

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE HIDROXIAPATITA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN, PARA CONTRIBUIR EN APLICACIONES TECNOLÓGICAS”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA: VICTOR MANUEL CRIVELLI PANOHAYA

DIRECTOR DE TESIS

M. C. José Genaro Carmona Gutiérrez

ASESOR DE TESIS

Dr. José Albino Moreno Rodríguez

PUEBLA, PUEBLA

DICIEMBRE 2015

INDICE

Contenido	Paginas
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen	5
Introducción	6
Planteamiento del problema	8
Justificación	9
Hipótesis	9
Objetivos	9
Objetivo general	9
Desarrollo experimental	10
Síntesis de la hidroxiapatita (HA)	10
Diagrama de flujo	11
Solubilidad	12
Solubilidad de referencia	17
Solubilidad de estándar	17
Solubilidad de ácido clorhídrico	18
Solubilidad en función del tiempo	20
Caracterización	21
Difracción de rayos X	21
Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	23
Microscopia Electrónica de Barrido	24
Espectrómetro de Energía Dispersiva	25

Resultados	28
Conclusiones	35
Bibliografía	36

DEDICATORIAS

A DIOS

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A ALEJANDRA VALENCIA PAREDES

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme convertirme en un profesional en el área que tanto me apasiona.

A mis padres y hermanos

Sé que jamás encontrare una forma de agradecerles todo el cariño y apoyo que me han brindado en los momentos más difíciles de mi vida

Pero aun así les doy las gracias por haber seguido conmigo hasta el día de hoy, y quiero que sepan que ustedes y mis hermanos son los más importante para mí y que nunca los voy a defraudar esto es sólo una prueba de mi esfuerzo y el de ustedes.

Los quiero mucho

AL M.C. José Genaro CarmonaGutiérrez muchas gracias por darme la oportunidad de realizar este proyecto con usted, también por todo su tiempo, dedicación para asípoder concluir con éxito la tesis

Al Dr. José Albino Moreno Rodríguez gracias por el apoyo y conocimientos

AL Dr. Efraín Rubio Rosas por

A los miembros del jurado por su colaboración

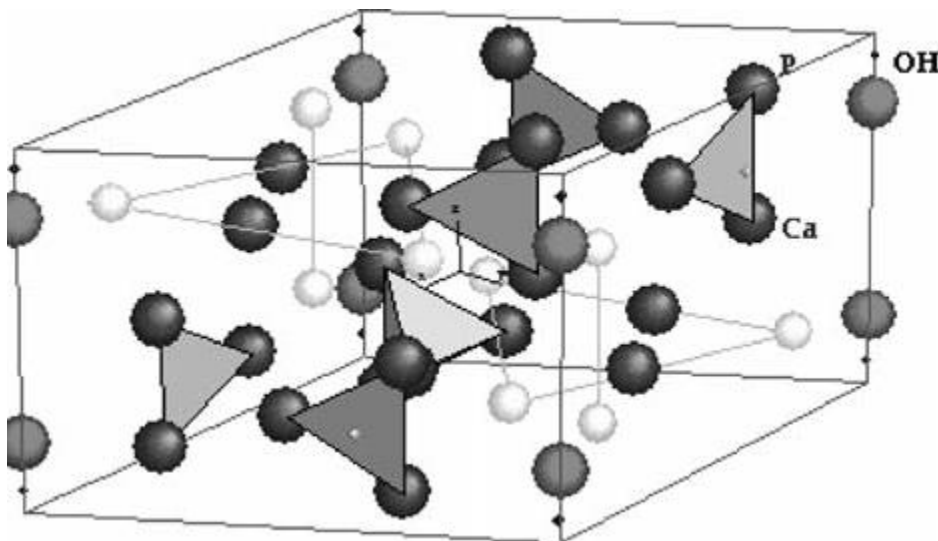
A la Facultad de Ciencias Químicas por la formación y orientación intelectual que me dio durante toda la carrera.

RESUMEN

La hidroxiapatita sintética, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es un biomaterial que se emplea para reconstruir tejido óseo dañado o como recubrimiento de prótesis, ya que su composición química y su estructura se asemejan a la fase mineral contenida en el esqueleto; esta similitud favorece la formación de enlaces con el hueso, siendo por consiguiente un material biocompatible. La hidroxiapatita se puede obtener a partir de huesos, pero hoy en día se sintetiza mediante diferentes procedimientos químicos, como las reacciones en estado sólido, el método sol-gel, la reacción por doble descomposición, la neutralización o el método hidrotérmico. El método hidrotérmico es el más empleado por su simplicidad, pero presenta ciertos inconvenientes como altas temperaturas (600-1000 °C) y tiempos prolongados (2-14 días). Es por esto que surge la necesidad de buscar nuevos métodos de síntesis de HA, uno de ellos es la síntesis de hidroxiapatita por el método de precipitación en medio húmedo, a partir de óxido de calcio, agua desionizada, ácido fosfórico e hidróxido de amonio a temperatura ambiente. En el presente trabajo se utilizó dicho método a un pH superior a 9, para ese propósito se utiliza el hidróxido de amonio, la HA es un material de color blanco, poco soluble en diferentes disolventes, pero muy soluble en ácido clorhídrico, por su importancia que este material tiene de ser biocompatible y además bioactivo como lo demuestra la literatura, es necesario realizar una amplia investigación tanto en sus propiedades físicas y químicas como en sus probables aplicaciones tecnológicas, hoy nos planteamos caracterizar una vez más la estructura molecular de este material por diferentes técnicas espectroscópicas como difracción de Rayos X, Infrarrojo, Microscopia Electrónica de Barrido y Energía Dispersiva, pero además estudiamos el grado de solubilidad, sobre todo en aquellos disolventes que tienen un comportamiento fisiológico, con el propósito de que tanto la caracterización, como el conocimiento pleno de su solubilidad puedan ser la base para un futuro estudio farmacológico, donde la HA pudiera ser el vehículo que transporte la presencia de un fármaco, como un analgésico, antibiótico, anticancerígeno etc., ya sea en forma oral o directamente a alguna zona dañada del organismo, por ejemplo, directamente a una fractura ósea o al alivio de una osteoporosis, artritis o cualquier otra enfermedad relacionada con el sistema óseo.

