

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 048**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 6/00** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61L 24/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2015 PCT/EP2015/066651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2015 E 15748187 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3177273**

54 Título: **Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor**

30 Prioridad:

**21.07.2014 ES 201431091**

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

**13.11.2019**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid, ES y**

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DELGADO LÓPEZ, JOSÉ MANUEL;**

**GÓMEZ MORALES, JAIME;**

**FERNÁNDEZ PENAS, RAQUEL;**

**IAFISCO, MICHELE;**

**TAMPIERI, ANNA y**

**PANSERI, SILVIA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 731 048 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**

Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor

**5 SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION**

Biomateriales de interés en biomedicina (transportador de fármacos y regeneración ósea) y odontología.

10 El objeto de la invención es un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato (molécula que forma parte de la fase orgánica del hueso) y dopadas con flúor. Este material presenta un amplio rango de aplicaciones en el campo de la biomedicina (transportador de fármacos y regeneración ósea) debido a su excelente biodegradabilidad y bioactividad, además de promover la adhesión celular y la osteogeneración. Asimismo, presenta múltiples aplicaciones en odontología donde puede ser utilizado en pastas dentales, enjuagues bucales, barnices de flúor, goma de mascar y geles como agente remineralizante de la dentina y el esmalte.

15 El procedimiento está basado en dos disoluciones formadas por cloruro cálcico y citrato sódico por un lado, y por monohidrogenofosfato sódico y carbonato sódico con un compuesto de flúor, que se mezclan a temperatura ambiente. Presenta las ventajas, frente al estado de la técnica anterior, de que el procedimiento es ecoeficiente ya que no deja ningún residuo ácido (no se utilizan ácidos fuertes en la síntesis), de sintetizarse en una sola etapa (al utilizar el citrato sódico como reactivo en la síntesis) y de ser la primera vez que se obtiene un fosfato cálcico amorfo recubierto con citrato y dopado con flúor, por tanto con una acción remineralizante más potente que el fosfato cálcico amorfo.

**25 ESTADO DE LA TECNICA**

La fase amorfa es una forma poco frecuente de encontrar el fosfato de calcio (CaP) mineral en organismos vivos. El fosfato de calcio amorfo (ACP) se ha encontrado en las mitocondrias de células eucariotas y procariotas y se considera la fase precursora en el proceso de formación de la fase mineral del hueso, carbonato-apatito nanocristalino, cuya superficie se ha encontrado recientemente que se halla recubierta de citrato. El ACP también actúa como fase intermedia en la preparación de diversos CaP mediante distintos métodos. Este material presenta un amplio rango de aplicaciones en el campo de la biomedicina debido a sus interesantes propiedades tales como excelente bioactividad, facilita la adhesión celular, fácil biodegradación y además favorece la osteoconductividad y osteogeneración. Asimismo, presenta múltiples aplicaciones en odontología donde puede ser utilizado en pastas dentales, enjuagues bucales, goma de mascar, geles y barnices de flúor como agente remineralizante de la dentina y del esmalte.

40 El documento CN101428779A se refiere a materiales nanométricos y su preparación, en particular a una hidroxiapatita con una estructura nanométrica hueca y su método de preparación. La apariencia externa de la hidroxiapatita con la estructura nanométrica hueca es elíptica, en forma de huso o en forma de prisma hexagonal; y la estructura nanométrica es una estructura hueca.

45 El documento US2006/110306A1 divulga nanopartículas de calcio y compuestos de fósforo preparadas en un estado generalmente amorfo altamente puro, secando por pulverización una solución ácida débil de dicho compuesto y evaporando el líquido de la pulverización atomizada en una columna caliente, seguido de la recolección de las partículas precipitadas.

50 El documento WO98/40406 divulga un producto que está compuesto de fosfato de calcio amorfo estabilizado con caseína, una fosfoproteína presente en la leche. Este producto se está usando actualmente como material abrasivo en pastas dentífricas, gomas de mascar y en post-tratamientos de blanqueamiento dental. Sin embargo, su eficacia para prevenir caries y remineralizar el esmalte dañado no se ha demostrado todavía. El ACP también se está usando en materiales poliméricos compuestos como material de relleno para la reparación de piezas dentales. El ACP estimula la reparación del diente debido a que especialmente a los pHs ácidos generados por la placa bacteriana se produce la liberación de iones Ca y fosfato que se depositan sobre la estructura del diente como hidroxiapatito regenerando el esmalte (principalmente compuesto de hidroxiapatito cristalino). La tabla 1 resume las principales aplicaciones del ACP como biomaterial.

