



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GENERAL**

**“SÍNTESIS DE LA NANOHIPOXANTINA POR  
PRECIPITACIÓN, DOPADA AL 0.002% CON  
CALCITRIOL Y SU  
CARACTERIZACIÓN”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**p.Q.F.B. ELIZABETH MUÑOZ PEDRAZA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**M. C. JOSÉ GENARO CARMONA GUTIÉRREZ**

**Departamento de Química General FCQ Buap**

**PUEBLA, PUE.**

**DICIEMBRE 2014**

## ÍNDICE

Contenido	Paginas
<b>I.-Agradecimientos</b>	
<b>II.-Abreviaturas</b>	
<b>1.-Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2.-Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2.1.-La HAh en la calcificación ósea</b>	<b>3</b>
<b>2.2.-Hidroxiapatita sintética (HAs)</b>	<b>4</b>
<b>2.3.-Métodos de Síntesis</b>	<b>5</b>
<b>2.4.-Método de precipitación</b>	<b>5</b>
<b>2.5.-Aplicaciones de HAs</b>	<b>6</b>
<b>2.6.-Vitamina D</b>	<b>6</b>
<b>2.7.-Calcitriol</b>	<b>8</b>
<b>2.8.-Funciones de la vitamina D</b>	<b>8</b>
<b>2.9.-Propiedades fisicoquímicas de la vitamina D</b>	<b>8</b>
<b>2.10.-Relación HAh/ Vitamina D</b>	<b>9</b>
<b>3.-Planteamiento del problema</b>	<b>9</b>
<b>4.-Justificación</b>	<b>9</b>
<b>5.-Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>6.-Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>6.1.-Objetivo general</b>	<b>10</b>
<b>6.2.-Objetivos particulares</b>	<b>10</b>
<b>7.-Parte experimental</b>	<b>11</b>
<b>7.1.-Síntesis de hidroxiapatita (Hs)</b>	<b>11</b>
<b>7.2.-Procedimiento experimental del dopaje de hidroxiapatita con calcitriol</b>	<b>12</b>
<b>8.-Caracterización de Hs</b>	<b>12</b>
<b>9.-Descripción del fundamento de los métodos de caracterización</b>	<b>14</b>
<b>9.1.-Termogravimetría</b>	<b>14</b>
<b>9.2.-Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)</b>	<b>14</b>
<b>9.3.-Difracción de rayos X (DRX)</b>	<b>15</b>
<b>9.4.-Isotermas de adsorción</b>	<b>15</b>
<b>9.5.-Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</b>	<b>18</b>

<b>9.6.-Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)</b>	<b>19</b>
<b>10.-Resultados</b>	<b>20</b>
<b>10.1.-Rendimiento experimental</b>	<b>20</b>
<b>10.2.-TGA y DSC</b>	<b>20</b>
<b>10.3.-Difracción de Rayos X</b>	<b>21</b>
<b>10.4.-Isotermas de Adsorción</b>	<b>23</b>
<b>10.5.-F-TIR</b>	<b>25</b>
<b>10.6.-MEB:</b>	<b>28</b>
<b>11.-Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>12.-Perspectivas</b>	<b>35</b>
<b>13.-Bibliografía</b>	<b>36</b>
<b>14.-Anexos</b>	<b>40</b>

## **Agradecimientos**

**A Dios... Quien me ayuda, me hace fuerte y me sustenta Aquel que me regalo la vida y a tan excelentes Padres a Él gracias por permitirme llegar a este momento.**

**Papi, Mami... Nunca alcanzaran las palabras para agradecerle a Dios por su vida y su existencia, por darme el privilegio y la alegría de tener como Papá y Mamá a unos seres hermosos brillantes y excelentes como ustedes. Gracias por sus palabras de aliento, ayuda, comprensión, por reír y llorar conmigo, por guiarme y acompañarme en el camino, por darme todo cuanto han podido, por ver por mí antes que por ustedes y por amarme como me aman.**

**A mis hermanos... Por su apoyo, por ser parte de mi vida, por su cariño, por escucharme y por compartir tristezas y alegrías.**

**A mis amigos incondicionales que estuvieron a mi lado para apoyarme en mis momentos de debilidad; entre ellos compañeros de la licenciatura que me ofrecieron su amistad con quienes compartí una vida universitaria amena, divertida e inolvidable.**

**Al M.C José Genaro Carmona Gutiérrez y al Dr. José Albino Moreno Rodríguez por darme la oportunidad, el apoyo, sus consejos y compartirme sus conocimientos.**

**A los miembros del jurado por su colaboración y aporte intelectual.**

**Al Dr. Ricardo y miembros de CUV por su valiosa ayuda y orientación.**

**A la Facultad de Ciencias Químicas por el aporte intelectual y social.**

**Elizabeth Muñoz Pedraza**

## **Abreviaturas**

**Å:** Angstroms.

**Cte.:** Constante

**BET:** S.Brunauer. P. Emmett y E. Teller es la isoterma más usada para analizar la adsorción en multicapas.

**BJH:** Barrett-Joyner-Hallenda método matemático que muestra la distribución de tamaño de poro de un adsorbente.

**DSC:** Calorimetría diferencial de barrido.

**DRX:** Difracción de rayos X.

**F-TIR:** Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier.

**HAh:** Hidroxiapatita encontrada en la matriz inorgánica del hueso.

**HAs:** Hidroxiapatita sintética o comercial.

**Hs:** Hidroxiapatita sintetizada en el presente trabajo, por método de precipitación.

**MEB:** Microscopia electrónica de Barrido.

**PTH:** Hormona paratiroidea o parathormona.

**TGA:** Análisis termogravimétrico.

## 1. RESUMEN

La hidroxiapatita sintética (HAs) es un biomaterial muy usado en diversas aplicaciones en medicina. Una de las rutas más económicas y de mayor aplicación industrial para la síntesis de este material es la precipitación. En el presente trabajo se sintetizó hidroxiapatita (Hs) mediante la ruta de precipitación, utilizando como precursores óxido de calcio, ácido fosfórico, agua desionizada e hidróxido de amonio. Para incrementar la pureza de la biocerámica sintetizada se requirió someterla a tratamientos térmicos, los cuales fueron decididos en base a un análisis por TGA y DSC, teniendo como resultado que a 200, 650 y 750°C, por otro lado para determinar si la Hs era óptima para el dopaje con calcitriol, se tomó una muestra luego del primer tratamiento y fue analizada por Isotermas de adsorción para conocer el diámetro de sus poros, obteniéndose un diámetro promedio de 26.08 nm, que corresponde a un adsorbente de tipo mesoporoso, considerando esto, se tomaron 2g de Hs después de cada tratamiento y se dopó con 0.4 mL de calcitriol, finalmente fueron evaluadas las 6 muestras de la Hs inicialmente sintetizada; 2 por cada tratamiento una con Hs sin dopar y la otra después del dopaje, se caracterizaron por: DRX, FT-IR, y MEB. Mediante la caracterización de las muestras tratadas a diferentes temperaturas con y sin calcitriol, se concluye que el método de precipitación permite sintetizar este material con un alto rendimiento. Se confirmó que la molécula de calcitriol se incorporó en los cristales de Hs.

## 2. INTRODUCCIÓN

(Aspectos históricos, científicos y sociales)

El hueso es un tejido conectivo mineralizado, de composición heterogénea y estructura compleja, dinámico y vascularizado, en el que se pueden diferenciar los siguientes componentes, una matriz orgánica constituida mayoritariamente por colágeno que le otorga una fuerza tensil, una matriz inorgánica formada fundamentalmente por cristales de calcio y fosfato, y el componente celular que representa el 2% de la materia orgánica del hueso.

La matriz orgánica representa del 30 al 35% del volumen total del hueso. Está constituida mayoritariamente por colágeno 95%. El restante 5% está formado por la denominada sustancia fundamental, que contiene líquido extracelular y proteínas óseas no colágenas, sintetizadas por osteoblastos. Entre éstas, se encuentran: glicoproteínas, proteoglicanos, proteínas con ácido gama-carboxiglutámico, factores de crecimiento y proteínas morfogénicas del hueso <sup>(1)</sup>.

La matriz inorgánica (mineral) representa del 65 al 70% del volumen total del hueso. Está formada mayoritariamente por sales de calcio y fosfato, organizadas en forma de cristales de fosfatos básico de calcio e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y además pueden encontrarse en baja proporción iones como magnesio, sodio, potasio entre otros.

Esta matriz ósea además de proporcionar el soporte estructural, movimiento, sostén y de proteger los órganos internos, representa el principal reservorio de los siguientes minerales en el organismo, constituyendo el 99% del calcio el 80% del fosfato y el 35% del magnesio del contenido total del cuerpo <sup>(2)</sup>.

Con respecto a la matriz inorgánica del hueso, la hidroxiapatita (HAh) mostrada en la figura 1, es el principal componente y constituye casi la totalidad de la porción mineral; en los vertebrados, también la encontramos en la dentina y el esmalte dental, en forma de sal <sup>(3)</sup>. La HAh normaliza a través del calcio sérico el nivel de parathormona, lo que a su vez favorece una

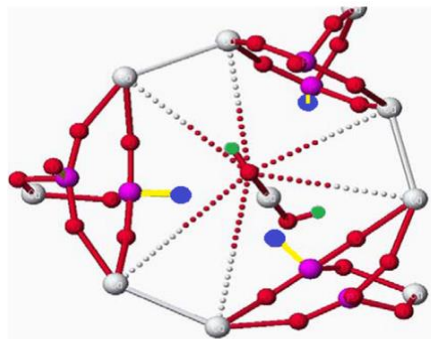


Fig. 1 Cristal de Hidroxiapatita (HAh), las tres moléculas de fosfato de calcio se encuentran unidas a una molécula de hidróxido de calcio por fuerzas intermoleculares. (Calcio- color blanco, Fosforo-rosa, Oxígeno- rojo, Hidrógeno- verde, Hidroxilos-morado.)

reducción de la resorción ósea y al mismo tiempo provee al esqueleto de las sustancias minerales necesarias, especialmente calcio y fósforo <sup>(4)</sup>.

**2.1 La HAh en la calcificación ósea:** La mayor parte del hueso se forma a partir de una base de cartílago (véase figura 2) que se calcifica y después se osifica para formar hueso verdadero. En la fase inicial de formación del hueso se da la secreción de moléculas de colágeno (llamadas monómeros de colágeno) y de sustancia fundamental (principalmente proteoglicanos) por los osteoblastos. Los monómeros se polimerizan rápidamente y forman las fibras de colágeno, el tejido resultante se convierte en "osteoides" material parecido al cartílago pero que difiere de este porque precipitan en él las sales de calcio. A medida que se forma el osteoide algunos osteoblastos quedan atrapados en el mismo y entonces se llaman osteocitos. Pocos días después en el osteoide se empiezan a precipitar las sales de calcio sobre las fibras colágenas, hasta formar los cristales de HAh. Las sales de calcio que se depositan primero, no son cristales de HAh, sino compuestos amorfos probablemente una mezcla de sales y después de un proceso de sustitución, adición de átomos, resorción y nueva precipitación, estas sales se convierten en cristales de HAh en un período de semanas o meses. Un pequeño porcentaje de sales sigue en forma amorfa y estas son las que pueden absorberse rápidamente cuando existe una necesidad adicional de calcio en el líquido extracelular.

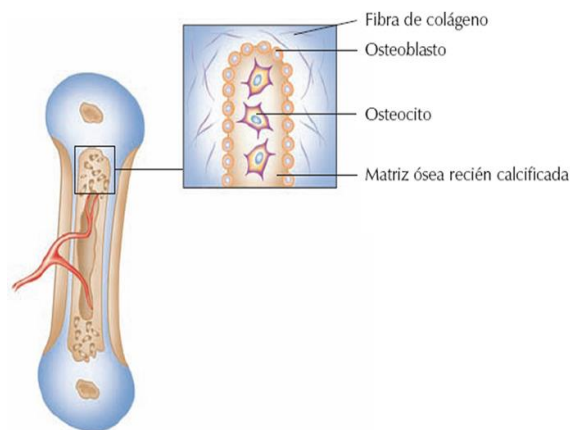


Fig.2 Calcificación del cartílago.

Cada fibra de colágeno del hueso compacto está compuesta por segmentos que se repiten con una periodicidad de 640 Å en toda su longitud. Los cristales de HAh reposan sobre cada segmento de la fibra y están estrechamente ligados a ella. Los segmentos de las

fibras de colágeno se superponen entre sí, lo que hace que los cristales de HAh se dispongan como ladrillos en una pared. Cada cristal es de unos de 400 Å de largo, 10 a 3 Å de espesor y 100 Å de ancho. La relación relativa entre el calcio y el fósforo puede variar notablemente según las diferentes condiciones nutricionales, siendo la relación potencial Ca/P de 1.667. En las sales óseas también existen iones de magnesio, sodio, potasio, carbonato, etc. y estos iones tienen la capacidad de conjugarse con los cristales del hueso <sup>(1)</sup>. Debido a la participación de este componente inorgánico (HAh) en la calcificación ósea, se ha buscado su obtención de forma sintética.