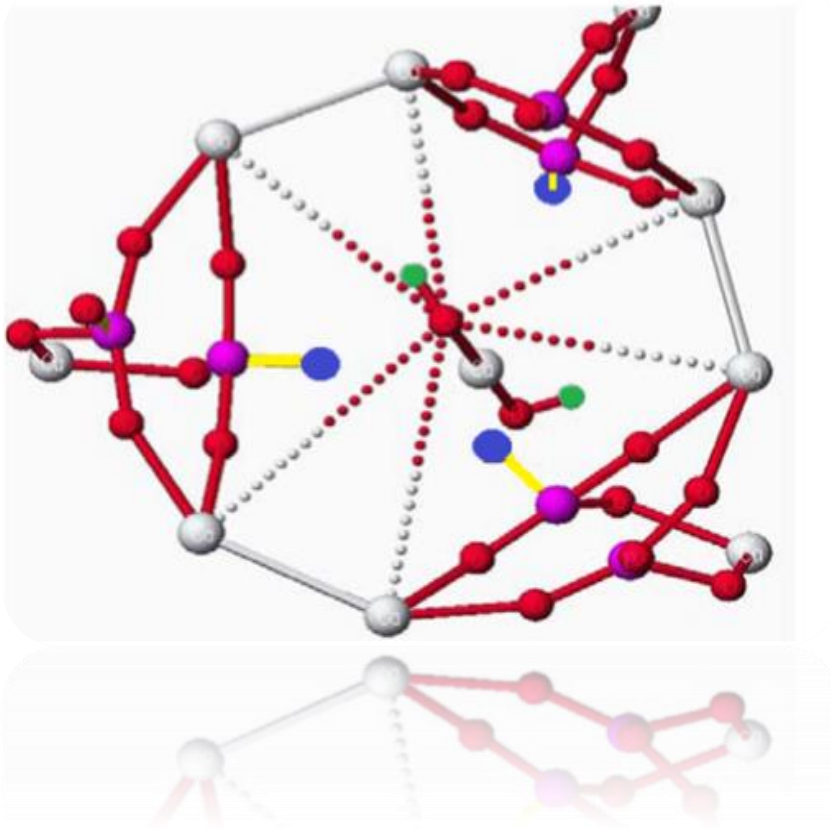
INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido firme, duro y resistente que forma parte del endoesqueleto de los vertebrados. Está compuesto por tejidos duros y blandos, cuyas funciones son mantener la estructura en los vertebrados y proteger los órganos internos, también posee una matriz orgánica formada por colágeno (50 - 95%) que le da fuerza al hueso, y depósitos de sales de calcio, que fortalecen dicha matriz. El líquido extracelular que rodea al hueso, es un medio gelatinoso homogéneo que contiene proteoglicanos como el condroitín sulfato y el ácido hialurónico que ayudan a la matriz a controlar los depósitos de sales de calcio. Las sales de calcio son cristalinas y se depositan en la matriz orgánica del hueso y están compuestas principalmente de calcio y de fosfato.



Estructura de una HA $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$. Departamento de Química, Universidad del

Estado de Moscú ⁽²⁾



Estructura de la HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

La Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el principal componente inorgánico en los vertebrados; se encuentra en la dentina y en el esmalte dental. La hidroxiapatita normaliza, a través del calcio sérico, el nivel de parahormona; provocando una reducción de la resorción ósea y al mismo tiempo provee al esqueleto de las sustancias minerales necesarias, especialmente calcio y fósforo. La hidroxiapatita sintética (HA) 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 los tejidos vivos. El estudio de la HA se ha realizado desde hace varias décadas; Aaron y Posner (1958) propusieron su estructura cristalina a partir del análisis de un mono cristal (3). El carácter iónico de la HA la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor que $1500\text{ }^\circ\text{C}$. La relación ideal Ca/P es 10:6 (1.6667), su densidad calculada es de 3.219 g/cm^3 y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de manufactura.

Los materiales en polvo de HA pueden obtenerse a partir de diversas fuentes de calcio y fósforo empleando variados métodos como la espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de absorción molecular (UV-Vis), espectroscopía infrarroja con transformada de

Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDX).

El análisis de incorporación de fármacos en biocerámicas involucra varios factores; por ejemplo, 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 su comportamiento reológico.

La morfología y el tamaño de partícula de la HA que han sido identificadas por Microscopía Electrónica de Barrido; y su composición elemental se ha analizado por energía dispersiva de rayos X. sin embargo, también es importante conocer su solubilidad para poder avanzar en el análisis farmacológico y en su aplicación tecnológica.

La mayoría de los estudios actuales están orientados a investigar distintas vías de síntesis de la HA 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. Los métodos más comunes para producir HA nano cristalina sintética son: precipitación, el químico-húmedo en solución acuosa, el sol-gel, el hidrotermal, la deposición térmica y el método de reacción en estado sólido.

Las aplicaciones de la hidroxiapatita son numerosas, las más comunes son la 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 maxilofacial, recubrimiento de las superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos.

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 naturales que generan altos costos siendo 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.

JUSTIFICACIÓN

El hueso es un órgano que cumple varias funciones en el organismo, además de las actividades mecánicas, es un depósito importante de calcio, el cual es vital para la función muscular, la contracción cardíaca, la actividad neuronal, la hemostasia y para la mayoría de los procesos de regulación transmembrana, por lo que es importante mantener en buen estado dicho órgano, sin embargo, existen algunos problemas de salud en donde es necesario el implante de hueso, el cual resulta un poco costoso para los pacientes. Debido a esto, se han estudiado otras alternativas para solucionar dichos problemas, una de estas es el uso de la hidroxiapatita.

HIPÓTESIS

La hidroxiapatita es un material cristalino que se obtiene por un método químico sencillo y económico a una temperatura ambiente y que se puede demostrar experimentalmente por diferentes técnicas espectroscópicas, es un material que puede tener aplicaciones tecnológicas, dependiendo de sus propiedades físicas como por ejemplo la solubilidad.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar la HA por el método de precipitación a partir de óxido de calcio, ácido fosfórico e hidróxido de amonio, con una agitación de 1000 RPM a temperatura ambiente y a un pH > 9

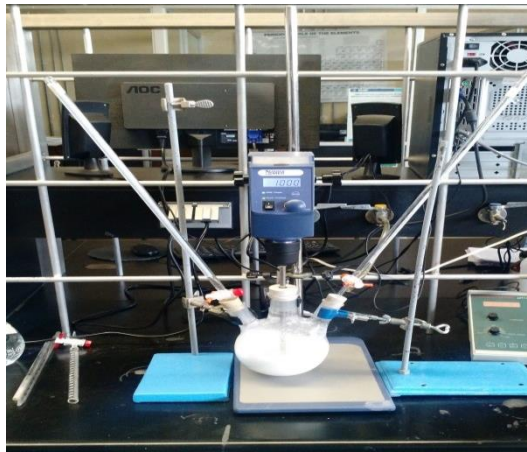
OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar la HA manteniendo una relación molar de calcio y fósforo de 1.667 a un pH superior a 9
- Estudiar la solubilidad de la HA en diferentes solventes fisiológicos
- Caracterizar la HA por difracción de Rayos X para determinar la cristalinidad
- Caracterizar la HA por espectroscopia de infrarrojo para determinar los grupos funcionales presentes en el material
- Caracterizar la HA por microscopía electrónica de barrido para determinar la textura del material
- Caracterizar la HA por energía dispersiva para determinar la relación estequiometría del material

DESARROLLO EXPERIMENTAL

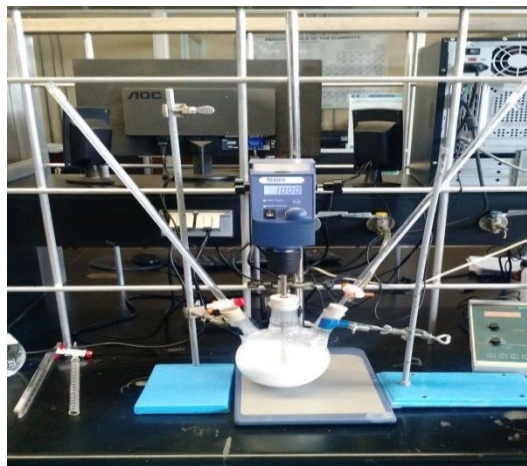
SINTESIS DE HIDROXIAPATITA

En una balanza analítica se pesó 13.955 g de óxido de calcio(CaO) y se añadió 250 mL de agua desionizada en un matraz de bola de 1 L, con agitación de 1000 rpm temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción es la siguiente: $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{OH})_2$

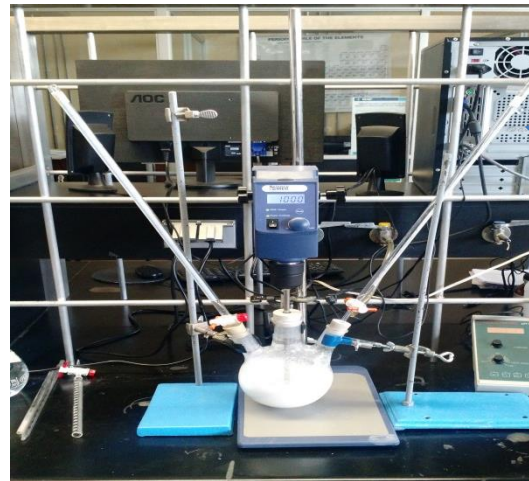


A las 24 se le añade 10.186 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) con agitación permanente a 1000 rpm durante 24 horas, la reacción química ha sido reportada en la literatura, se puede ver su ecuación química: $10\text{Ca}(\text{OH})_2 + 6\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18\text{H}_2\text{O}$ ⁽³⁾.