Tabla 1. Fosfatos de calcio amorfo usados como biomateriales.

Tipo de material	Aplicación	Efecto
Cementos	Sustitución ósea Odontología	Agente endurecedor Absorbible con gran reactividad superficial. Fuente de iones Ca <sup>2+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

Recubrimientos	Prótesis metálicas	Aumenta la biodegradabilidad y su actividad biológica
Compuestos mineral/orgánico	Remineralización de dientes Sustitución ósea	Mejora sus propiedades mecánicas Liberación de iones $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{PO}_4^{3-}$ aumentando su actividad biológica
Suspensión acuosa	Liberación de genes	Absorbible y biocompatible. Estabilidad dependiente del pH

Algunas de estas aplicaciones han sido recopiladas en J. Zhao y col. *Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry*; Chemistry Central Journal (2011), 5:40 (doi:10.1186/1752-153X-5-40).

5 En cuanto a la preparación del ACP, es conocida en diversas modalidades partiendo de precursores solubles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  a pHs adecuados para la precipitación, siendo común la utilización de precursores solubles cuyo catión no conduzca a otras especies que pudieran interferir a posteriori en la composición del producto final, como pudieran ser el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , el  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , el fosfato o hidrogenofosfato amónico. Se utiliza frecuentemente  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

10 También es conocida la función del ácido cítrico como complejante del catión  $\text{Ca}^{2+}$  que además es aceptable desde el punto de vista farmacéutico, como así lo son, por ejemplo, otros ácidos policarboxílicos como el ácido tartárico. Por este motivo estos ácidos se utilizan también para estabilizar composiciones amorfas de ACP. Así se recoge en las reivindicaciones de la publicación WO03059304 donde se propone el ácido cítrico, entre otros formadores de quelatos con el catión  $\text{Ca}^{2+}$ , en una proporción del 0,1 % al 5% en peso en un preparado que contiene ACP combinado con un fosfopéptido.

15 En JP2001169121, se propone la utilización de ácido cítrico como estabilizante del ACP ya formado por precipitación desde el ácido fosfórico y el hidróxido de calcio, sometiendo el conjunto a una molienda posterior en presencia del ácido cítrico referido.

20 Por tanto, ninguna de estas publicaciones menciona una preparación como la del procedimiento objeto de la presente invención, en la que el citrato se aporta como reactivo para la precipitación del ACP (proceso en una etapa) y no como estabilizante en una fase posterior a la precipitación (proceso en dos etapas).

25 En las revisiones de Dorozhkin S. V. [*Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates*, Acta Biomaterialia (2010), No. 6 (3), 715-734]; Combes C. y Rey C. [*Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials*, Acta Biomaterialia (2010), No.6 (9), 3362-3378] y otra revisión de Dorozhkin S. V. [*Amorphous calcium phosphates*, Acta Biomaterialia (2010), No.6 (12), 4457-4475 se recogen diversos procedimientos por vía húmeda, pero en los que no se aplican las mismas condiciones, etapas de proceso y reactivos que en el procedimiento objeto de la presente invención. De hecho, se contempla el ácido cítrico en numerosas ocasiones como agente dispersante en estas preparaciones y ocasionalmente el anión carbonato con funciones similares.

30 La publicación de J.M. Delgado-López et al. *Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content* (Acta Biomaterialia (2012) No.8, pág. 3491) establece un procedimiento de precipitación de apatito y carbonato-apatito nanocristalino recubierto con citrato. Las diferencias sustanciales en el estado de la técnica entre el procedimiento objeto de la presente invención y este documento son:

- 35 (1) Temperatura de la precipitación  
 (2) Precipitación de nanopartículas de ACP dopadas con flúor y recubiertas con citrato como fase estable.  
 40 (3) No existe proceso de maduración del precipitado  
 (4) No se forma apatito ni ninguna otra fase cristalina del fosfato de calcio en el precipitado.

#### BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

45 Un primer objeto de la presente invención es un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor (FACP) que comprende:

- preparación de una disolución de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración comprendida entre 0,08 M y 0,12 M y  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  (citrato sódico) a concentración comprendida entre 0,35 M y 0,50 M.
- 50 - preparación de una segunda disolución formada por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a concentración comprendida entre 0,10 M y 0,15 M con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M y un compuesto de flúor.
- mezcla bajo agitación de las dos disoluciones preparadas en las etapas anteriores en proporción 1:1 v/v a pH comprendido entre 8,3 y 8,7 (ajustado por ejemplo con HCl) y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo inferior a 2 minutos.
- 55 - tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura.
- liofilización del precipitado húmedo.

En un modo preferente de realización de la invención, las concentraciones de los reactivos utilizados para la primera disolución son 0,1 M para el  $\text{CaCl}_2$  y 0,4 M para el  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  y las concentraciones utilizadas para la segunda disolución son 0,12 M para el  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,2 M para el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

5 El compuesto de flúor se selecciona entre  $\text{CaF}_2$ , NaF ó KF y se añade a una concentración comprendida entre 0,01 M y 0,1 M. En un modo de realización preferente, el compuesto de flúor es  $\text{CaF}_2$  y se añade a una concentración de 0,05 M.

10 Constituye otro objeto de la presente invención nanopartículas de fosfato cálcico amorfo dopadas con flúor, obtenidas mediante el procedimiento anterior, que presentan forma esférica y tamaño comprendido entre 30 y 80 nm, así como los siguientes contenidos de Na, Ca, P, citrato, carbonato, fluoruro y agua estructural:

- entre 3,1 y 3,5 % en peso de Na
- entre 27,0 y 27,4 % en peso de Ca
- 15 - entre 37,0 y 37,8 % en peso de P
- entre 3,5 y 5,0 % en peso de citrato
- entre 5,4 y 7,0 % en peso de carbonato
- entre 6 y 10 % en peso de agua
- 20 - entre 2 y 5 % en peso de fluoruro

El término "agua" hace referencia en este aspecto de la presente invención tanto al agua adsorbida como al agua estructural.

25 En un tercer aspecto, constituye otro objeto de la presente invención el uso de las nanopartículas en aplicaciones tales como:

- transporte de biomoléculas y/o fármacos
- biomateriales en aplicaciones ortopédicas
- en odontología, preferentemente como material para preparar cementos para relleno y/o sellado en endodoncias y reparaciones dentales, o bien como componente de pastas dentífricas, gomas de mascar, enjuagues bucales, barnices de flúor y geles para favorecer la remineralización del esmalte por la liberación gradual de iones calcio, fosfato y flúor.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de ACP (a) y FACP (b) recubiertas de citrato. También se muestran los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) obtenidos para cada una de las nanopartículas. En la izquierda de A se muestra una imagen TEM de una única nanopartícula. En los paneles c y d se han representado los espectros de dispersión de energía de rayos X (EDS) de ACP y FACP, respectivamente.

**Figura 2.** Difractogramas de rayos X (a) y espectros Raman (b) de las nanopartículas.

45 **Figura 3.** Ensayos de proliferación celular por MTT de osteoblastos humanos incubados durante 1, 3 y 7 días con nanopartículas de ACP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n=3.

### MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

50 Las nanopartículas de ACP se obtuvieron mediante un proceso de precipitación mezclando dos disoluciones que contenían:

- (i) 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  + 0,4 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  y
- (ii) 0,12 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

55 en proporción 1:1 v/v, 200 ml en total y ajustando el pH a 8,5 con HCl a temperatura ambiente.

Cuando la mezcla toma una apariencia lechosa (aproximadamente a los 30 s después de mezclar), las partículas se someten a tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura (MilliQ®, Millipore). Posteriormente, el precipitado húmedo se liofiliza y las partículas son posteriormente caracterizadas.

60 Para obtener estas partículas dopadas con F, se añade  $\text{CaF}_2$  0,05 M a la solución (ii).

### Técnicas de caracterización

Las nanopartículas se analizaron con un Microscopio Electrónico de Transmisión (STEM Philips CM 20) operado a 80 kV. Este equipo también permitió adquirir los patrones de difracción de electrones de las nanopartículas así como los espectros de dispersión de energía de rayos X (EDS). Para dichas observaciones, las muestras liofilizadas se dispersaron en agua ultrapura y a continuación unas cuantas gotas de esta suspensión se depositaron sobre gradillas convencionales de cobre.