**2.2 Hidroxiapatita sintética (HAs):** La hidroxiapatita sintética es uno de los materiales más atractivos para la sustitución de tejido óseo debido a la similitud en composición y estructura con el principal mineral constituyente de dientes y huesos de animales vertebrados, lo cual la hace biocompatible con el tejido humano <sup>(1,5)</sup>.

El estudio de la HAs se ha realizado desde hace varias décadas; Aaron y Posner (1958) propusieron su estructura cristalina a partir del análisis de un monocristal <sup>(3)</sup>. El carácter iónico de la HAs la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor de 1500°C. La relación manejada entre Ca/P en HAs es 10:6 (1.6667), su densidad calculada es de 3.219 g/cm<sup>3</sup> y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de manufactura <sup>(6)</sup>.

Los materiales en polvo de HAs pueden obtenerse a partir de diversas fuentes de calcio y fósforo empleando variados métodos. Este fosfato de calcio, se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos <sup>(7,8)</sup>.

El comportamiento biológico de la cerámica HAs depende de muchos factores, en particular, en su composición química, fases, microestructura, tamaño de poro y el volumen de poro <sup>(9)</sup>.

La HAs tiene buen potencial que puede ser aplicado, esta biocerámica es biocompatible, tiene propiedades que se asemejan a los tejidos duros en el hueso humano y lo más

importante que es un material activo es decir que se puede reproducir como lo demuestran varias investigaciones.

Actualmente la HAs ha surgido como un material importante en la industria de la salud, debido a las propiedades especiales como tamaño de partícula pequeño, gran superficie específica y baja densidad. Se ha utilizado como sistema de liberación de proteínas, dispositivos de administración de fármacos y portador de genes.

El análisis de incorporación de fármacos en biocerámicas cubre aspectos distintos, es necesario verificar que la adición del fármaco, incorporado en la fase líquida o en la fase sólida de la biocerámica, no interfiera en la reacción de precipitación, modificando sus propiedades fisicoquímicas, tanto a nivel de fraguado y endurecimiento como en cuanto a su comportamiento reológico.

**2.3 Métodos de Síntesis:** La mayoría de los estudios actuales están orientados a investigar distintas vías de síntesis para la obtención de HAs con tamaño de partícula controlado con el fin de lograr una fase bioactiva que pueda ser utilizada en combinación con otros materiales que carezcan de esta propiedad <sup>(10, 11)</sup>.

La resistencia mecánica de la HAs, depende del tamaño del grano, su distribución, porosidad y otros defectos microestructurales <sup>(12,13)</sup>. Los métodos más comúnmente, usados para producir HAs incluyen: El método de precipitación <sup>(14)</sup>, el químico-húmedo en solución acuosa <sup>(15)</sup>; el sol-gel <sup>(16, 17)</sup>; el hidrotermal <sup>(18)</sup>; la deposición térmica <sup>(15)</sup> y el método de reacción en estado sólido (mecanoquímica). En este trabajo el método de precipitación fue a través del cual se llevó a cabo la síntesis.

**2.4 Método de precipitación:** La precipitación es la formación de una nueva fase a partir de una fase aparentemente homogénea. Se puede considerar como un proceso de cristalización rápida, tal que la rapidez del proceso está determinada por la alta sobresaturación a la que ocurre. Es por esto que muchas de las características de las partículas precipitadas están determinadas, principalmente, por la relación entre la concentración inicial de los reactivos y la solubilidad del soluto que se va formando. Este método se caracteriza por su simplicidad, bajo costo y aplicación a nivel industrial <sup>(19)</sup>. Además se obtienen cantidades apreciables del material de forma económica y fácilmente

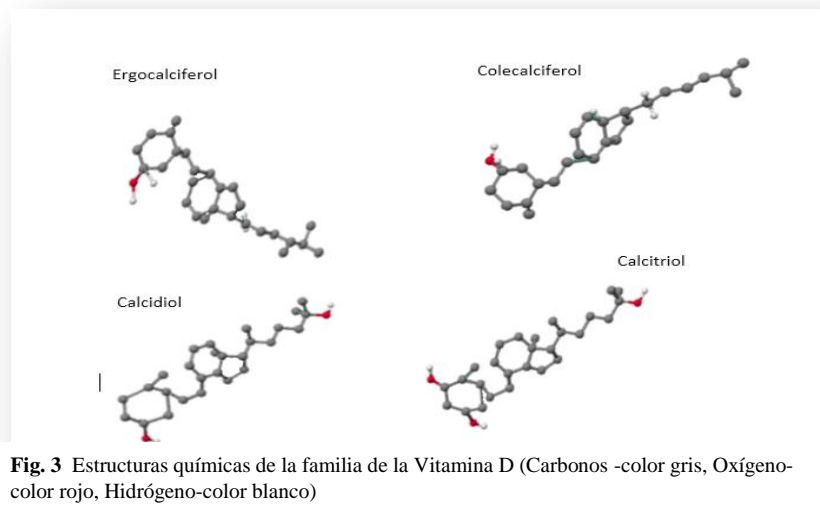
reproducibile. Sin embargo, se deben controlar el pH, la temperatura de reacción, el tiempo de la reacción, la atmósfera de tratamiento y la relación Ca/P de los reactivos, para impedir la aparición de otras fases como los ortofosfatos <sup>(20, 21)</sup>.

**2.5 Aplicaciones de HAs:** Las aplicaciones de la hidroxiapatita sintética son numerosas, las más comunes son, reparación de defectos óseos debido a que se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, para la reconstrucción del oído medio y reconstrucción maxilo facial [5], recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos, además se ha utilizado como relleno cromatográfico debido a su alta bioactividad y en particular de adsorción para diversos iones y moléculas orgánicas <sup>(8, 22,23)</sup>

Diversas investigaciones muestran que los materiales de HAs, cuando son utilizados en la restauración o sustitución de tejidos duros, resultan ser biocompatibles y bioactivos. Estas características y propiedades dieron lugar a que los materiales de HAs, en diferentes formas, sean utilizados en combinación con materiales poliméricos o metálicos para desarrollar una nueva línea de materiales compuestos <sup>(7)</sup>.

**2.6 VITAMINA D:** Es una vitamina liposoluble que además de ser un micronutriente esencial, se considera como una hormona involucrada en un complejo sistema endocrino que regula la homeostasis mineral, protege la integridad del esqueleto y modula el crecimiento y la diferenciación celular en una amplia variedad de tejidos <sup>(24)</sup>.

La forma natural de vitamina D en los animales y la forma que se sintetiza en la piel humana es el colecalciferol (vitamina D3). El ergocalciferol (vitamina D2) es un producto sintético derivado de la irradiación de esteroides de plantas (ergosterol) <sup>(25)</sup> (Figura 3).



En sentido estricto, la vitamina D más que una vitamina, es una prohormona, cuya configuración molecular es similar a la de los esteroides clásicos (cortisol, aldosterona, estradiol), ya que posee la estructura básica del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno <sup>(26)</sup>.

La vitamina D3 o colecalciferol se obtiene principalmente de dos fuentes básicas: la dieta (Principalmente pescados grasos, hígado de pollo y, en menor grado, huevos, mientras el contenido de vitamina D en la leche y derivados o carnes es bajo) y la producción endógena por conversión fotoquímica a partir de 7-dehidrocolesterol en la epidermis <sup>(27-30)</sup>. Esta síntesis endógena se induce por la exposición de la piel a los rayos ultravioleta B (UVB) de la luz solar (290 nm a 315 nm), que generan conversión fotolítica del 7-dehidrocolesterol a previtamina D3, lo cual es seguido por isomerización térmica no enzimática a vitamina D3 <sup>(31, 32)</sup>.

Por otro lado existen numerosos derivados de la vitamina D que desempeñan un papel particularmente importante a nivel metabólico. Los más importantes son: el calcidiol, el calcitriol y la 24,25-vitamina D3.

El Calcidiol: Tiene una mínima capacidad para unirse a los receptores de vitamina D y, por tanto, para tener una respuesta biológica eficaz. Sin embargo, su medida indica el estado nutricional de vitamina D en el organismo

**2.7 Calcitriol:** Desde el punto de vista biológico, la vitamina D es intrínsecamente inactiva y requiere hidroxilaciones sucesivas en hígado y riñón para formar el calcitriol, su forma biológicamente más activa. El calcitriol es diez veces más activo que la vitamina D3 y ejerce sus acciones, principalmente en intestino y hueso, controlando el metabolismo fosfocálcico. El calcitriol contribuye principalmente a la mineralización de la capa osteoide-matriz recientemente formada aún no calcificada; manteniendo la concentración extracelular de calcio y fosfato en los niveles adecuados que conducen al depósito de la hidroxiapatita cálcica en la matriz ósea. Se ha indicado que los valores de calcitriol pueden estar regulados por el calcio, magnesio, fósforo, PTH (parathormona o también denominada hormona paratiroidea), e incluso existe una autorregulación por él mismo. Concretamente, la concentración de calcio del espacio extracelular produce una modulación de la síntesis del calcitriol. Su efecto biológico principal es el de mantener los niveles séricos de calcio dentro de unos estrechos límites, lo cual es fundamental para salvaguardar la propia vida, aumentando la absorción intestinal de calcio y favoreciendo la formación de osteoclastos, quienes movilizan las reservas de calcio desde el esqueleto hacia la circulación <sup>(33)</sup>. Así como inhibe la mitogénesis de los linfocitos T y suprime la producción de interleucinas, así como de inmunoglobulinas y megacariocitos por lo que se le ha atribuido un efecto inmunorregulador <sup>(34, 35)</sup>.

**2.8 Funciones de la vitamina D:** Su función principal es mantener la concentración de calcio iónico dentro de límites normales en el líquido extracelular. Para cumplir este papel, la vitamina D estimula la absorción intestinal de calcio y promueve la formación de osteoclastos maduros, los cuales movilizarán calcio desde el hueso al extracelular en la fase de resorción ósea del remodelamiento óseo. Estas acciones son ejercidas principalmente por el 1,25-dihidroxitaminaD3 o calcitriol, cuya síntesis ocurre mayoritariamente a nivel renal a partir del 25-dihidroxitaminaD o calcidiol, metabolito hepático derivado de precursores cutáneos (colecalfiferol o D3) y nutricionales (ergocalciferol o D2) <sup>(36, 37)</sup>.

**2.9 Propiedades fisicoquímicas de la vitamina D:** La vitamina D se presenta bajo el aspecto de un polvo cristalino blanco amarillento, es fácilmente soluble en éter y cloroformo, ligeramente soluble en aceites y grasas e insoluble en agua. La vitamina D es sensible a la luz, al oxígeno y a los ácidos, degradándose rápidamente. Es una vitamina

liposoluble y relativamente termosensible, ya que en forma cristalizada es bastante estable al calor pero, por el contrario, en solución oleosa se isomeriza <sup>(33)</sup>.

### **2.10 Relación HAh/ Vitamina D:**

La calidad ósea mejora gracias a la vitamina D, por los siguientes mecanismos: disminuye la reabsorción ósea inducida por la PTH, aumenta la formación de hueso cortical, disminuye la porosidad cortical, aumenta el número y la función de osteoblastos a través de la inducción de factores de crecimiento óseo y de la síntesis de proteínas de la matriz ósea. Además, aumenta la resistencia a las fracturas y favorece la reparación de microfracturas, ya que sostiene la vitalidad y la función de los osteocitos <sup>(42)</sup>. Específicamente la 1,25-dihidroxitamina-D3 desencadena una mineralización ósea de forma indirecta por el aumento de la calcemia mientras la 24,25-dihidroxitamina-D3 parece actuar de forma directa sobre los osteoblastos <sup>(33)</sup>.

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad existen diversos problemas óseos tales como enfermedades de degeneración o fracturas en donde los fragmentos del hueso faltante son sustituidos con biomateriales que generan altos costos por lo que son poco accesibles a los pacientes. Por esto se busca un biomaterial que sea sintetizado a bajos costos y que posteriormente pueda utilizarse como vehículo farmacológico.

## **4. JUSTIFICACIÓN**

La búsqueda de materiales que puedan sustituir y añadirse a las diferentes partes del cuerpo humano hoy en día es imprescindible, esto con el objetivo de ofrecer una mejor calidad de vida a personas que sufren ciertos padecimientos crónicos. La ingeniería de tejidos ha desarrollado biomateriales para ser utilizados en el reemplazo de tejidos que se hayan perdido en el cuerpo humano, uno de estos es la hidroxiapatita sintética.

