{\text{Bio-Oss : 6,25\%}}$ Hipótese nula H_0 rejeitada
Bio-Oss® 50%	
Bio-Oss® 25%	
Bio-Oss® 12,5%	
Bio-Oss® 6,25%	

	Tukey HSD (*) (Alfa = 0,05)				
DMEM	Bio-Oss® : 100% (a)	Bio-Oss® : 50% (b)	Bio-Oss® : 25% (c)	Bio-Oss® : 12,5% (d)	Bio-Oss® : 6,25% (e)
DMEM	H700-3H : 100 % (a)	H700-3H : 50% (a)	H700-3H : 25% (a)	H700-3H : 12,5% (a)	H700-3H : 6,25% (a)

(*) Letras iguais representam semelhança significativa. Letras diferentes existe diferença significativa.

FIGURA 10

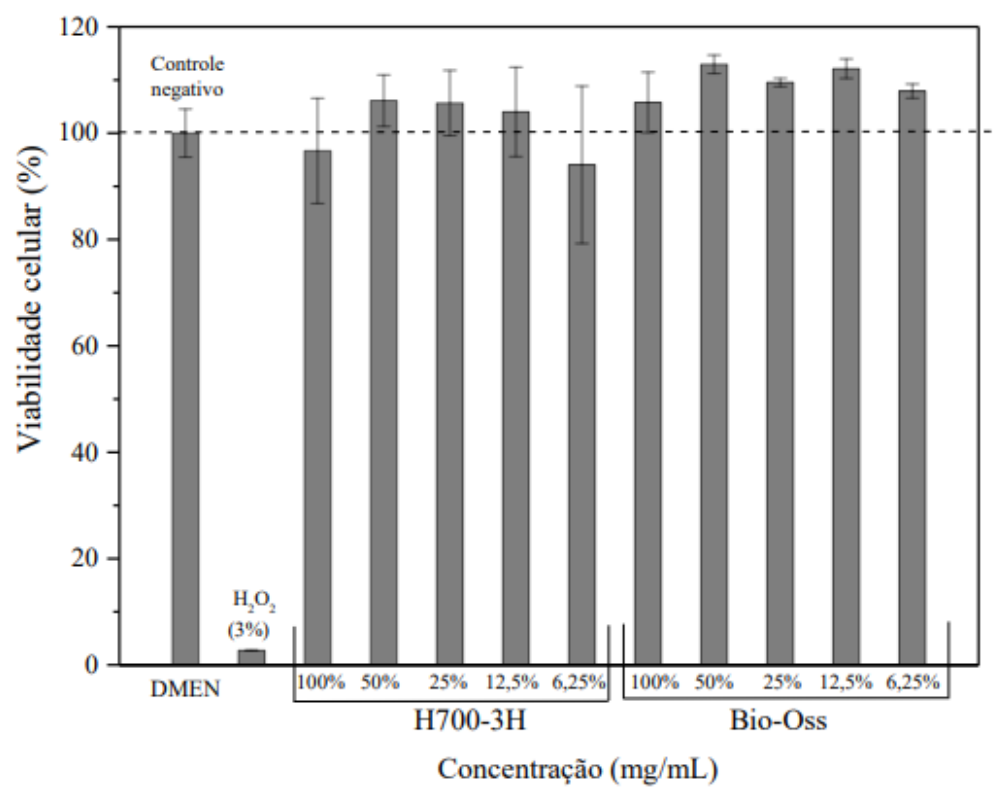


FIGURA 11

RESUMO

HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HPS) E MÉTODO DE SÍNTESE COM CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS QUE MIMETIZAM A POROSIDADE ÓSSEA PARA USO COMO ENXERTO ÓSSEO

O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Saúde Humana, descreve a síntese para obtenção do biomaterial denominado hidroxiapatita sintética porosa (HPS) com elevada área superficial específica, elevada pureza (acima de 99%), baixa cristalinidade e elevada porosidade total para ser usado como enxerto ósseo, uma vez que o osso humano ou animal apresenta baixa cristalinidade. Os enxertos ósseos são materiais amplamente utilizados nas áreas de Ortopedia, cirurgia buco-maxilar e Odontologia. A vantagem do processo desenvolvido é a obtenção de elevada porosidade total e elevada área superficial específica, além de não gerar resíduos orgânicos como no processo de extração do enxerto ósseo via osso bovino, o material formado apresenta elevada pureza (>99%) uma vez que é sintetizado usando reagentes analíticos e apresenta baixo custo de obtenção.