La cantidad de Ca y P se cuantificó mediante espectroscopía de emisión óptica (ICP-OES) usando un espectrómetro Liberty 200 (Varian, Australia). Para ello, las muestras liofilizadas se disolvieron en ácido nítrico ultrapuro concentrado (1 % v/v).

El análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo con un sistema SDT Q 600 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) bajo un flujo constante de nitrógeno (100 mL.min<sup>-1</sup>) e incrementando la temperatura hasta los 1200 °C en intervalos de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

Los patrones de difracción de rayos X se adquirieron con un difractómetro X-Pert PRO (PANalytical) equipado con un detector PIXcel operando a 45 kV y 40 mA, con radiación incidente Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Se usaron rendijas variables ("anti-scatter"), con una longitud de irradiación de 10 mm. El rango 2 $\theta$  se varió desde 5° a 70° con incrementos 2 $\theta$  de 0,039.

Los espectros Raman se obtuvieron con un espectrómetro LabRAMHR (Jobin-Yvon, Horiba, Japón). Este equipo está provisto de un láser de diodo como fuente de excitación ( $\lambda=532 \text{ nm}$ ), y de un detector CCD refrigerado por Peltier (1026 x 256 pixels). Los espectros se obtuvieron con una resolución espectral de 3 cm<sup>-1</sup>.

La cantidad de flúor en las muestras se cuantificó mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF) usando un espectrómetro PHILIPS Magix Pro (PW-2440). Adicionalmente, el contenido en flúor también se determinó mediante espectrofotometría complejándolo con cloruro de zirconilo y eriocromo cianina R y midiendo la absorbancia del complejo a 570 nm.

### Análisis de cultivo celular "in vitro"

La respuesta biológica de las nanopartículas se evaluó usando líneas celulares de osteoblastos humanos (MG-63, Lonza, Italia). Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 (PAA, Austria), que contenía un 10% de suero fetal bovino (FBS) y penicilina-estreptomina (100 U/mL-100 $\mu$ g/mL) a 37 °C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). Posteriormente, las células se separaron de su soporte mediante tripsinización y seguidamente fueron centrifugadas y resuspendidas. El test de exclusión con azul de Tripán se utilizó para contar las células vivas (test de viabilidad celular). Las células se depositaron en placas de 96 pocillos con una densidad de 3,0x10<sup>3</sup> células por pocillo. 24 horas después, se añadieron al cultivo celular tres concentraciones diferentes de nanopartículas de ACP recubiertas de citrato (100  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 1000  $\mu$ g/mL) previamente esterilizadas mediante radiación  $\gamma$  de 25 kGy. La incubación de las células se realizó en condiciones estándar (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 1, 3 y 7 días. El medio de cultivo fue renovado cada tres días. Todos estos ensayos se realizaron en una cabina de flujo laminar.

### Citotoxicidad MTT y viabilidad celular

El método MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolio] se utilizó para determinar el posible efecto tóxico de las nanopartículas. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), cuya concentración puede determinarse colorimétricamente, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Las células, después de estar en contacto con las nanopartículas durante 1, 3 y 7 días, se incubaron en MTT disuelto en PBS (5 mg/mL) en proporción 1:10 durante 2 horas a 37°C. Seguidamente las células se incubaron con 200  $\mu$ l de dimetilsulfoxido (Sigma) durante 15 min para disolver los cristales de formazan. Se empleó un espectrofotómetro Multiskan FC Microplate (Thermo Scientific) para medir la absorbancia, que es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas, a 570 nm. Se analizaron tres muestras por cada uno de los tiempos estudiados (1, 3 y 7 días).

### Resultados

Las imágenes de microscopía electrónica (Fig. 1) indican que tanto las muestras no dopadas, ACP (A) como las dopadas, FCAP (B) son nanopartículas esféricas con tamaños comprendidos entre 30 y 80 nm. Además, la ausencia de puntos de difracción en los patrones pone de manifiesto su carácter amorfo. A su vez, los espectros EDS confirman que están compuestas sólo por Ca y P. El pico de F en el espectro de las partículas dopadas que debiera aparecer alrededor de 0,68 KeV no se observa porque posiblemente se encuentra solapado con el pico de oxígeno (0,2 KeV), mucho más intenso. La naturaleza amorfa de las nanopartículas se ha confirmado con los patrones de

difracción de polvo (Fig. 2A). La ausencia de picos en los patrones de difracción confirma la naturaleza no cristalina de estos materiales. Los espectros Raman también son típicos de fosfatos de calcio amorfo puesto que el pico principal aparece a  $952\text{ cm}^{-1}$ , ligeramente desplazados con respecto al pico principal del hidroxiapatito ( $959\text{ cm}^{-1}$ ). La composición química de los materiales ACP y FACP obtenida mediante TGA, ICP y fluorescencia de Rayos X ya ha sido descrita anteriormente.