Actualmente la HAs ha surgido como un material sofisticado en la industria de la salud, debido a las propiedades especiales como tamaño de partícula pequeño, gran superficie específica y baja densidad. Se ha utilizado como sistema de liberación de proteínas, dispositivos de administración de fármacos y portador de genes.

La hidroxiapatita sintética es un material clasificado dentro de los biomateriales y en particular dentro de las biocerámicas, es bioinerte, bioactivo; es decir, que es un material que puede unirse directamente al hueso sin interposición de cápsula fibrosa.

El presente trabajo tiene el propósito de contribuir en el estudio y la investigación de la Hs que permita conocer si es posible impregnarle algún fármaco como la vitamina D que por sus propiedades puede regenerar el equilibrio de la fisiología del calcio, cuando este se rompe.

## **5. HIPÓTESIS**

La hidroxiapatita sintética es un material poroso y tiene la propiedad fisicoquímica de adsorber la molécula de calcitriol.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Síntesis de hidroxiapatita por método de precipitación, a partir de óxido de calcio, ácido fosfórico, agua desionizada e hidróxido de amonio e incorporar la molécula de calcitriol al compuesto sintetizado.

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Sintetizar hidroxiapatita (Hs) con una relación molar entre calcio y fósforo de 1.667 con un pH final de 10.5, por el método de precipitación.
2. Determinar el comportamiento del peso de la Hs al ser sometido a aumentos de temperatura mediante TGA y DSC.
3. Determinar el tamaño del diámetro del poro y su distribución, a través de un estudio de isothermas de adsorción-desorción.
4. Dopar la HA con calcitriol con una concentración de 0.002% utilizando etanol como solvente.
5. Analizar por difracción de rayos X la composición de la Hs sintetizada así como el tamaño y la forma de sus cristales.
6. Determinar los grupos funcionales de la Hs y los grupos funcionales de calcitriol, por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.

7. Determinar la morfología y el tamaño de los aglomerados de la Hs y de la Hs impregnada con calcitriol, por estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB) así como.

## **7. PARTE EXPERIMENTAL**

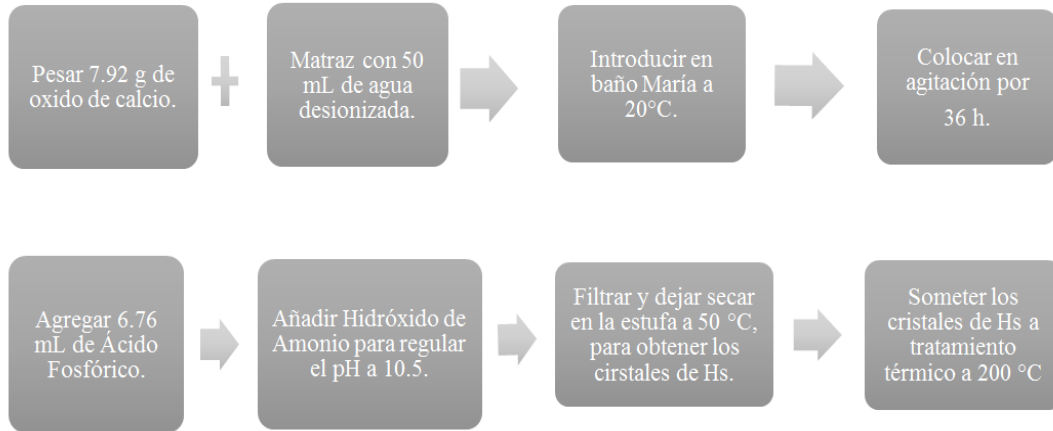
**7.1 Síntesis de Hidroxiapatita (Hs):** En una balanza analítica se pesó con precisión 7.962 g de polvo de CaO. Posteriormente se vertió en matraz de 200 mL, con 50 mL de agua desionizada y se agitó vigorosamente a una temperatura de 20° C durante 48 h, tiempo en el cual se formó una suspensión de Ca (OH)<sub>2</sub> con agua desionizada.

El matraz se cubrió con papel parafilm, con el fin de evitar la posible contaminación por contacto con la atmósfera, se mantuvo en baño María para mantener a 20 °C la temperatura de la reacción y bajo estas condiciones se dejó en reposo por 72 h.

Transcurrido este tiempo, se midió 6.76 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y se añadió por goteo, procurando que durante su agregación, la mezcla previa no tuviera contacto con la atmosfera, mientras tanto la reacción continuó en agitación vigorosa.

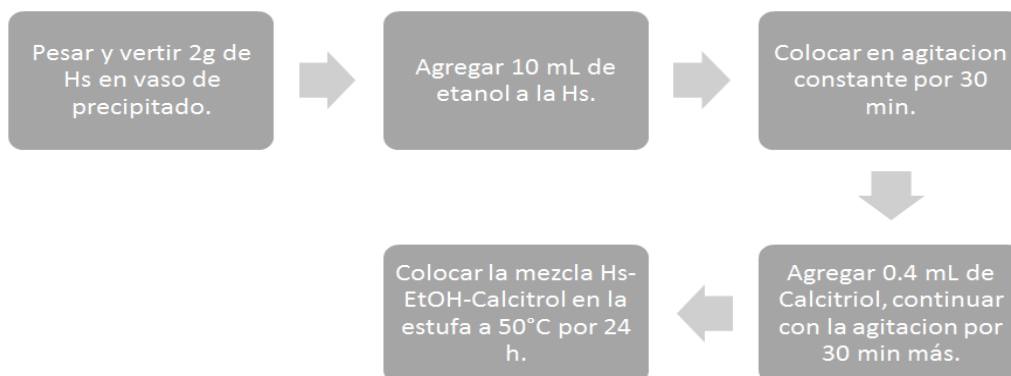
Una vez agregado el ácido fosfórico, se dejó reposar 24 h para ayudar a la etapa de maduración, así como se mantuvo la reacción alejada del CO<sub>2</sub> atmosférico.

Posteriormente se midió el pH de la solución y mediante la agregación de NH<sub>4</sub>OH por goteo y con agitación constante se llegó al pH deseado de 10.5, una vez obtenidos los cristales de hidroxiapatita, se hicieron 3 lavados con 50 mL de agua y se filtró por método tradicional con embudo y papel previamente pesado, finalmente se dejó en la estufa 50°C durante 24 h para evaporar el agua desionizada. Para el tratamiento térmico a 200 °C se introdujo los cristales de Hs en la estufa con la temperatura mencionada.



**Fig. 4** Descripción de la síntesis de cristales de Hs por método de precipitación.

**7.2 Procedimiento experimental del dopaje de Hidroxiapatita con calcitriol:** Una vez obtenida de hidroxiapatita se tomó una muestra de 2 g que fue pesada en una balanza analítica, posteriormente se vertieron en un vaso de precipitado de 50 mL, se disolvieron en 10 ml de etanol con agitación constante y se le agregó 0.4 mL al 0.002% de calcitriol con agitación constante durante 30 min. Posteriormente se colocó en la estufa a 50°C durante 24 horas para evaporar el etanol de los cristales. Obtenidos los cristales dopados con calcitriol se procedió a su caracterización (ver diagrama en la figura 5).



**Fig. 5** Descripción del proceso de dopaje de Hs con calcitriol, en etanol.

**8. CARACTERIZACIÓN:** Los cristales sintetizados de Hs con tratamiento térmico a 200°C fueron analizados por métodos espectrofotométricos (F-TIR y DRX), fenómenos de superficie (Isotermas de adsorción) y por Microscopía electrónica de barrido.

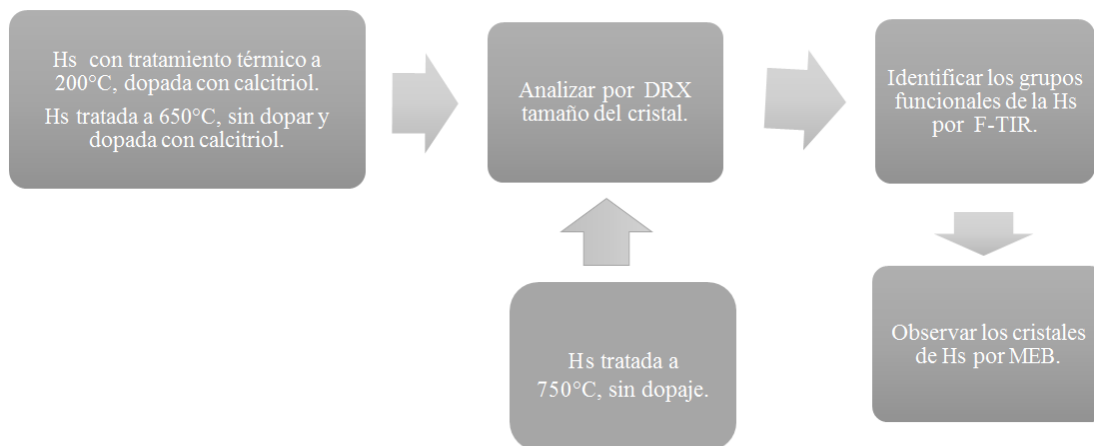
La caracterización fue realizada en varias fases de acuerdo a los diferentes métodos mencionados.

Se inició con el análisis por TGA y DSC para conocer el cambio de peso de la Hs con respecto a la temperatura. Posterior a ello se determinó el tamaño del cristal y la ubicación de los átomos que conforman la Hs, para confirmar que el compuesto sintetizado se trató de Hs se identificó los grupos funcionales por F-TIR; antes de realizar el dopaje de la Hs fue necesario conocer el diámetro de sus poros por lo que esto se determinó por Isotermas de adsorción y finalmente los cristales de Hs se visualizaron por Microscopia electrónica de barrido método que ayudaría a conocer la proporción de Calcio/Fosforo de los cristales sintetizados de forma sintetizada puede apreciarse el proceso descrito en la figura 6.



**Fig. 6** Descripción del proceso de análisis de las propiedades de la Hs, luego ser sometida a tratamiento térmico a 200°C

La Hs tratada a 200 °C dopada con Calcitriol fue analizada por DRX, F-TIR, y MEB métodos por los cuales se confirmó la presencia del calcitriol en los cristales de Hs. En Las muestras de Hs con tratamiento a 650°C, dopadas y sin dopar fueron analizadas por F-TIR y DRX para analizar la presencia de Hs y de Calcitriol, finalmente la Hs con tratamiento térmico a 750°C sin dopaje solo fue analizada solo por DRX (figura 7).



**Fig. 7** Caracterización de los cristales de Hs con tratamiento térmico a 200°C (con dopaje con calcitriol), 650°C (previos al dopaje y dopados) y a 750°C (sin dopaje) por diferentes métodos.

## 9. DESCRIPCIÓN DEL FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

**9.1 Termogravimetría:** La TGA se define como la técnica que mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura, mientras ésta se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica.

El programa de Temperatura puede ser mantener la Temperatura cte. (isotermo), calentamiento a velocidad cte. (el más habitual junto al isotermo), enfriamiento o cualquier combinación de ellos. Lo habitual es que se produzca una pérdida de peso pero también es posible que haya una ganancia de peso. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado (también se emplean condiciones de presión reducida).

Una característica fundamental de la TG es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, etc.

**9.2 Calorimetría Diferencial de Barrido:** Técnica de análisis químico que mide transiciones, tanto endotérmicas como exotérmicas, como función de la temperatura. Es una técnica cuantitativa que permite obtener información de la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y del calor involucrado en el proceso.

Permitiendo así determinar la cantidad de calor que adsorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperatura.

**9.3 Difracción de rayos X:** Es una técnica que sirve para determinar la estructura detallada de un material, es decir, permite conocer la posición que ocupan los átomos, iones o moléculas que lo forman. Debido a este ordenamiento podemos determinar propiedades tanto físicas como químicas de los materiales.

Los rayos-X son un tipo de radiación electromagnética que tiene una alta energía y longitudes de onda muy cortas, las longitudes de onda son del orden de espacios atómicos de los sólidos. Cuando un haz de rayos-X incide sobre un material sólido, una porción de este rayo se dispersará en todas las direcciones por los electrones asociados a cada átomo o ion que está dentro del camino del haz.

**9.4 Isotermas de adsorción:** Una isoterma de adsorción es la representación de la relación, en el equilibrio, entre la cantidad adsorbida y la presión del gas a una temperatura constante.

Mediante la adsorción, las moléculas de un soluto se concentran en una superficie sólida por la acción de fuerzas intermoleculares entre el soluto y el sólido. Debido a estas fuerzas el fenómeno es fácilmente reversible. La adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie.

Las isotermas nos permiten estimar el grado de purificación que puede ser alcanzado, la cantidad de adsorbente requerido, y la sensibilidad del proceso respecto a la concentración del producto.