10.186 ml. H3 PO4



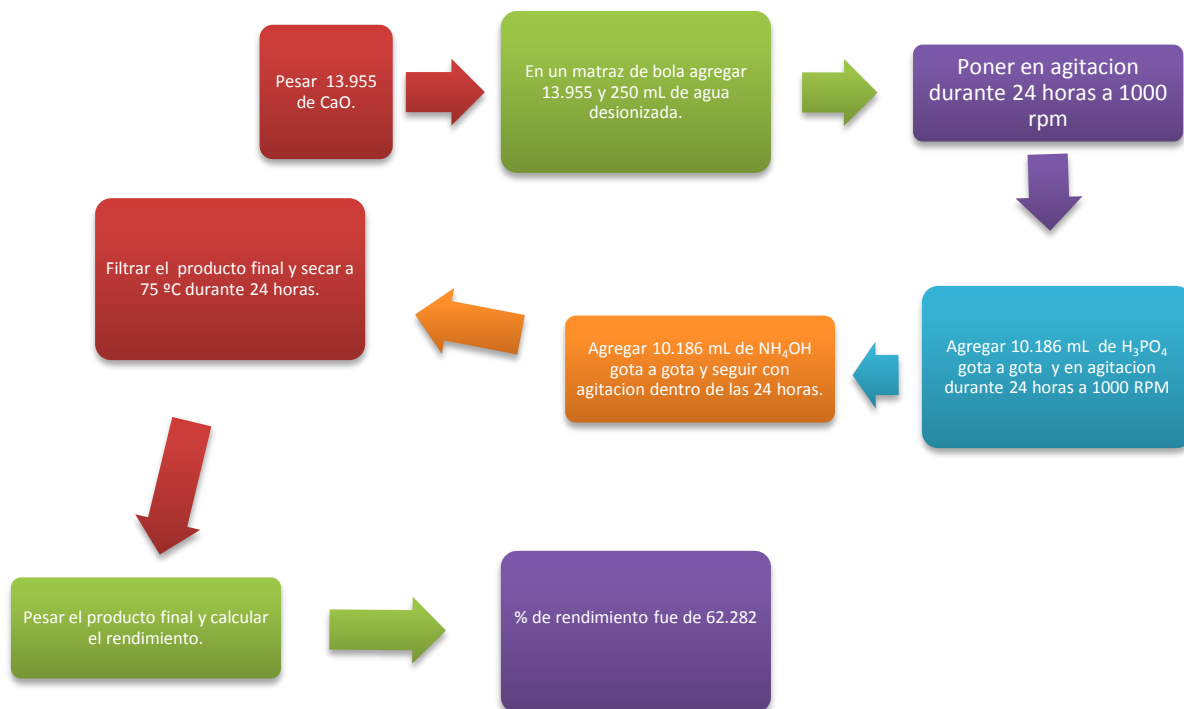
Dentro de las 24 horas y en agitación a 1000 rpm se le agrega 11 mL de hidróxido de amonio para permitir que el pH esté por encima de 9, si su valor es inferior no se forma el compuesto esperado.



10.186 ml
NH₄OH

Terminada la síntesis se mide el pH, se filtra y se deja secar por 24 horas a 75°C, se valora la cantidad obtenida y se determina su porcentaje de rendimientos.

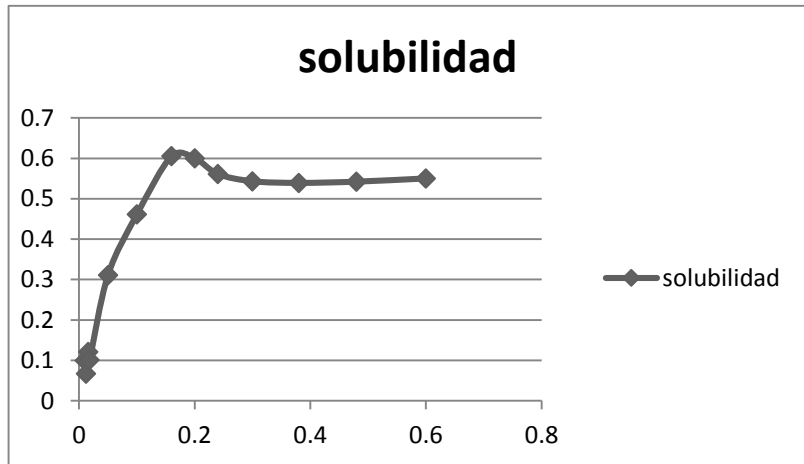
Diagrama de flujo



SOLUBILIDAD

Agua a 25°C

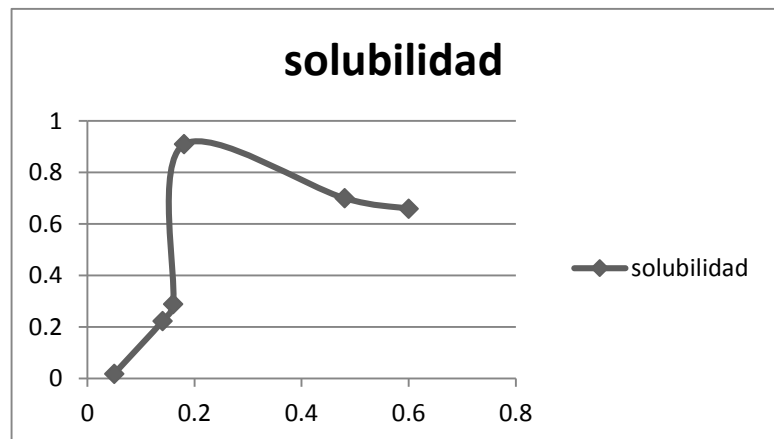
Gramos	solubilidad
0.01	0.099
0.012	0.067
0.016	0.121
0.018	0.101
0.05	0.311
0.1	0.461
0.16	0.605
0.2	0.6
0.24	0.561
0.3	0.543
0.38	0.539
0.48	0.542
0.6	0.55



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.605

Agua a 37°C

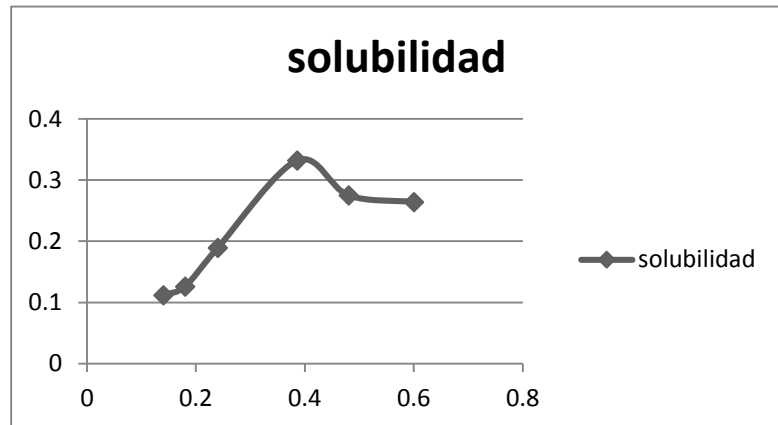
Gramos	solubilidad
0.05	0.017
0.1403	0.222
0.1601	0.288
0.1803	0.909
0.4802	0.7
0.6002	0.659