5

La respuesta biológica de las nanopartículas ha sido estudiada con células de osteoblastos (MG-63). Tres concentraciones distintas de nanopartículas (100, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadieron al medio de cultivo y después de un cierto periodo de incubación (1, 3 ó 7 días) se cuantificó el número de células metabólicamente activas mediante ensayos MTT (Fig. 3). Se observó un aumento en la proliferación celular en todos los casos (incluso para la concentración más alta) al pasar de 1 a 7 días de incubación. Además, para la concentración más baja estudiada, el crecimiento celular es comparable al observado por las células en ausencia de nanopartículas (control). Sin embargo al aumentar la concentración, el crecimiento celular es mucho menos notable que en el control, posiblemente debido a que son concentraciones de nanopartículas excesivamente altas. A pesar de ello, los test de viabilidad y morfología celular (no mostrados) dieron resultados muy similares para todas las concentraciones estudiadas. Estos resultados claramente indican que las nanopartículas son totalmente biocompatibles en contacto con esta línea celular de osteoblastos humanos.

10

15

## REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor que comprende:
- 5 - preparación de una disolución de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración comprendida entre 0,08 M y 0,12 M y  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  a concentración comprendida entre 0,35 M y 0,50 M;
- preparación de una segunda disolución formada por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a concentración comprendida entre 0,10 M y 0,15 M con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M y un compuesto de flúor;
- 10 - mezcla bajo agitación de las dos disoluciones preparadas en las etapas anteriores en proporción 1:1 v/v a pH comprendido entre 8,3 y 8,7 a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo inferior a 2 minutos;
- tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura;
- liofilización del precipitado húmedo.
- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las concentraciones de los reactivos utilizados para la primera disolución son 0,1 M para el  $\text{CaCl}_2$  y 0,4 M para el  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .
- 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque las concentraciones utilizadas para la segunda disolución son 0,12 M para el  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,2 M para el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- 20 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto de flúor se selecciona entre  $\text{CaF}_2$ , NaF y KF y se añade a una concentración comprendida entre 0,01 M y 0,1 M.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el compuesto de flúor es  $\text{CaF}_2$  que se añade a una concentración de 0,05 M.
- 25 6.- Nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor obtenidas mediante un procedimiento según se define en las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas porque presentan forma esférica y tamaño comprendido entre 30 y 80 nm, medido por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y unos contenidos de Na, Ca, P, citrato, carbonato, fluoruro y agua comprendidos entre:
- 30 - entre 3,1% y 3,5% en peso de Na
- entre 27,0 % y 27,4% en peso de Ca
- entre 37,0% y 37,8% en peso de P
- entre 3,5% y 5,0% en peso de citrato
- 35 - entre 5,4 % y 7,0% en peso de carbonato
- entre 6,0% y 10,0% en peso de agua
- entre 2,0% y 5,0% en peso de fluoruro
- 40 7.- Nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, para uso como transportadoras de biomoléculas, fármacos o ambos.
- 8.- Nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, para uso como biomateriales en aplicaciones ortopédicas.
- 45 9.- Nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, para uso para aplicaciones en odontología.
- 10.- Nanopartículas, según se definen en la reivindicación 9, para uso como material para preparar cementos para relleno, sellado o ambas operaciones en endodencias y reparaciones dentales.
- 50 11.- Nanopartículas, según se definen en la reivindicación 9, para uso como componente de pastas dentífricas, gomas de mascar, enjuagues bucales, barnices de flúor y geles para favorecer la remineralización del esmalte mediante la liberación gradual de iones calcio, fosfato y flúor.