La isoterma de adsorción proporciona resultados de la adsorción física controlada de un gas o vapor de un soluto de una solución en un carbón activado. Este proceso de adsorción física es la forma en que el adsorbato (gas, vapor o soluto) entra en la porosidad. La estrecha proximidad de los átomos de carbono entre sí, constituyen la frontera o de la superficie de la porosidad, los resultados de estas moléculas de gas adsorbato deben ser "retenido" dentro de la porosidad. La "retención" es el resultado de una mayor fuerza de

van-der-Waals (fuerzas de dispersión) de la porosidad. Este proceso de adsorción física es sumamente dinámico.

Es evidente que la cantidad adsorbida de un gas por un sólido depende de la temperatura y presión, así como de la naturaleza del gas y del sólido. Por tanto, para un sistema dado, a una temperatura constante, la variación de la cantidad adsorbida con la presión constituye una isoterma de adsorción. Las isotermas de adsorción no presentan siempre la misma forma ya que existen apreciables diferencias en los calores de adsorción de distintos adsorbentes para un adsorbato dado, lo que significa que la forma de la isoterma es altamente dependiente de la naturaleza del adsorbente es decir de su porosidad.

Sí un determinado sólido es mesoporoso, la condensación capilar se producirá a presiones relativas medias o altas de la isoterma de adsorción, mientras que si es microporoso el llenado de los poros se producirá a bajas presiones. Esta es la razón fundamental por la que la forma de la isoterma de adsorción puede proporcionar información acerca de los procesos que tienen lugar en la interfase sólido-adsorbato. Las isotermas son parte esencial para modelar la adsorción y por lo tanto para el diseño, cálculo de eficiencias y costos de la adsorción.

Se han propuesto muchas clasificaciones de las isotermas de adsorción, pero la que es aceptada en la actualidad como más adecuada es la propuesta por Brunauer, Deming, Deming y Teller (BDDT), que distingue 5 tipos de isotermas, si bien se incluye, además, un sexto tipo que ha sido identificado en los últimos años. Los seis tipos de isotermas de adsorción se dan en la Figura 2.3. Se analizarán cada uno de ellos por separado, indicando los procesos fundamentales diferenciadores que se presentan en cada caso:

- a) Tipo I o tipo Langmuir.- Es característico de procesos en los que se produce el llenado de los microporos. Su interpretación se contempla fundamentalmente desde el punto de vista de la teoría potencial de Polanyi-Dubinin.
- b) Tipo II.- Es característico de procesos de adsorción en sólidos no porosos o macroporosos. Representa el caso de adsorción en mono-multicapa, cuyo estudio queda perfectamente definido mediante el modelo B.E.T. Es característico el llamado punto B, que indica el momento en el que se completa la monocapa. Un ejemplo típico de este grupo lo constituyen los grafitos no porosos y muchos carbón black.

- c) Tipo III.- Es característico de procesos de adsorción en sólidos no porosos en los que la interacción adsorbente-adsorbato es débil, por lo que no se forma el codo de las isothermas tipo II ni se puede definir el punto B. El estudio de estos procesos es bastante difícil, debido a que no existe prácticamente una interacción superficial sólido-gas. Ejemplos típicos son muchos óxidos metálicos.
- d) Tipo IV.- Se caracteriza por la presencia de ciclos de histéresis. Su parte inicial es semejante a la de la isoterma tipo II, pero a presiones medias comienza la condensación capilar en mesoporos. A partir de la rama de resorción de estas isothermas se puede determinar la distribución de tamaños de los poros. Las sílices y alúminas son ejemplos representativos.
- e) Tipo V.- Son poco comunes y las de más difícil interpretación. La afinidad del adsorbente (poroso en este caso, en contraste con el tipo III) por el adsorbato es baja y la histéresis enlaza con el llenado de los poros; además, nunca se obtienen superficies específicas, ni de distribuciones de tamaños de poros que sean fiables. Es típica de la adsorción de vapor de agua por carbones a temperaturas cercanas a la ambiente
- f) Tipo VI.- Es característico de la adsorción en multicapa de gases nobles sobre superficies altamente uniformes. Cada una de las primeras capas se adsorbe dentro de un cierto rango de presiones correspondiendo cada escalón al llenado de una capa, hasta un total de 2 o 3 capas. Se trata de procesos de adsorción cooperativos que contribuyen a que cada capa actúe positivamente a la formación de la siguiente mediante interacciones laterales de las propias moléculas. Son poco comunes, entre otras razones, porque la gran mayoría de los adsorbentes utilizados suelen ser heterogéneos.

Se produce histéresis de adsorción cuando las curvas de adsorción y desorción no coinciden. La relación, a temperatura constante, entre la cantidad adsorbida y la presión de equilibrio del gas se conoce como isoterma de adsorción.

Muchos adsorbentes de área superficial son porosos, en el contexto de la fisisorción, conviene clasificar los poros de acuerdo a sus tamaños:

- Los poros cuya anchura excede de unos 50 nm ( $> 500 \text{ \AA}$ ) se llaman macroporos
- Los poros cuya anchura está comprendida entre 2 nm y 50 nm (20-500  $\text{\AA}$ ) se llaman mesoporos.
- Los poros cuya anchura no excede e unos 2 nm ( $<20 \text{ \AA}$ ) se llaman microporos.

Este análisis nos ayudara a determinar la textura del material y el diámetro del poro por técnica de isoterma de adsorción de  $\text{N}_2$ .

### **9.5 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):**

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión, de bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de los grupos funcionales de sus constituyentes, sustancias inorgánicas u orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales. Mediante el IR serán observados los grupos funcionales de la Hs.

Los espectros FT-IR nos permitirán analizar, a través de picos característicos en la muestra de hidroxiapatita la presencia de algún fosfato de calcio amorfo.

Los instrumentos IR de transformada de Fourier no contienen elementos de dispersión y permiten detectar y medir todas las longitudes de onda simultáneamente. En lugar de monocromador, se utiliza un interferómetro para producir patrones de interferencia que contienen la información espectral infrarroja. Los mismos tipos de fuentes se utilizan en los instrumentos dispersivos se pueden utilizar en los espectrómetros FTIR. Para calcular la energía radiante en función de la longitud de onda, el interferómetro modula la señal de la fuente de manera que se pueda descifrar por la técnica matemática de transformadas de Fourier.

Para obtener el espectro de una muestra, primero se obtiene el espectro del fondo mediante la transformada de Fourier del interferograma que proviene de dicho fondo (disolvente, agua del ambiente y dióxido de carbono). A continuación se obtiene el espectrómetro de la muestra. Finalmente se calcula la relación entre el espectro de la

muestra con haz sencillo, y el espectro del fondo y se traza la gráfica de la Absorbancia o de la transmitancia frente a la longitud de onda o el número de onda.

El estudio de las muestras por Infrarrojos es un complemento al estudio de difracción de rayos X.

**9.6 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB):** El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del MEB son la alta resolución ( $\sim 100\text{\AA}$ ), la gran profundidad de campo que resuelve una imagen tridimensional de la muestra y la relativa sencillez de preparación de las muestras.

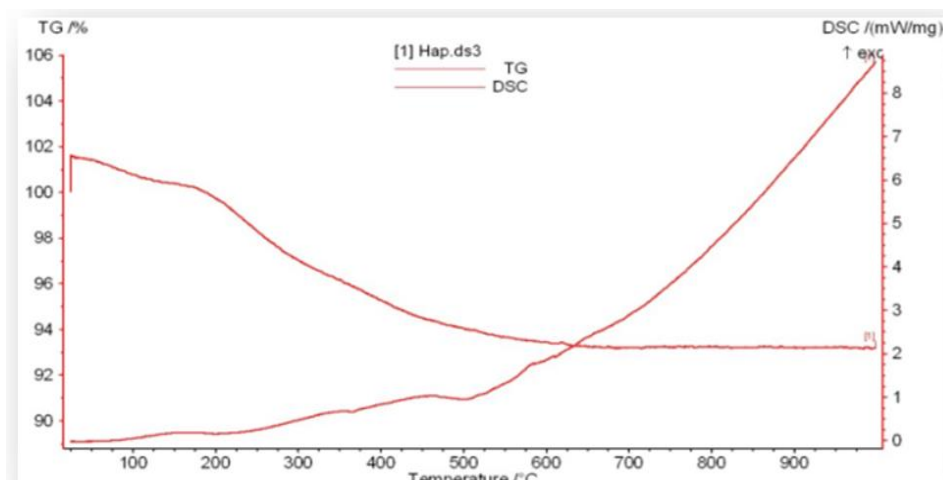
## 10. RESULTADOS

**10.1 Rendimiento experimental:** El rendimiento teórico de hidroxiapatita fue de 14.262 g mientras que el rendimiento experimental de 11.5 g por tanto el porcentaje del rendimiento fue del 80% (Observar imágenes de los polvos de HA por microscopia en anexos.)

### 10.2 TGA y DSC

El Análisis Termogravimétrico, TG, y la Calorimetría Diferencial de Barrido, DSC, de las muestras sintetizadas se determinaron en el rango de temperatura de 25°C a 1000°C, el calentamiento fue a velocidad constante.

Mediante el ensayo de TG, que aparece en la figura 8 se determinó que al llegar a una temperatura de 176°C la Hs perdió un 1.33% de peso, mientras que la DSC observada en el termograma de la Fig. 17 mostro un comportamiento exotérmico del material, ambos parámetros se asignan a una pérdida de agua, al incrementar la temperatura, en DSC se observó un comportamiento endotérmico de nuestro material a una temperatura de 368°C con un 4.39% de pérdida de masa revelado en la TG, correspondiente probablemente a grupos carbonatos. A 500°C se pudo observar nuevamente un comportamiento endotérmico (DSC) con una pérdida de 1.88% de la masa (TG) del material liberando probablemente moléculas de CO<sub>2</sub> que es el resultado de la descomposición de los carbonatos. A partir de los 631°C el peso de la Hs se mantuvo constante hasta incrementar la temperatura a 1000°C, debido a que ya no se liberaron más compuestos con el aumento de temperatura, el análisis nos permite deducir que aún no se detecta su punto de fusión por abajo de los 1000°C.



**Fig. 8** El Termograma presenta los resultados del análisis por Termogravimetría y Calorimetría diferencial de barrido de la Hs sin tratamiento térmico.

### 10.3 Difracción de Rayos X

La difracción de Rayos X se utilizó con el propósito de corroborar que los productos de síntesis fueran los deseados, en este caso la Hs el difractograma obtenido fue comparado con otros espectros de muestras de hidroxiapatita y se encontró similitud con la ficha de datos 01-074-0566 (A) – Hydroxylapatite.

En la figura 9 se presenta el difractograma de la muestra de Hs tratada a 200°C, que mostro los siguientes angulos: 26°, 31.8° 39.9° 49.7 y 53.3° a 2 teta; estas reflexiones fueron comparadas con las de la base de datos del Cuv y se encontró similitud con las reflexiones de una ficha de Hidroxiapatita reportada (HAs), demostrándose que el material sintetizado (Hs) es Hidroxiapatita, además el difractograma da a conocer el acomodo molecular de los cristales de Hs en este caso de forma hexagonal tal como la HAs y aunque también hay presencia de fosfatos de calcio libres como la withlockita, este es un precursor del compuesto sintetizado que corresponde a otra fase cristalina.

En cuanto al tamaño del cristal se calculó por la ecuación de Scherrer dando un tamaño de 12.40 nm que coincide con el rango reportado por otros artículos en donde se ha sintetizado hidroxiapatita (HAs) por el mismo método.

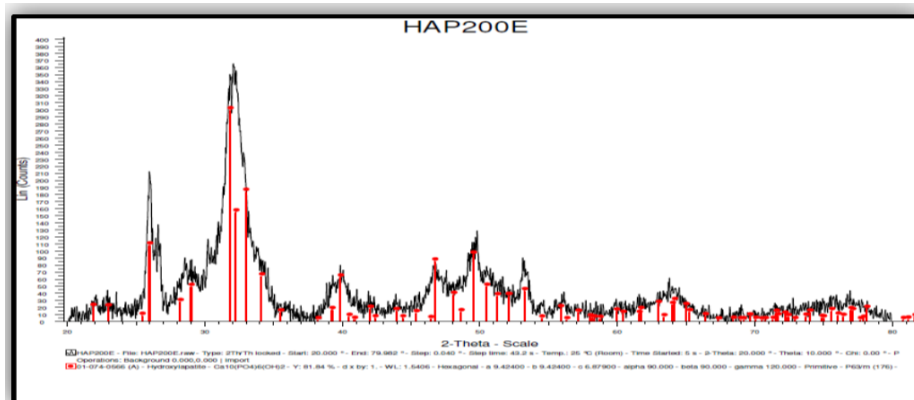


Fig. 9 Difractograma de Hs sometida a tratamiento térmico a 200°C dopada con calcitriol.