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.909

Agua a 42°C

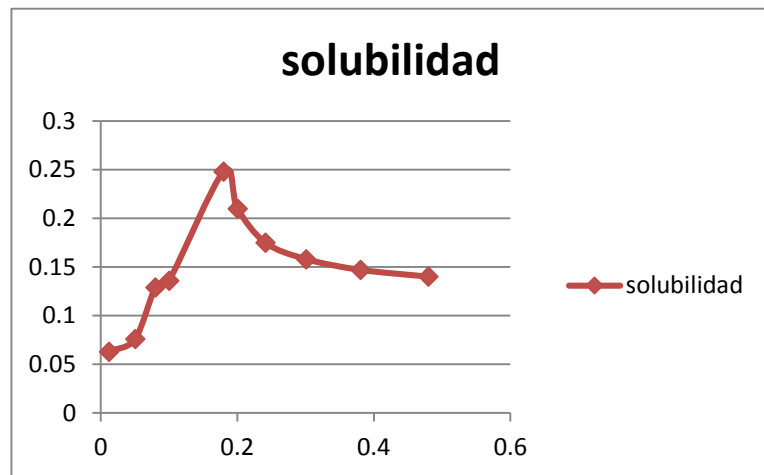
Gramos	solubilidad
0.1404	0.112
0.1804	0.126
0.2401	0.189
0.3862	0.332
0.4804	0.275
0.6003	0.264



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.332

etanol a 25°C

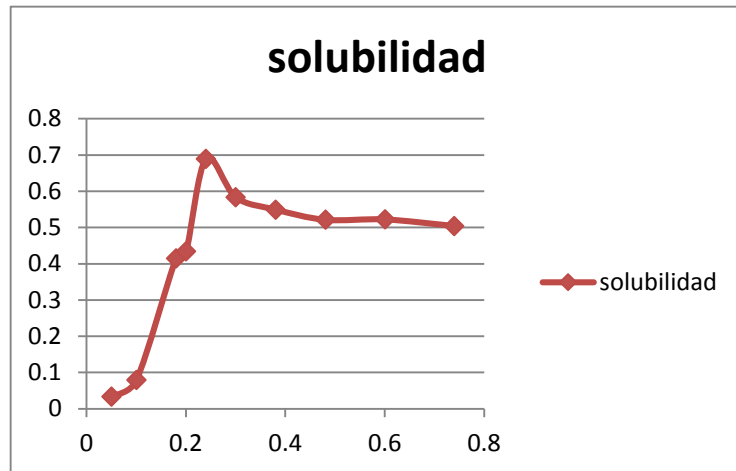
Gramos	solubilidad
0.012	0.063
0.0503	0.076
0.0802	0.129
0.1002	0.136
0.18	0.248
0.2003	0.21
0.2412	0.175
0.301	0.158
0.3807	0.147
0.4801	0.14



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.248

etanol a 37°C

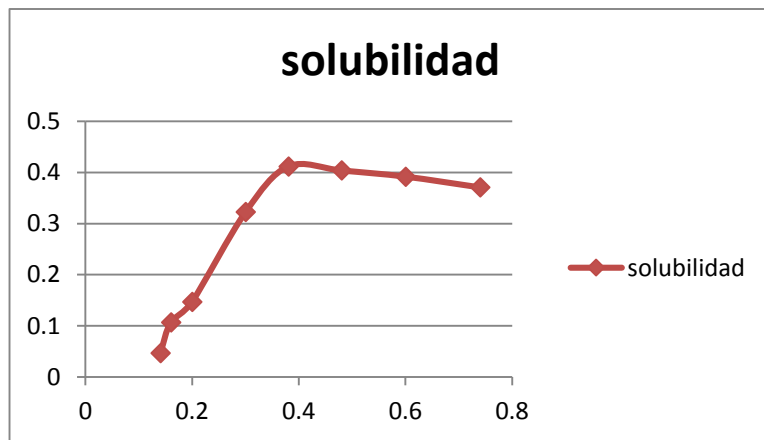
Gramos	solubilidad
0.0502	0.033
0.1001	0.079
0.18	0.415
0.2003	0.434
0.2403	0.689
0.3003	0.583
0.3807	0.549
0.4807	0.521
0.6006	0.522
0.74	0.504



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.689

Etanol a 42°C

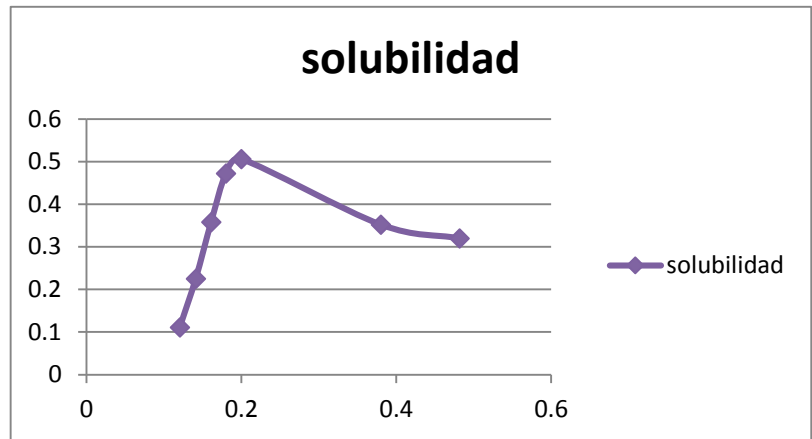
Gramos	solubilidad
0.1408	0.047
0.1604	0.107
0.2001	0.147
0.3006	0.323
0.3806	0.412
0.4807	0.404
0.6005	0.392
0.74	0.371



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.412

Solución harmann

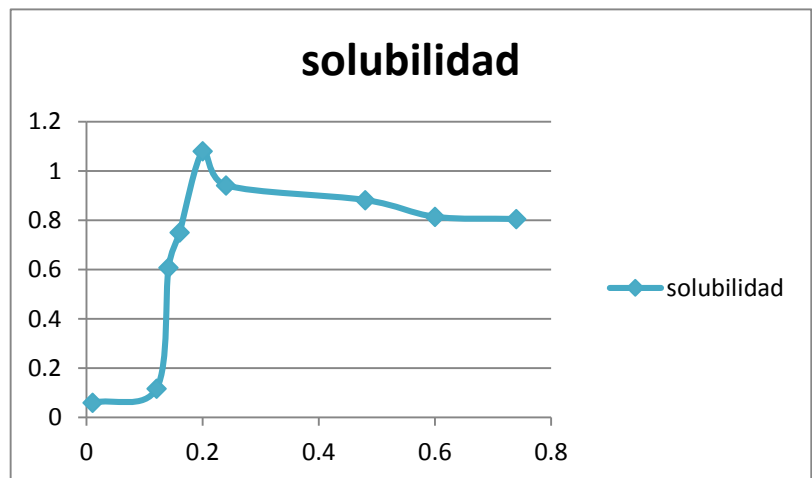
Gramos	solubilidad
0.1205	0.111
0.1411	0.225
0.161	0.358
0.18	0.472
0.2001	0.506
0.3803	0.352
0.4816	0.32