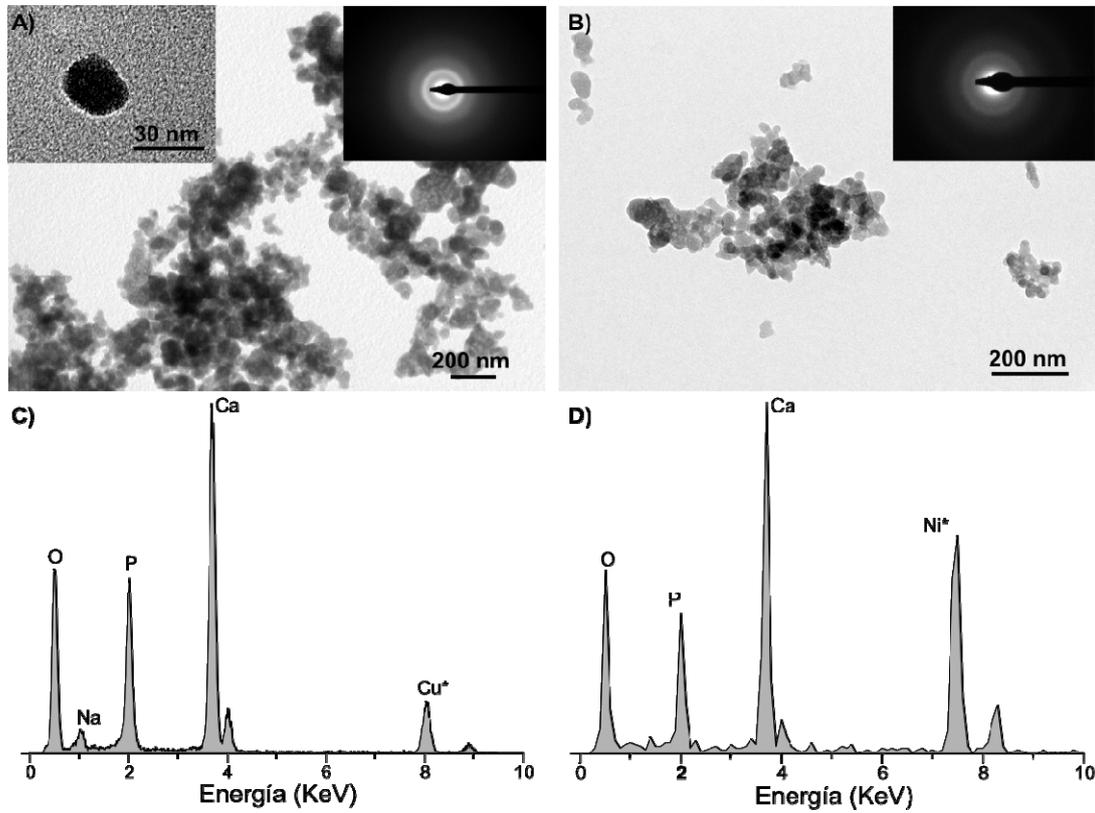


FIG. 1

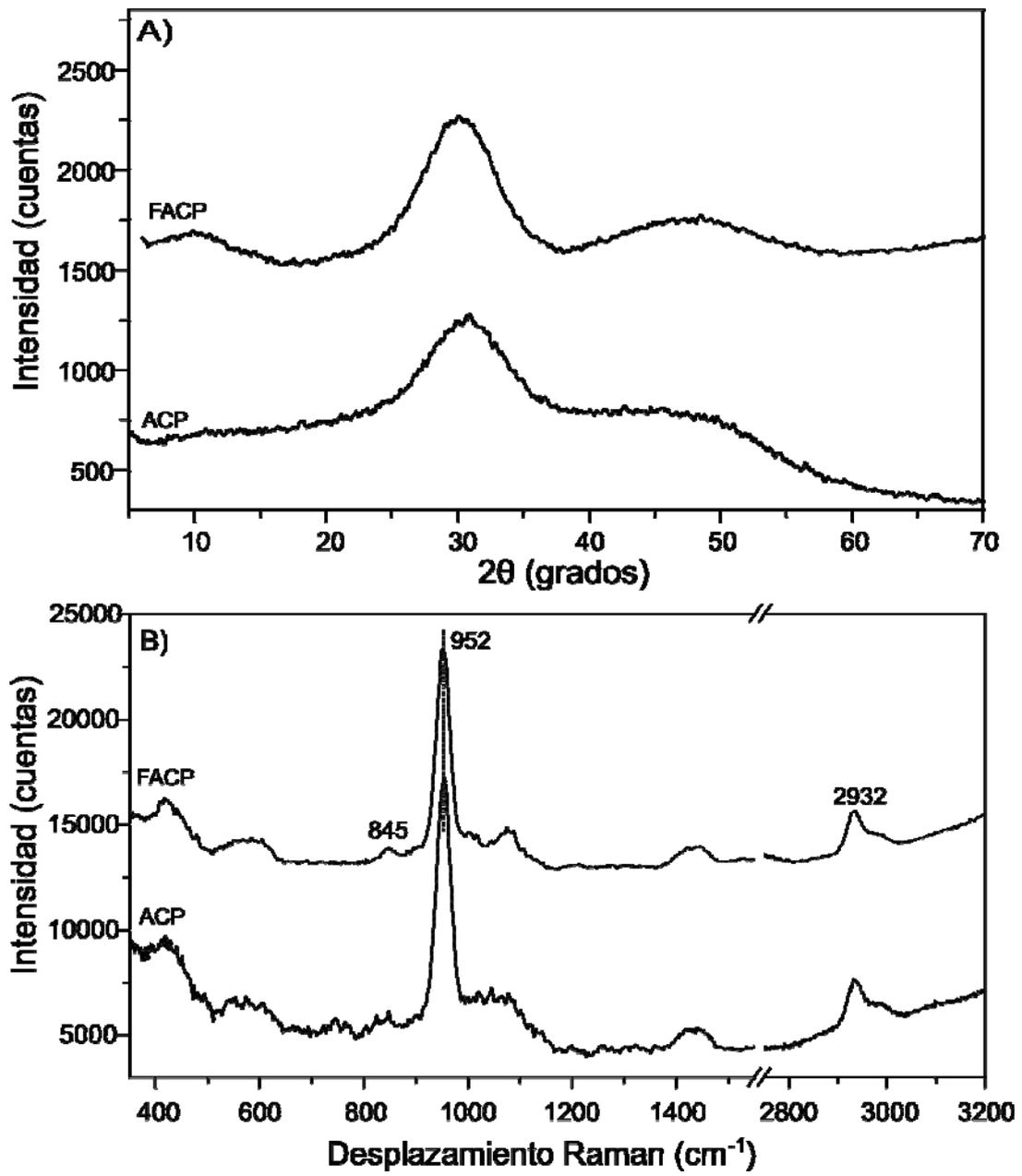