Con respecto a la hidroxiapatita tratada a 650 °C el difractograma (figura 10) mostro que solo estaban presentes fosfatos de calcio y su precursor la whitlockita (Fosfato de calcio y magnesio), este último se encuentra presentes previamente a la formación de la Hs por lo que se dio a la muestra otro tratamiento térmico.

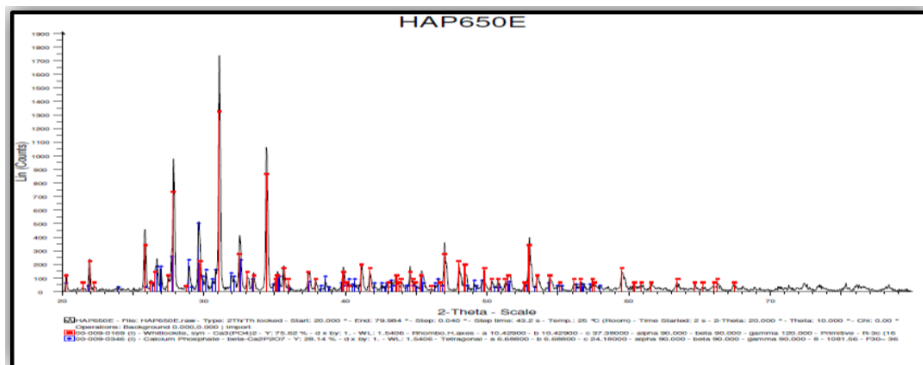


Fig. 10 Difractograma de Hs sometida a tratamiento térmico a 650°C sin calcitriol.

El último tratamiento a 750°C del que se obtuvo el difractograma mostrado en la figura 11 se evidencio que solo estaba presente el precursor de la Hs correspondiente a otra fase cristalina.

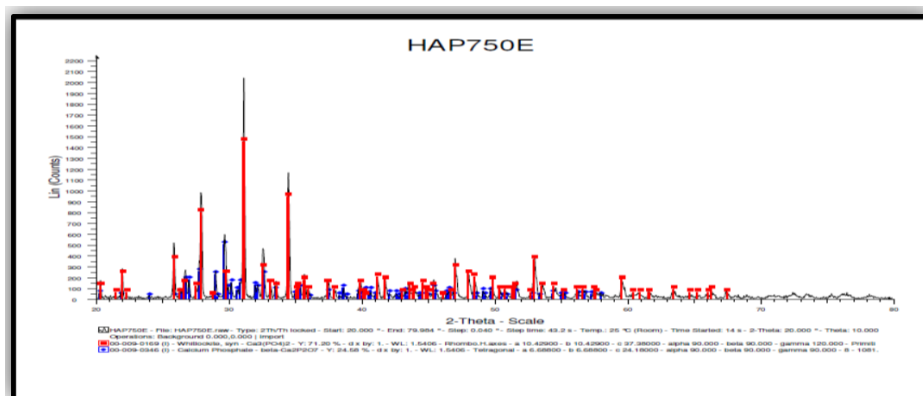


Fig. 11 Difractograma de Hs sometida a tratamiento térmico a 750°C sin calcitriol.

## 10.4 Isotermas de Adsorción

El análisis de isoterma de adsorción se realizó para determinar área específica y distribución del tamaño de poro por desorción de BJH, utilizando nitrógeno ( $N_2$ ) como adsorbato.

De acuerdo con la figura 12, la HS presentó una Isotherma Tipo IV donde la parte inicial de esta isoterma se le atribuye adsorción en monocapa-multicapa, ya que sigue el mismo camino que la parte correspondiente de una isoterma del tipo II a bajas presiones, pero con una formación de multicapas finita correspondiente al llenado completo de los capilares.

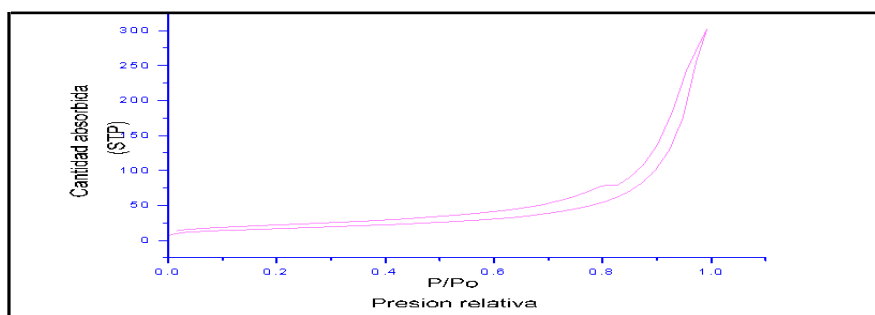


Fig. 12 Isotherma de adsorción-desorción de  $N_2$  sobre HS tratada a 200°C

Siendo el rasgo distintivo de esta isoterma, su lazo de histéresis, característica de los sólidos mesoporosos. La aparición del ciclo de histéresis se debe a que el proceso de llenado de los mesoporos está gobernado por el fenómeno de condensación capilar, por las propiedades percolativas del sólido y por el límite de la cantidad adsorbida en un intervalo de presión relativa alta.

La histéresis que aparece en la zona de multicapa de la isoterma se asocia generalmente con condensación capilar en estructuras mesoporosas. Tales ciclos de histéresis pueden presentar una amplia variedad de formas. Según la geometría del poro puede ocurrir que la condensación capilar se produzca a una presión diferente a la que se produce la evaporación del poro, ocasionándose un ciclo de histéresis en la isoterma de adsorción-desorción.

La histéresis que presentó la isoterma mostrada en la figura 12 es de tipo H1, ésta presenta un ciclo angosto, se observa las líneas de adsorción y desorción paralelas entre sí. La isoterma H1 es obtenida de adsorbentes que tienen distribuciones de poros muy

angostas. La característica de la histéresis tipo H1 (tipo A), es que las líneas de adsorción y desorción son casi verticales y aproximadamente paralelas en un intervalo apreciable de cantidades adsorbidas. Ésta se asocia habitualmente con materiales porosos de los que se sabe, por otros medios, que consisten en aglomerados o empaquetamientos compactos de esferas aproximadamente uniformes dispuestas de manera bastante regular y que por lo tanto tienen distribuciones estrechas de tamaño de poro.

La Figura 13 muestra la distribución del tamaño del poro que se calculó usando el método Barrett-Joyner-Hallenda (BJH) obteniéndose un diámetro promedio de 26.08 nm, que corresponde a un adsorbente de tipo mesoporoso.

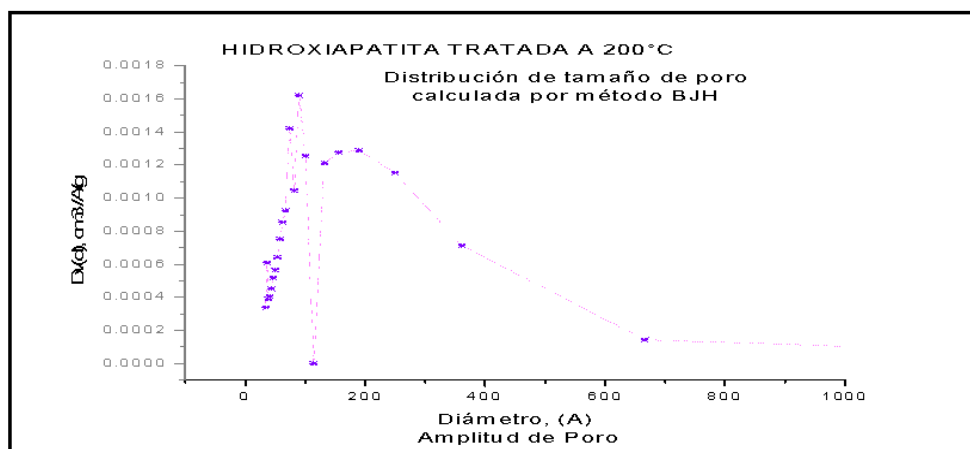


Fig. 13 Distribución del tamaño del poro por el método de BJH.

La isoterma más usada para analizar la adsorción en multicapas se debe a S. Brunauer, P. Emmett y E. Teller denominada isoterma BET la cual fue empleada para la determinación del área específica superficial total del adsorbente, en este caso la Hs y se obtuvo una superficie específica de 60.9 m<sup>2</sup>/g como se muestra en la figura 14.

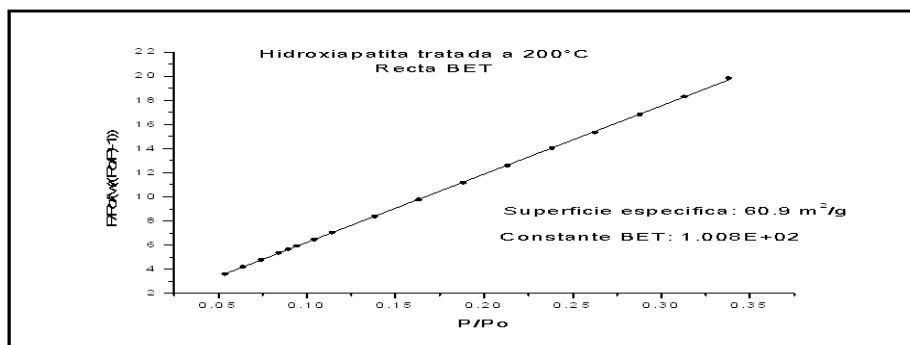
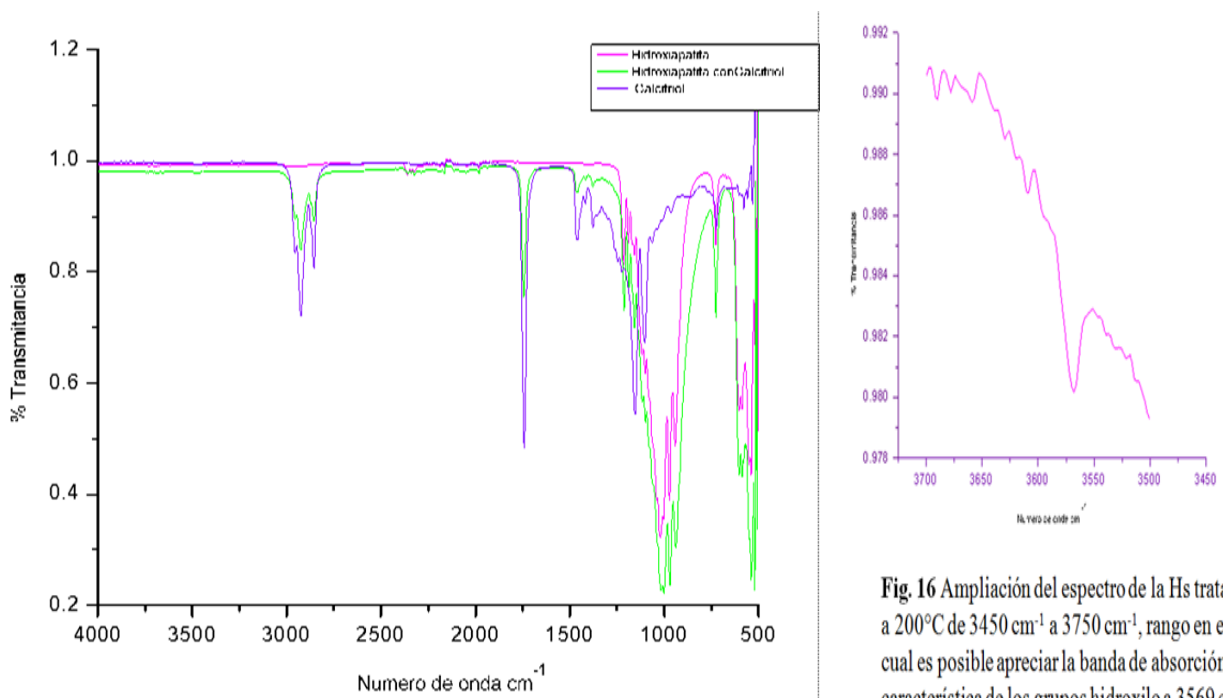
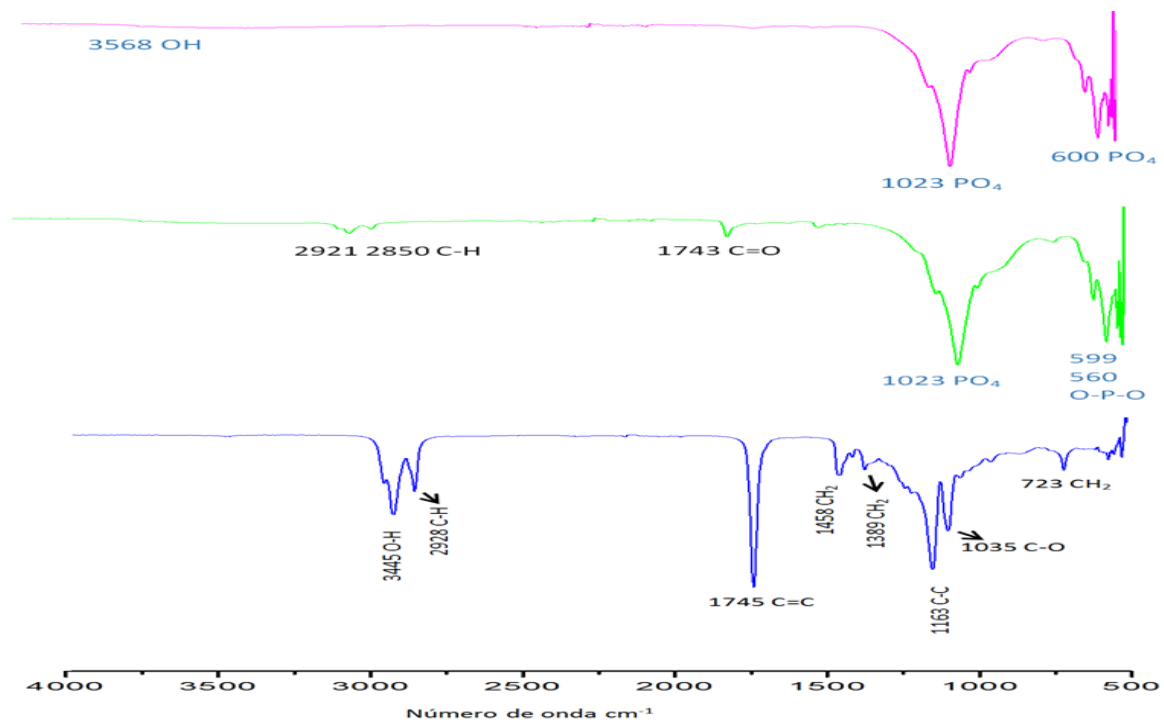