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.506

Metanol a 25°C

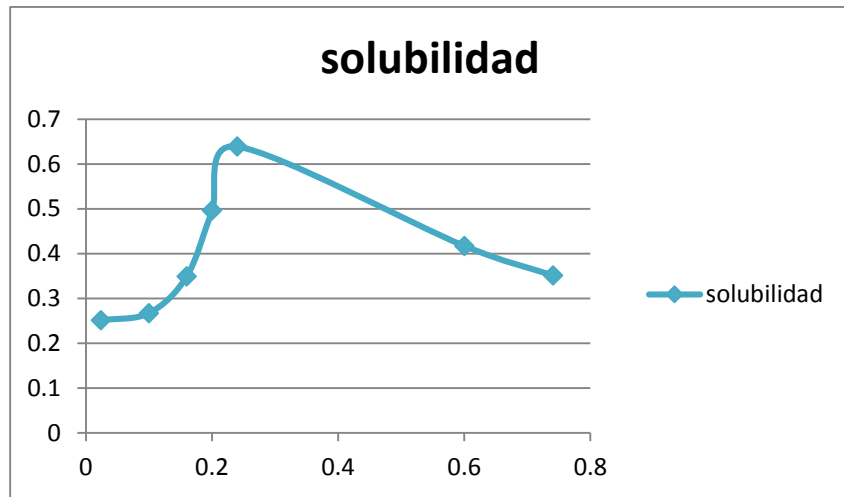
Gramos	solubilidad
0.0105	0.059
0.1206	0.117
0.141	0.607
0.1601	0.751
0.2002	1.08
0.2401	0.942
0.48	0.882
0.6	0.814
0.7401	0.805



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 1.08

Metanol a 37°C

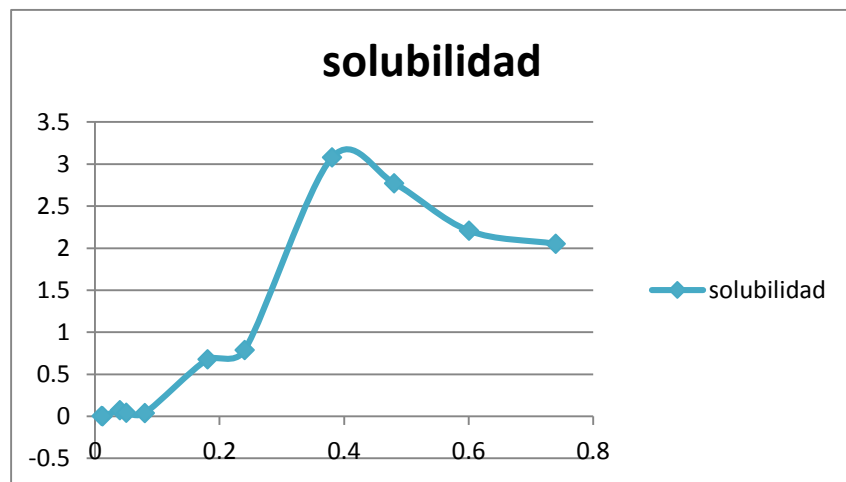
Gramos	solubilidad
0.0243	0.251
0.1001	0.267
0.16	0.349
0.2003	0.496
0.24	0.639
0.6004	0.417
0.741	0.351



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.639

Metanol a 42°C

Gramos	solubilidad
0.0104	0.004
0.0122	0.002
0.0401	0.071
0.0503	0.041
0.0801	0.04
0.1806	0.679
0.2403	0.789
0.3807	3.079
0.4806	2.771
0.6007	2.206
0.74	2.0508



La solubilidad estándar máxima alcanzada fue de 0.3.079

SOLUBILIDAD DE REFERENCIA

a).- Se pesa 0.1 gramos de Hidroxiapatita y en un matraz Erlenmeyer de 50 mL se le agregan 10 gramos de solvente, se agita y se aumenta la temperatura hasta que la muestra se disuelva. Los solventes fisiológicos usados son : Agua destilada, Etanol, Buffer citratos, Buffer fosfatos, también se probó con metanol y alcohol isopropílico.

b).- Se introduce el matraz Erlenmeyer a un Baño María que contiene control de temperatura: WaterBath CIVEQ HH-2 durante 20 días, para asegurar la completa cristalización de la muestra que se encuentra en exceso.

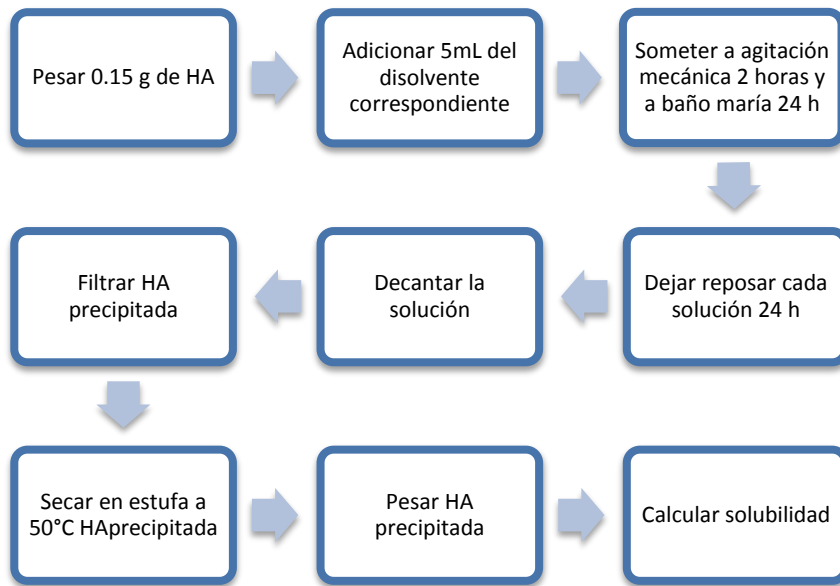
c).- Valorar la solubilidad: Se pesa el papel filtro en Whatman qualitative 3, se deja secar 24 horas y se vuelve a pesar. Previamente se mide el pH de cada solución.

METODOLOGÍA: En todos los casos se pesaron 5 muestras que fueron valoradas y el resultado fue un promedio, se muestra el ejemplo de la solubilidad de referencia de HA en etanol:

Muestra	g de HA	g de papel filtro	Papel + HA	Diferencia	Solubilidad: g de soluto por cada 100 g de solvente	pH
1	0.1009	0.4727	0.5647	0.0089	0.089	8.9
2	0.1014	0.4685	0.5609	0.0090	0.09	9.3
3	0.1014	0.4689	0.5621	0.0082	0.082	9.1
4	0.1009	0.4669	0.5450	0.00228	0.0228	9.11
5	0.09979	0.4789	0.5660	0.01269	0.1269	8.84
				Promedio	0.082	9.01