FIG. 2

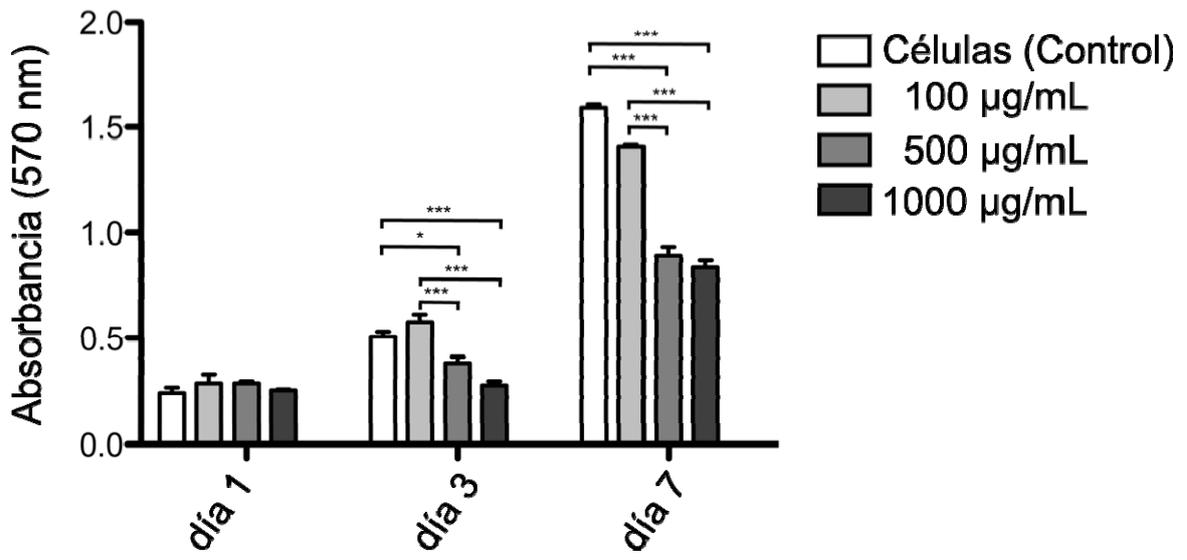


FIG. 3