Fig. 14 Estimación de la superficie específica de la Hs tratada a 200 °C

## 10.5 F-TIR

Calcitriol: En la figura 15 el espectro infrarrojo de la cápsula de calcitriol muestra que hay una banda ancha e intensa a  $3445\text{cm}^{-1}$  donde se localizan las moléculas de calcitriol unidas por enlaces de hidrogeno debido a la presencia del grupo Hidroxilo (O-H), la banda fina siguiente de  $2928\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a frecuencias de tensión a C-H de los grupos metilo, donde el carbono tiene una hibridación  $\text{sp}^3$  y un cuarto de carácter S, continuamente se observa la banda de absorción de  $1745\text{cm}^{-1}$  de longitud que sugiere la presencia de la tensión C=C cercano a la banda de absorción de C=C conjugado y que corresponde a los carbonos que enlazan a los ciclohexanos de la molécula de calcitriol; a la derecha se observa una banda más ancha a  $1634\text{cm}^{-1}$  que pertenece a la vibración del doble enlace de carbonos conjugados (C=C) que tiene la molécula. La banda de  $1458\text{ cm}^{-1}$  está definida parcialmente, correspondiente a la frecuencia de vibración de deformación angular de los grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ), seguidamente se puede apreciar que la molécula absorbió frecuencias a  $1389\text{ cm}^{-1}$  que tiene lugar a la deformación de los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ); la banda a  $723\text{ cm}^{-1}$  hace referencia al balanceo de grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) y cabe mencionar que se observa otra región dentro de la huella dactilar a  $1163\text{ cm}^{-1}$  que da lugar a las tensiones C-C debido a su proximidad a la banda  $1200\text{cm}^{-1}$  perteneciente a los enlaces simples carbono-carbono, por último la banda que corresponde a la frecuencia de  $1035\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C-O que nos marca que hay una diferencia entre los dos hidroxilos unidos a un anillo y el hidroxilo unido al carbono con hibridación  $\text{sp}^3$  presente al otro extremo de la molecula.



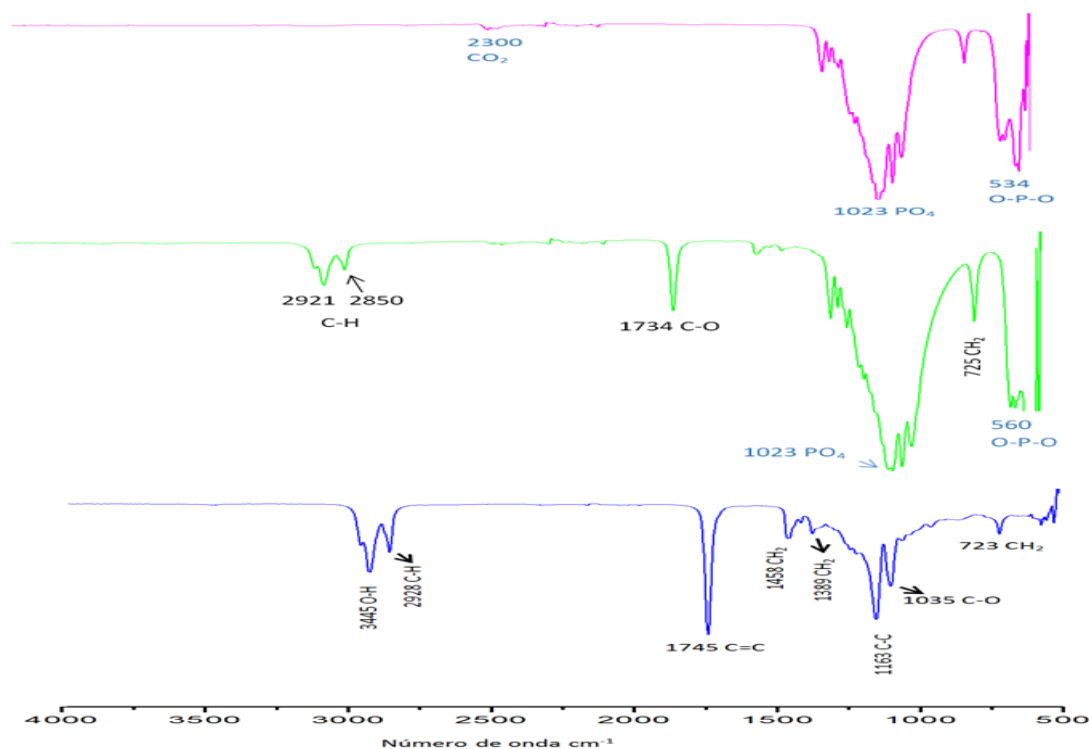
**Fig. 15** Espectro de Hs tratada a 200°C sin dopar, dopada y espectro de calcitriol, la figura de arriba son las bandas de absorción por separado del espectro de la parte inferior.

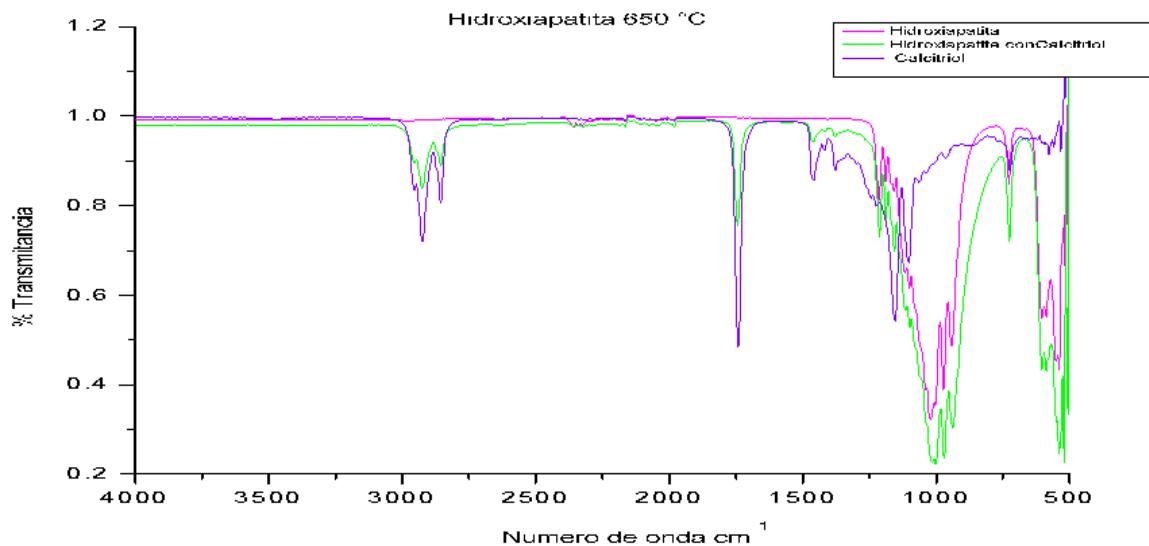
**Fig. 16** Ampliación del espectro de la Hs tratada a 200°C de 3450  $\text{cm}^{-1}$  a 3750  $\text{cm}^{-1}$ , rango en el cual es posible apreciar la banda de absorción característica de los grupos hidroxilo a 3569  $\text{cm}^{-1}$  encontrados en la Hs.

En la figura 15 se presenta el espectros de infrarrojo de la muestra de Hs tratada a 200°C las bandas observadas a 560 y 600  $\text{cm}^{-1}$  son debido a la presencia de fosfatos al igual que la banda aguda que aparece a 1023  $\text{cm}^{-1}$  finalmente encontramos la banda de absorción más importante, característica de la HAs a una longitud de onda de 3568  $\text{cm}^{-1}$  indicativa de OH intramoleculares es mostrada en la Fig. 16.

Con respecto a la Hs tratada a 200°C dopada con calcitriol que aparece en la figura 15 las bandas continuas observadas a 2921 y 2850 son pertenecientes a las vibraciones de tención del enlace C-H el cual cuenta con hibridación  $\text{sp}^3$  y tiene un cuarto de carácter S. Posteriormente a 1743  $\text{cm}^{-1}$  se encontró una señal intensa característica del estiramiento del grupo carbonilo, perteneciente al calcitriol, a 1023  $\text{cm}^{-1}$  se muestra un estiramiento intenso y ancho, típico del fosfato. A un número de onda de 599 y 560  $\text{cm}^{-1}$  existen bandas características de estiramiento de O-P-O pertenecientes al grupo fosfato.

En la banda de adsorción perteneciente a la Hs tratada a 650°C (Fig. 17); encontramos un número de onda de 534  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde al modo de doblamiento de enlaces O-P-O; sin embargo la banda de adsorción a 3568  $\text{cm}^{-1}$  indicativa de OH intramoleculares solo aparece después del tratamiento a 200°C (Fig. 16).





**Fig. 17** Espectros de absorción de la Hs tratada a 650°C sin dopar, dopada y espectro de calcitriol, en forma separada y en un mismo espectro.

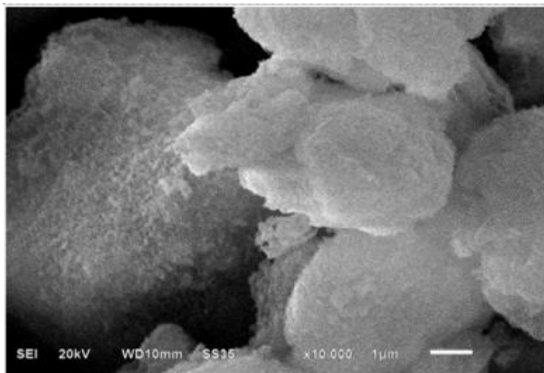
En el espectro de Hs tratada a 650°C con calcitriol (Fig. 17) muestra una banda de absorción a 534  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al modo de doblamiento de los enlaces O-P-O. El siguiente pico observado es a una frecuencia de 725  $\text{cm}^{-1}$  donde se ubica una banda de reflexión típica de grupos carbonatos. En la siguiente banda de adsorción a 1012  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a un modo de tensión asimétrica triplemente degenerada de  $\text{PO}_4^{3-}$  en Hs. Y en 1734  $\text{cm}^{-1}$  hay una banda de adsorción producto del estiramiento del grupo C-O presente en el calcitriol. En las siguientes bandas a 2851  $\text{cm}^{-1}$  y 2926  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, se asignan a las vibraciones de estiramientos asimétricos y simétricos de enlace C-H ambas pertenecientes al calcitriol.

### 10.6 Microscopia electrónica de barrido:

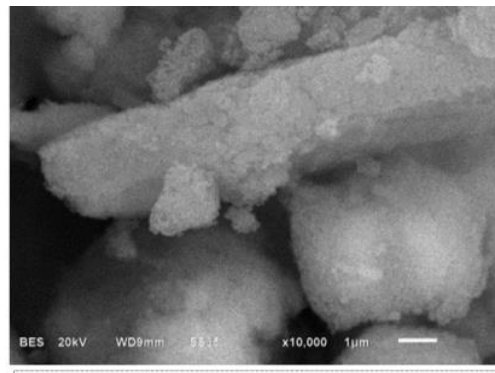
Se realizó un microanálisis cualitativo para observar la morfología de la Hs, las muestras fueron previamente fijadas con cinta de grafito y metalizadas con Au a fin de garantizar su conductividad.