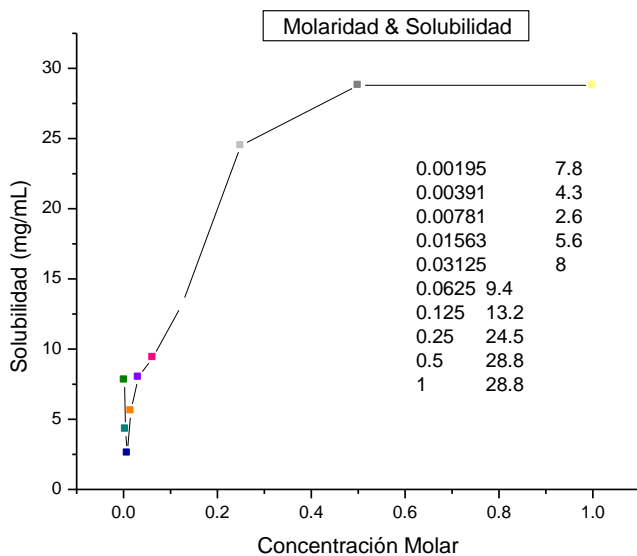
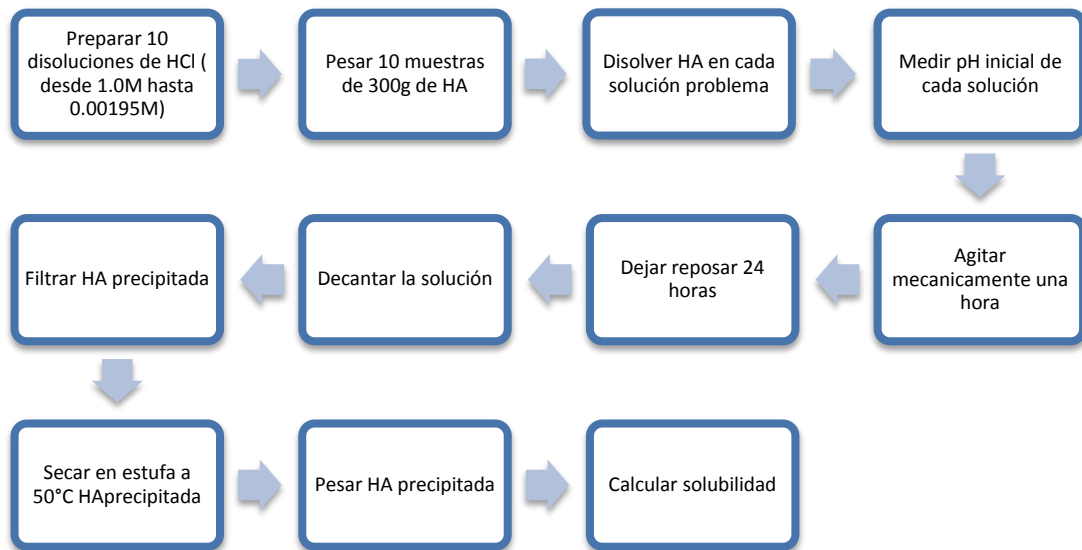
SOLUBILIDAD ESTANDAR

Se colocó 0.100 g de hidroxiapatita y se le adicionó 10 gramos del disolvente correspondiente: agua destilada, solución Harman, buffer de fosfatos, buffer de citratos, etanol, metanol posteriormente se sometió a agitación mecánica durante 1 hora y en baño maría 24 horas a distintas temperaturas: 25°C, 37°C y 42 °C. Después se dejó reposar durante 24 horas, luego se decantó la solución en un vaso de precipitado, se filtró la hidroxiapatita precipitada y se colocó el papel filtro en la estufa a 50°C para secarla durante 2 horas. Las muestras secas se pesaron en la balanza analítica y se realizaron cálculos de la solubilidad mediante la cantidad de HA disuelta por diferencia de peso.



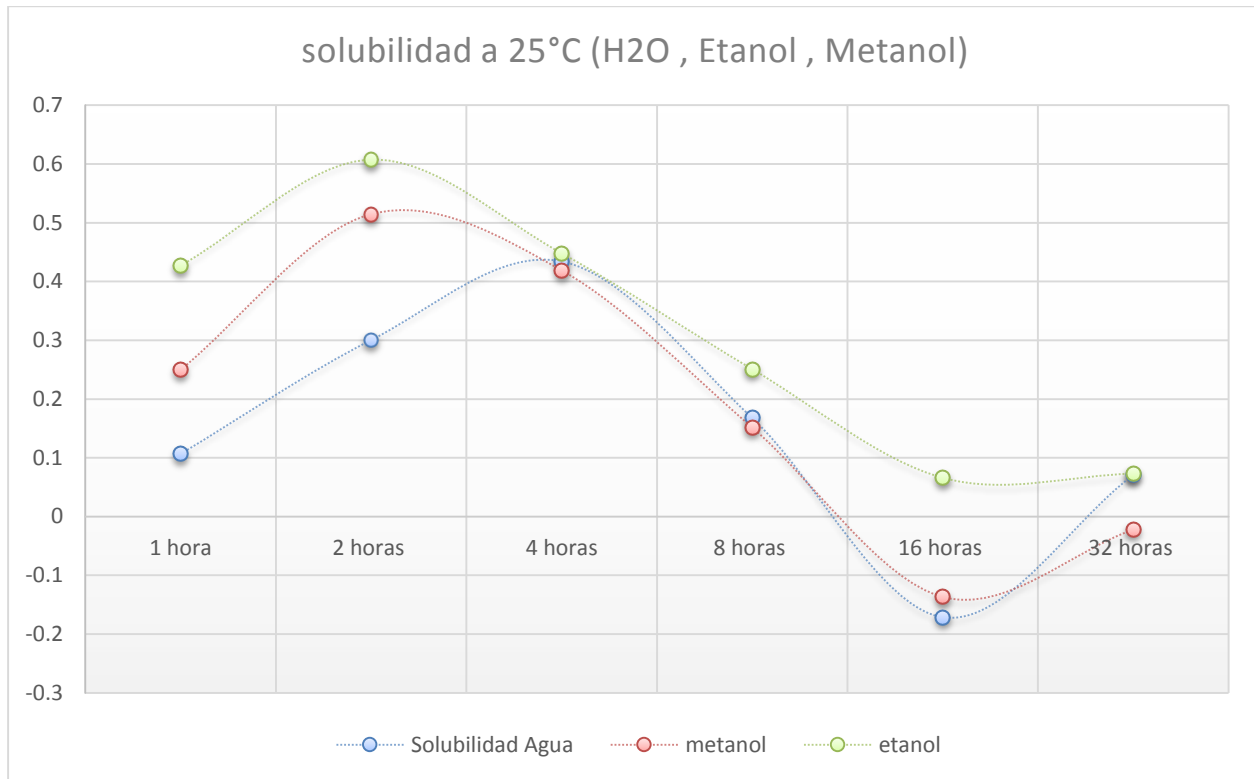
SOLUBILIDAD EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

Se prepararon 10 disoluciones de ácido clorhídrico con diferentes concentraciones (desde 1.0 M hasta 0.00195 M) después se pesó en la balanza analítica 10 muestras de 300 mg de hidroxiapatita, se disolvieron con su respectivo solvente, y se les midió el pH inicial, las soluciones se agitaron durante 1 hora y se dejaron reposar durante 24 horas, se decantaron y finalmente se filtró la HA precipitada. Por último se determinó la solubilidad de cada muestra. Este procedimiento se llevó a cabo a: 25°C, 37°C y a 42°C.