En las figuras 18 y 19 se muestran las micrografías de la Hs con tratamiento a 200°C sin dopar, y la dopada con calcitriol. Comparando las micrografías obtenidas se puede observar que la Hs sin dopar es amorfa, se presenta en aglomerados y tiene un

tamaño de 330 nm aproximadamente. En la muestra de Hs dopada de calcitriol se observaron cristales de forma alargada de 47500 nm de longitud aproximadamente; probablemente, la Hs tomo forma debido a la presencia del calcitriol.

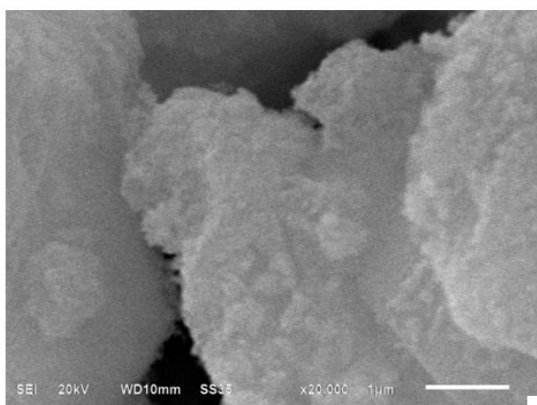


**Fig. 18** Micrografía de la Hs tratada a 200°C

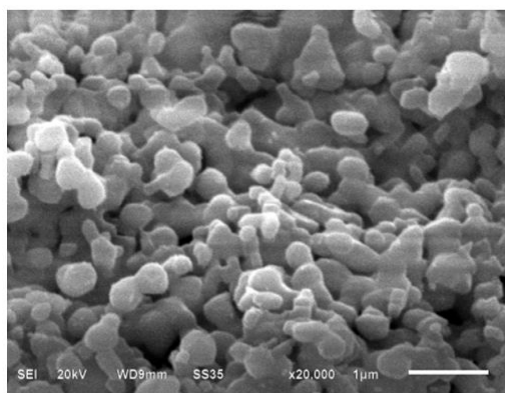


**Fig. 19** Micrografía de la Hs tratada a 200°C dopada con calcitriol.

En las figuras 20 y 21 se muestra la comparación de los cristales de Hs tratada a 200°C y a 650°C sin dopar. Como se observa en las microfotografías, los cristales de Hs con tratamiento a 200°C fueron de 3450 nm de diámetro, de forma irregular o amorfa. Mientras que con el tratamiento a 650°C los cristales obtenidos fueron de mayor tamaño, aproximadamente 874 nm y de forma semiesférica.

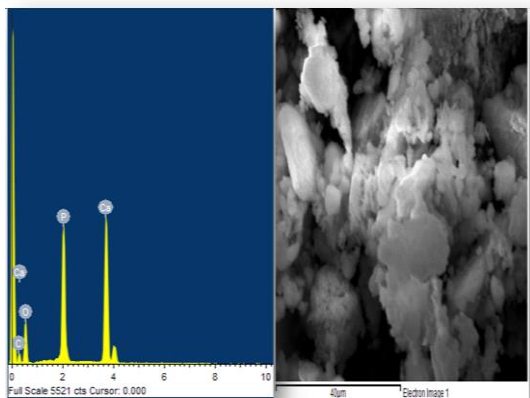


**Fig. 20** Micrografía de Hs tratada a 200°C

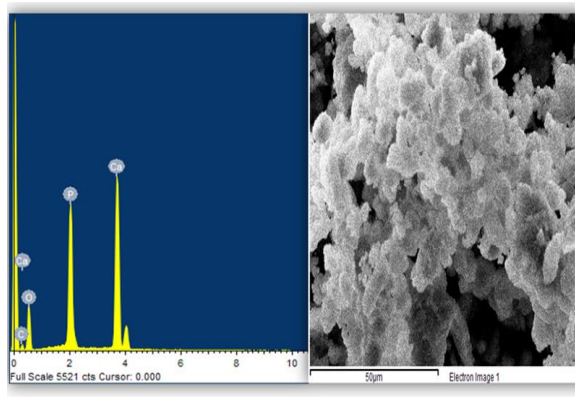


**Fig. 21** Micrografía de Hs tratada a 200°C y dopada con calcitriol.

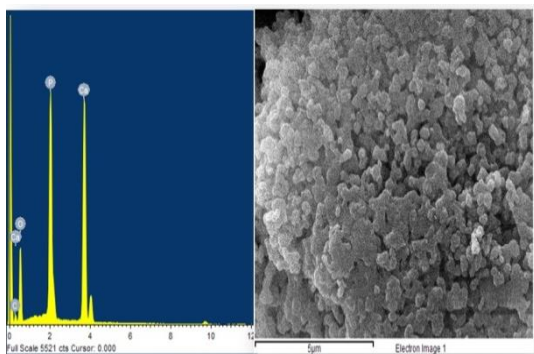
La Hs tratada a 200°C y 650°C fue sometida a MEB tanto antes como después del dopaje con calcitriol figuras 22, 23 24 y 25.



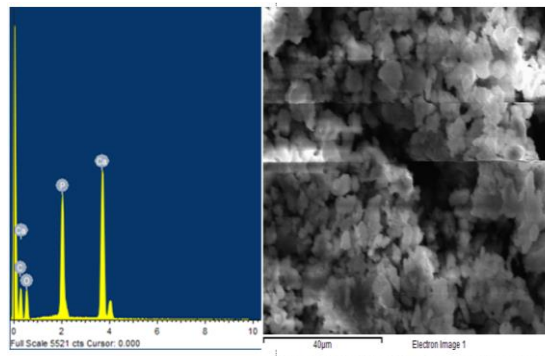
**Fig. 22** Espectro y Micrografía de Hs tratada a 200°C.



**Fig. 23** Espectro y Micrografía de Hs tratada a 200°C dopada con calcitriol.



**Fig. 24** Espectro y Micrografía de Hs tratada a 650.

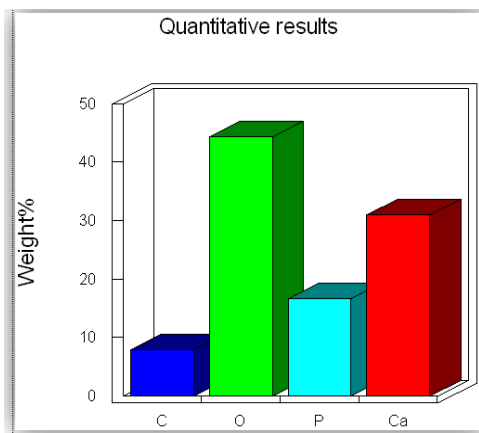


**Fig. 25** Espectro y Micrografía de Hs tratada a 650°C dopada con calcitriol.

El análisis registro un aumento del porcentaje de carbono en la Hs con tratamiento térmico a 200°C después del dopaje (Fig. 27, tabla 2), esto debido a los anillos y grupos metilenos presentes en el calcitriol; con respecto a la presencia de dicho elemento en la Hs tratada a 200°C sin dopaje (Fig. 26, tabla 1) posiblemente se debe a que durante el proceso de síntesis los precursores del compuesto, estuvieron en contacto con el medio ambiente, además de que el portamuestras del equipo posee carbono, en cuanto al porcentaje de oxígeno encontrado antes y después del dopaje, es evidente que este porcentaje es ligeramente mayor en la hidroxiapatita sin dopar, aun cuando en ambos compuestos está presente el oxígeno posiblemente por el tipo de interacción entre hidroxiapatita calcitriol, el oxígeno (al formar puentes intramoleculares) es detectado en menor cantidad.

Elemento	Peso %	Atómico%
CK	7.98	14.00
OK	44.32	58.35
PK	16.64	11.32
Ca K	31.06	16.33
Total	100.00	

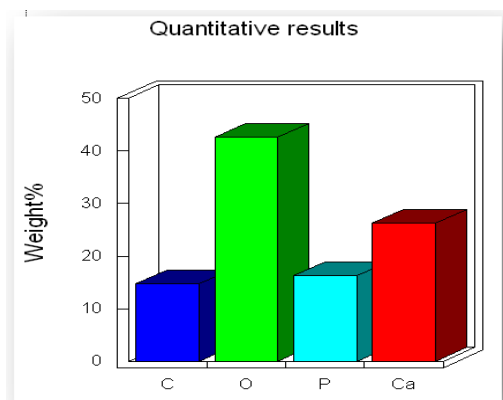
**Tabla 1** Porcentaje en peso y porcentaje atómico de los elementos encontrados en la muestra de Hs tratada a 200°C.



**Fig. 26** Grafica representativa del porcentaje en peso de: C, O, P y Ca de la Hs tratada a 200°C.

Elemento	Peso%	Atómico%
CK	14.78	24.23
OK	42.65	52.49
PK	16.33	10.38
Ca K	26.25	12.90
Total	100.00	

**Tabla 2** Porcentaje en peso y porcentaje atómico de los elementos encontrados en la muestra de Hs tratada a 200°C y dopada con calcitriol.



**Fig. 27** Grafica representativa del porcentaje en peso de: C, O, P y Ca de la Hs tratada a 200°C dopada con calcitriol.

En la gráfica de la figura 29 representativa de la tabla 4 se observa que después del tratamiento a 650°C en la Hs, la presencia de carbono registra una disminución, al compararse con el porcentaje obtenido tras el tratamiento a 200°C mostrado en la Fig. 26, posiblemente el porcentaje de este elemento disminuye debido a su interacción molecular con la Hs lo que ocasiona que aparentemente se detecte en menor proporción este elemento. En cuanto al oxígeno se aprecia un ligero aumento en la Hs con tratamiento a 650°C, quizá se debe al cambio estructural con respecto al compuesto del que ahora forman parte (fosfatos de calcio y whitlockite)

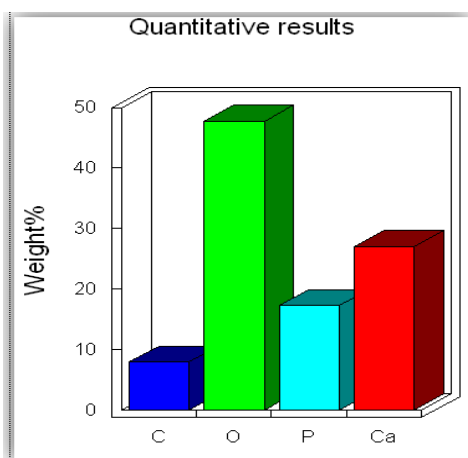
Por otro lado al comparar las gráficas entre la Hs a 650°C sin dopar y la dopada (Fig. 28 y 29) el porcentaje de C aumenta más de tres veces, evidentemente por la

presencia de calcitriol que como se menciono tiene anillos de carbono y grupos metilo en su estructura.

Con respecto al porcentaje de oxigeno encontrado antes y después del dopaje, éste es ligeramente mayor en la Hs sin dopar, a pesar de que este elemento está presente en ambos compuestos, es posible que por el tipo de interacción entre la Hs y el calcitriol, el oxígeno (al formar puentes intramoleculares) es detectado en menor cantidad de forma semejante a como se mencionó anteriormente en la comparación de Hs con tratamiento a 200°C previa al dopaje y la Hs dopada.

Elemento	Peso%	Atómico%
CK	7.97	13.61
OK	47.74	61.15
PK	17.28	11.43
CaK	27.00	13.81
Total	100.00	

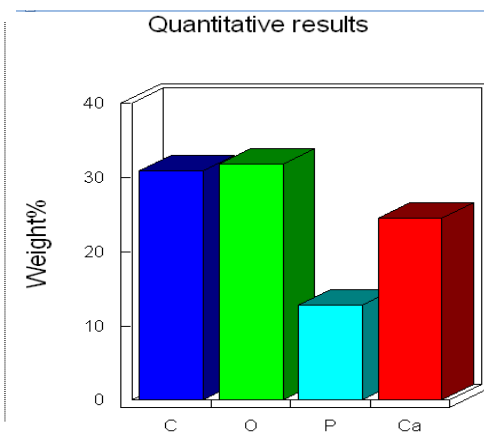
**Tabla 3** Porcentaje en peso y porcentaje atómico de los elementos encontrados en la muestra de Hs tratada a 650°C.



**Fig. 28** Grafica representativa del porcentaje en peso de: C, O, P y Ca de la Hs tratada a 650°C.

Elemento	Peso %	Atómico %
CK	30.86	46.01
OK	31.84	35.64
PK	12.78	7.39
Ca K	24.52	10.95
Total	100.00	

**Tabla 4** Porcentaje en peso y porcentaje atómico de los elementos encontrados en la muestra de Hs tratada a 650°C y dopada con calcitriol.



**Fig. 29** Grafica representativa del porcentaje en peso de: C, O, P y Ca de la Hs tratada a 650°C dopada con calcitriol.

En la tabla 8 se muestra la relación estequiometrica Ca/P de la Hs a 200°C sin dopar y dopada. Ésta relación a 200°C se acerca a la reportada en la literatura de 1.667 sin embargo disminuye con la presencia de calcitriol, posiblemente porque interactúa con alguno de estos elementos haciendo menor su relación.

En la tabla 9 aparecen los valores de relación estequiometrica entre los elementos Ca y P de la Hs tratada a 650°C sin dopar y dopada, la Hs tratada a 650°C dopada presenta una relación mayor comparada a la no dopada esto indica que la presencia de calcitriol ayuda a que el calcio presente sea detectado

Por otro lado la Hs tratada a 650°C sin dopaje tiene una relación estequiometrica menor comparada con la Hs tratada a 200°C sin dopar, cabe mencionar que a esta temperatura solo se encontró el precursor de la Hs (whitlockita) así como fosfatos de calcio y probablemente los fosfatos interactúen con el calcitriol de forma distinta a como lo haría con la Hs.

**Tabla 8** Relación estequiometrica entre Calcio y Fosforo de muestras de Hs tratada a 200°C sin dopar y dopada.

	HA 200°C	HA- Calcitriol 200°C
<b>Relación Ca/P</b>	1.44247	1.24226

**Tabla 9** Relación estequiometrica entre Calcio y Fosforo de muestras de Hs tratada a 650°C sin dopar y dopada.

	HA 650°C	HA- Calcitriol 650°C
<b>Relación Ca/P</b>	1.20757	1.48279

## CONCLUSIONES

- 1) Por el método de precipitación se logró obtener la HA con un pH final de 10.5.
- 2) El TGA mostro la disminución de masa expresada en porcentaje hasta que se observó constante y la temperatura a la que se eliminan impurezas como agua, carbonatos y CO<sub>2</sub> conforme ésta aumenta.
- 3) Por DSC se identificaron las diferencias en masa correspondientes a procesos endotérmicos y exotérmicos en la HA a distintas temperaturas y se confirmó que por debajo de 1000°C no se alcanza su punto de fusión.
- 4) La distribución de tamaño de poro de los aglomerados de la HA fue calculada usando el método Barrett-Joyner-Hallenda (BJH), dando un diámetro promedio de 26.08 nm correspondiente a un adsorbente de tipo mesoporoso.
- 5) Debido a la mesoporosidad que presentaron los aglomerados de HA, fue posible que se alojara el Calcitriol en éstos, con lo que se muestra que es posible que la HA pueda ser utilizada como vehículo de transporte de algún fármaco
- 6) El difractograma de Rayos X de la HA tratada a 200°C mostro máximos de difracción similares a las que reporta la base de datos del CUV de una HA sintética.
- 7) El calcitriol está presente en la HA, tal como se mostró en el F-TIR, mediante la presencia de los grupos funcionales de la HA y del Calcitriol.
- 8) La MEB permitió la observación superficial de la HA en forma de aglomerados micrométricos con morfología irregular.
- 9) Además MEB confirma la presencia del Calcitriol en la HA mediante el aumento del porcentaje de C.

## **Perspectiva**

Debido a que la HA puede ser útil como vehículo de fármacos, como lo muestra la presente contribución donde el calcitriol queda impregnado en la HA, podrían ser modificadas las condiciones bajo las que se lleve la síntesis, para evitar el cambio de fase de la HA. Posterior a la estabilización del producto es viable retomar estudios de solubilidad en solventes fisiológicos, respecto al tiempo y a temperatura corporal, lo que contribuirá con futuros estudios farmacológicos para analizar la liberación controlada en algún modelo animal.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Guyton, A.C. and Hall, J.E. (1997). Tratado de fisiología médica. El hueso y sus relaciones con el calcio y el fósforo extracelular. (79); pag1084-1855. McGraw-Hill Interam.deEspafla S.A. Eds.
2. Latarjet, M y Ruíz, A. Anatomía humana 4<sup>a</sup> ed. Bueno Aires: Medica panamericana, 2011. ISBN: 978-950-06-1368-2 pag 848
3. BOSKEY Adele L. Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. Journal of Dental Research; Houston; Aug 1997. Vol. 76 No 8 p. 1433-1439.
4. Broadus AE. Mineral balance and homesotasis. En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Editado por Favus MJ. 4<sup>a</sup> ed. American Society for Bone and Mineral Research. Lippincott Williams and Wilkins, 1999, pp 74-80.
5. Londoño Marta E. Echavarría Alejandro. De La Calle Francenith Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas: Revista EIA, ISSN 1794-1237. Junio 2006. Número 5 pag. 109-118
6. IVANOVA T. I.; Frank -Kamenetskaya, O. V.;Kol 'tsov , A. B. and Ugolkov , V. L. Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal decomposition. Journal of Solid State Chemistry 160, (2001) 340-349 pg.
7. Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics Materials Science and Engineering: C, Volume 27, Issue 4, 16 May 2007, Pages 684-690 Deepak K. Pattanayak, Rajalaxmi Dash, R.C. Prasad, B.T. Rao and T.R. Rama Mohan. Pg 85-88.
8. RATNER, B. and Hoffman, A. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Academic Press. 1996. 473 pg.
9. Inorganic Materials, Vol. 38, No. 10, 2002, Translated from Neorganicheskie Materialy, Vol. 38, No. 10, 2002, pp. 1159–1172. Original Russian Text Copyright © 2002 by Orlovskii, Komlev, Barinov. Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. pg. 973–984.
10. medicineFabrication and characterization of a hydroxyapatite nanopowder by ultrasonic spray pyrolysis with salt-assisted decomposition Materials Science and Engineering: A, Volumes 449-451, 25 March 2007, Pg 821-824
11. Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub> Ultrasonics Sonochemistry, Volume 8, Issue 2, April 2001, Wantae Kim and Fumio Saito Pg 85-88.
12. R.W. Rice, The porosity dependence of physical properties of materials: A sum. Mary review, Key. Eng. Mater. 115, 1 (1996).

13. D. Shi, G. Jaing, X. Wen, "5. In vitro behavior of hydroxyapatite prepared by a depositon method", Processing and fabrication of advanced materials, viii, eds. K. Khor et al., World Scientific, Singapore, 2001, pg. 117.
14. Rodríguez-Lorenzo, L. M. and Vallet-Regí, M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. Chem. Mater. 2000, 12, 2460-2465 pg.
15. N. Kivrak, A.C. Tas, Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate composite bioceramic powders and their sintering behavior, J. Am. Ceram. Soc., 81, 2245 (1998).
16. P. Layrolle, A. Ito, T. Tateishi, Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics, J. Am. Ceram. Soc., 81, 1421 (1998).
17. A. Balamurugan, S. Kannan, S. Rajeswari, Bioactive sol-gel hydroxyapatite sur. face for biomedical application - in vitro study, Trends Biomater. Artif. Organs, 16, 18 (2002).
18. M. Sivakumar, T.S.S. Kumar, K.L. Shantha, K.P. Rao, Development of hydroxyapatite derived from Indian coral, Biomaterials, 17, 1709 (1996).
19. LIU, C., et al., Kinets of hydroxyapatite precipitation al pH 10 to 11. Biomaterials, 2001. 22: 301-306 pg.
20. LIU, J.; YE X.; WANG H.; ZHU M.; WANG B. and YAN H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. Ceramics International. 29, 2003: 629-633 pg.
21. BERNACHE-ASSOLLANT D.; Ababou, A.; Champion, E. and Heughebaert, M. Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  I. Calcination and particle growth. Journal of the European Ceramic Society 23 (2003) 229-241 pg.
22. Pizá V. "Clavos de Fijación Externa Recubiertos de Hidroxiapatita. Estudio Clínico en Alargamientos de Extremidades", Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona, 2003.
23. K P S. Min-Cheol C. Balakrishnan A, T N K. Seong-Jai C. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique by: Bull. Mater. Sci., Vol. 32, No. 5, October 2009, pag. 465-470. © Indian Academy of Sciences.
24. González-Padilla E, Soria López A, González-Rodríguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco M, et al. Elevada prevalencia de hi-povitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Ca-narias (España). Endocrinol Nutr. 2011;58(6):267-73 pag. Disponible en: [http:// www.elsevier.es/es/revistas/endocrinologia-nutricion-12/elevada-prevalen-cia-hipovitaminosis](http://www.elsevier.es/es/revistas/endocrinologia-nutricion-12/elevada-prevalen-cia-hipovitaminosis)

25. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; Vol 79: 362-371 pg.
26. - Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:491-499 pg.
- 27 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81 pg.
- 28 Thomas MK, Demay MB. Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29:611-627 pg.
- 29 Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 243-253 pg, table of contents.
- 30 -. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1080-1086 pg.
- 31 Thacher TD, Fischer PR, Strand MA, Pettifor JM. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann Trop Paediatr* 2006; 26: 1-16 pg.
- 32 Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 243-253 pg.
33. Mónica Rodríguez Sangrador,, “Influencia de la exposición solar y la dieta en el estatus nutricional de vitamina d en mujeres adolescentes y de edad avanzada: estudio optiford- unión europea”, Madrid, 2006, Universidad Complutense de Madrid, Tesis doctoral, Páginas 11,12,13, 17,18, 22
34. Rigby WFC, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of lymphocyte mitogenesis by 1, 25 - dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Inves* 1984; 74: 1451 pg.
35. Manolagas SC, Provvedini DF, Muray et al. The antiproliferative effect of calcitriol on human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metabolism* 1986; 63: 394 pg.
36. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281 pg.
37. Thomas MK, Demay MB. Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29:611-627 pg.
38. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, Thoma A, Kiel DP, Henschkowski J. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose-dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009; 169: 551-61 pg.
39. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB y cols. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; 293:2257-2264 pg.

40. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF y cols. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16:713- 716 pg.
41. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, et al. Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* 2004; 291:1999-2006
42. Dambacher MA, Schacht E. Osteoporosis y los metabolitos activos de la vitamina D. *Litera Rheumatologica* 18. EULAR; Zurich, 1997.
43. Maria Vallet Regi, *Biocerámicas: Evolución y aplicaciones*, *An. Quim.* 2011, 107(19, 28-35 pg)

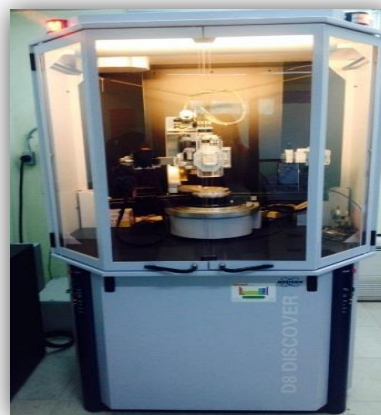
## ANEXOS

Imagen de los polvos de Hs, tomada por microscopía electrónica después del tratamiento térmico a 200 °C y previos a la impregnación del calcitriol.

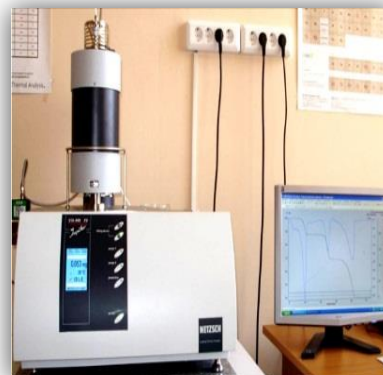


Las muestras caracterizadas por métodos espectroscópicos y MEB fueron analizadas en el laboratorio del "Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología OCT-BUAP".

Para hacer la difracción de rayos X de las muestras se utilizó el equipo marca BRUKER, modelo 78 Discovered.



El Análisis Termogravimétrico, TG, y la Calorimetría Diferencial de Barrido, DSC, de las muestras sintetizadas se determinaron por medio del equipo Netzsch STA 449F3, en el rango de temperatura de 25°C a 1000°C, el calentamiento fue a velocidad constante.



El análisis de isoterma de adsorción se realizó en el equipo Quantachrome Corporation Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report Version, utilizando nitrógeno (N<sub>2</sub>) como adsorbato.



El equipo utilizado es un espectrofotómetro de Transformación de Fourier marca BRUKER, modelo Vertex 70, número de serie 1 002 9244. Las medidas se tomaron en un rango espectral desde 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.



Para realizar la microscopia electrónica de Barrido (MEB) se utilizó el equipo marca Jeol modelo JSM-6610LV, operado en el modo de alto de vacío, equipado con detectores que permiten la obtención de imágenes de electrones retrodispersados.