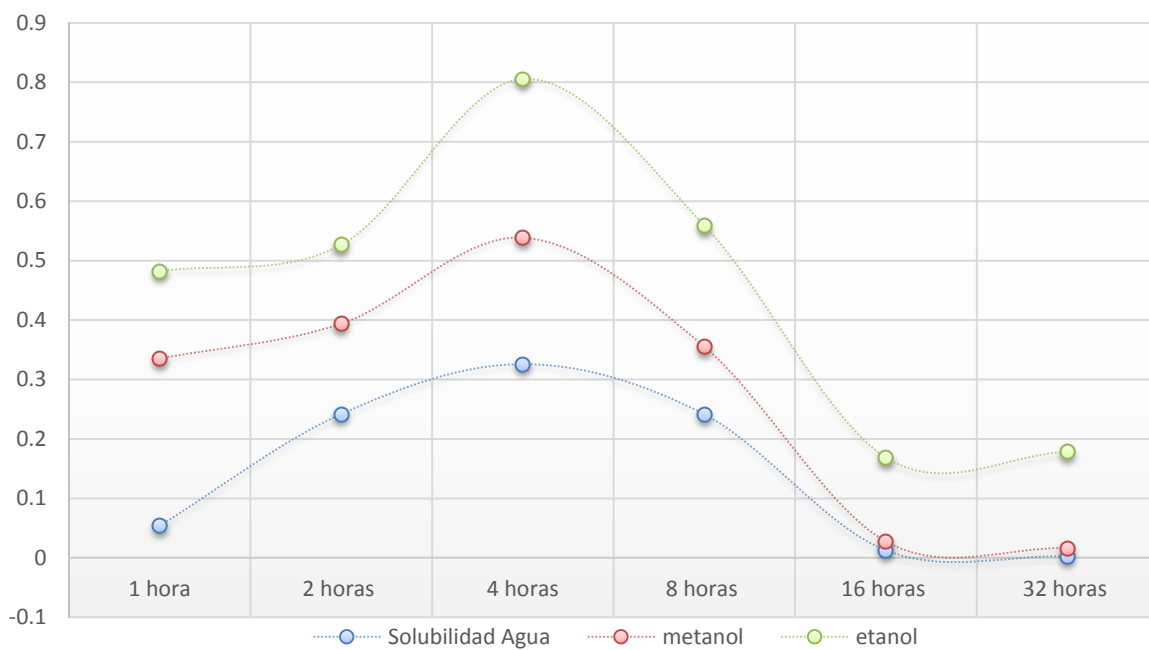


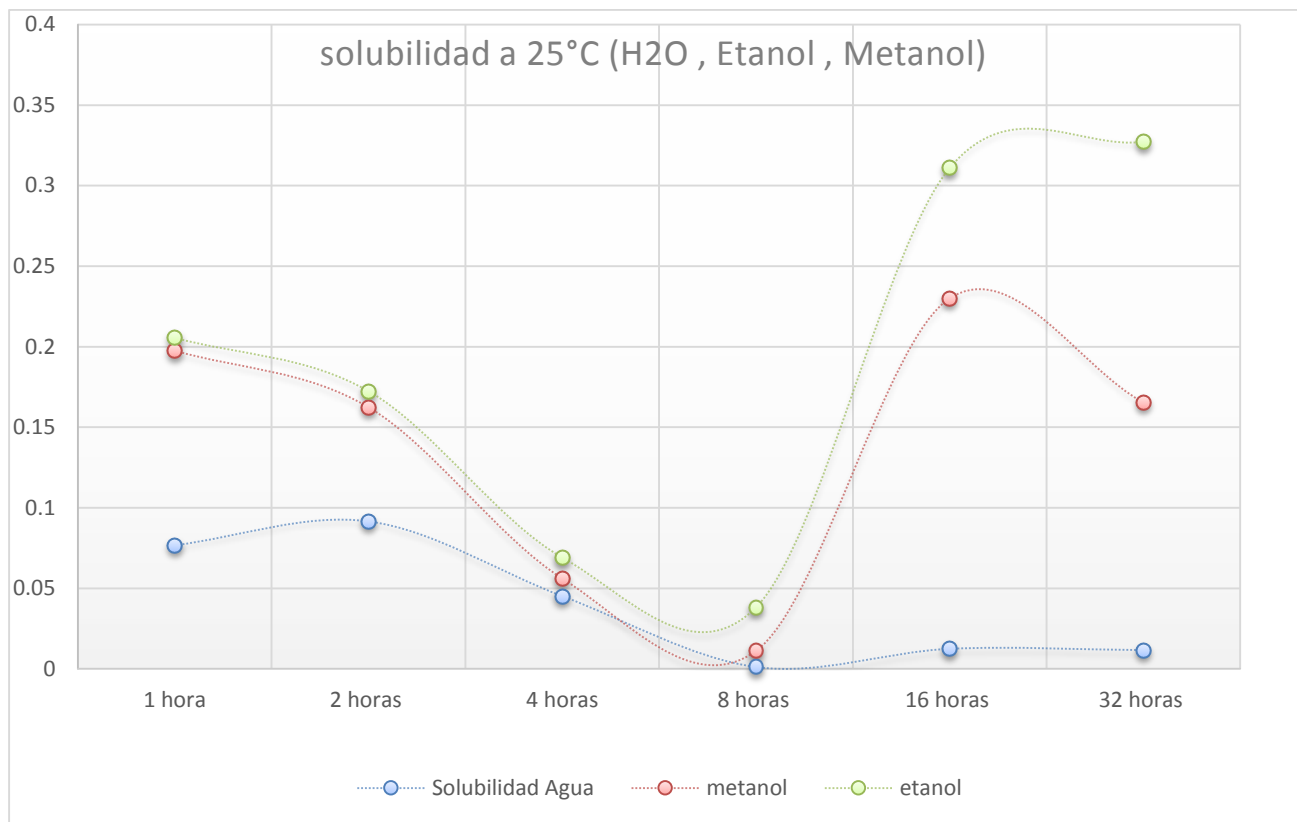
Se midió la solubilidad de HA en ácido clorhídrico, es conocido a través de la literatura que la hidroxiapatita es soluble en ácido clorhídrico, sin embargo fue demostrado que su solubilidad cambia con la concentración, es decir que si la concentración disminuye también disminuye su solubilidad, como se puede apreciar en la gráfica.

SOLUBILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO



solubilidad a 37°C (H2O , Etanol , Metanol)

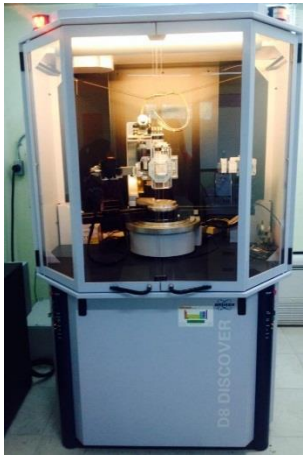




CARACTERIZACIÓN

DIFRACCION DE RAYOS X

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.



Las muestras fueron analizadas en el laboratorio del "Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología OCT-BUAP". La difracción de Rayos X se utilizó con el propósito de corroborar que los productos de síntesis fueran los deseados, 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. Para hacer la difracción de rayos X de las muestras se utilizó el equipo marca BRUKER, modelo 78 Discover. Las mediciones se realizaron en un intervalo desde de 20 a 80° (2 θ), en un intervalo angular 0.040° y con un tiempo de conteo de 6 s, con radiación Cu K α (1.5406 Å). Resultados de difracción de rayos X. Se

presenta el difractograma de la muestra de hidroxiapatita obtenida a 20°C, en donde al ser comparadas las reflexiones de nuestra muestra, con las de una ficha de hidroxiapatita reportada, se puede decir que hay similitud entre ambas y por tanto hacer mención de que está presente el compuesto buscado, sin embargo gracias a estas comparación entre difractogramas se muestra que están presentes fosfatos de calcio libres. El parámetro importante es la Ley de Bragg, $n\lambda=2d\text{sen}\theta$, establecida en 1913 por los físicos británicos William Henry Bragg y William Lawrence Bragg, permite estudiar las direcciones en las que la difracción de rayos X sobre la superficie de un cristal produce interferencias constructivas, permite predecir los ángulos en los que los rayos X son difractados por un material con estructura atómica periódica es decir materiales cristalinos, confirma la existencia de partículas reales en la escala atómica, proporcionando una técnica muy poderosa de exploración de la materia, es posible obtener experimentalmente información sobre: La fase cristalina, tamaño de grano, parámetro de red y distancia interplanar⁽¹³⁾, de aquellos cristales de materiales a investigar, como resultado de la información que nos proporciona un difractómetro, analizamos el difractograma donde se grafica el ángulo (2 θ) de incidencia del haz contra la intensidad expresada en unidades arbitrarias, al investigar un material como en este caso a la hidroxiapatita y su difractograma, se interpreta el espectro de acuerdo a la posición de los picos localizados en las correspondientes posiciones angulares, estos son comparados con la base de datos de los estándares internacionales, esto es muy importante porque permite identificar el material investigado, su fase cristalina y los parámetros asociados con el cristal, el difractograma de nuestro material es el siguiente.

Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es aplicada a materiales biológicos donde la absorción de éstos materiales biológicos complejos están representados por bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de sus constituyentes. Mediante el IR serán observados los grupos funcionales de la HA.

Los espectros FT-IR nos permitirán analizar, a través de picos característicos en la muestra de hidroxiapatita la presencia de otra fase 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 espectro 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.

La máquina utilizada 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^{-1}

Se coloca la muestra en el equipo y se lanza el análisis y el resultado se muestra en 30 segundos. La curva que arroja el equipo representa la absorbancia de la energía según la longitud de onda. Y ésta se puede transformar en transmitancia en el mismo equipo.

Espectroscopia de infrarrojo

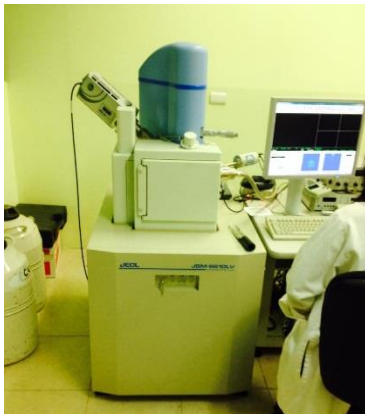
La espectrometría de infrarrojo es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra.

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional.

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones.

Microscopia Electrónica de Barrido

Scanning Electron Microscope, SEM: 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 (lámina 2A). 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 con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del SEM 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.



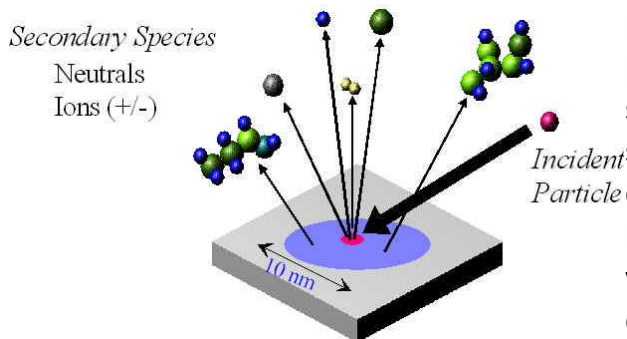
Para realizar la microscopia electrónica de Barrido (MEB) se utilizó el equipo marca Jeol modelo JSM-6610LV, operado en el modo de alto de vacío, equipado con detectores que permiten la obtención de imágenes de electrones retrodispersados. Se realizó un microanálisis cualitativo para observar la morfología de los cristales obtenidos, las muestras fueron previamente fijadas con cinta de grafito y metalizadas con Au a fin de garantizar su conductividad.

Este instrumento 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 observar los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de diversos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

Se muestran las micrográficas de los cristales de hidroxiapatita que ha sido obtenida a aproximadamente a 20°C. Comparando las micrográficas obtenidas se puede observar que los cristales de la HA sola están aglomerados y presentan un tamaño de nm aproximadamente. El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativo y de distribución de elementos en superficies ⁽⁵⁾.

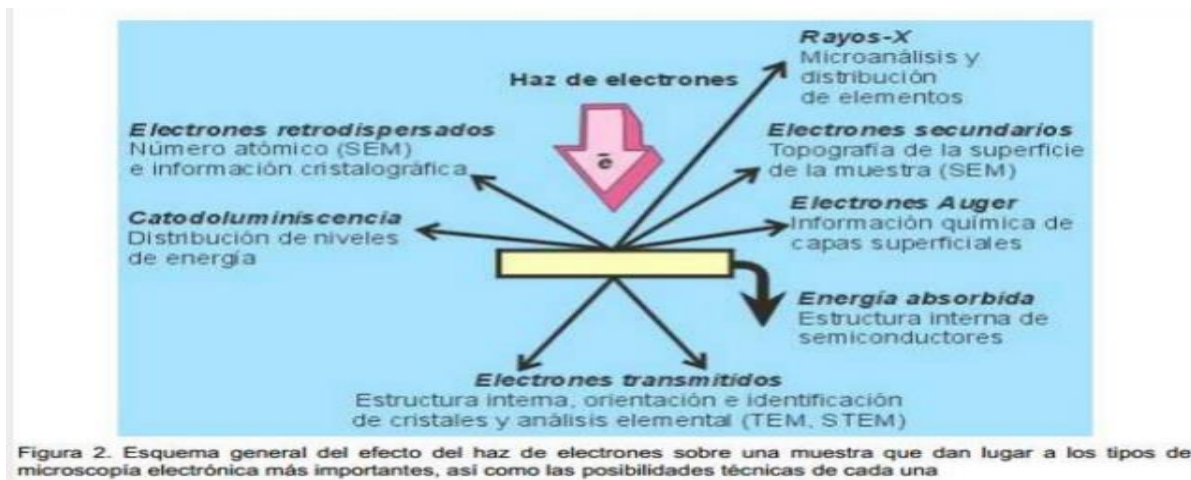
Espectrómetro de Energía Dispersiva(Energy Dispersive Spectrometer, EDS).

La espectroscopia de Energía Dispersiva de rayos X (EDS), es una técnica no destructiva que permite el estudio de superficie de alta resolución, consiguiendo una imagen al detalle de la capa y el microanálisis de rayos X, para determinar los elementos químicos constituyentes de la muestra y cuantificarlos. Se bombardea un haz de electrones que impactan en la superficie de la muestra distribuyéndose de manera elástica o inelástica. Aquellos que se distribuyen de manera elástica, manteniendo su energía cinética, son los llamados electrones retrodispersados, son aquellos que proporcionan la imagen cualitativa de zonas con diferente número atómico, son más energéticos que los electrones secundarios y emergen de zonas más profundas. En el impacto algunos electrones primarios transfieren una parte de su energía cinética a los átomos, provocando la ionización del átomo por expulsión de un electrón, llamado electrón secundario. La energía de los electrones secundarios es muy débil, por tanto únicamente los electrones liberados de las capas superficiales surgen del material ⁽¹⁰⁾. El detector de energía dispersiva, EDS, permite recolectar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de elementos químicos presentes en superficies, como la energía de cada rayo X es característica de cada elemento, podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de áreas del tamaño que deseamos de la superficie. Por ello se conoce esta técnica como Microanálisis ⁽⁶⁾. Cuando los electrones primarios golpean la



muestra, son emitidos electrones secundarios por el propio espécimen. Estos electrones secundarios son atraídos por un colector donde se aceleran y se dirigen al escintilador, donde la energía cinética es convertida en puntos de mayor o de menor luminosidad, es decir, en luz visible. Esta luz es dirigida a un amplificador donde se convierte en señal eléctrica, la cual

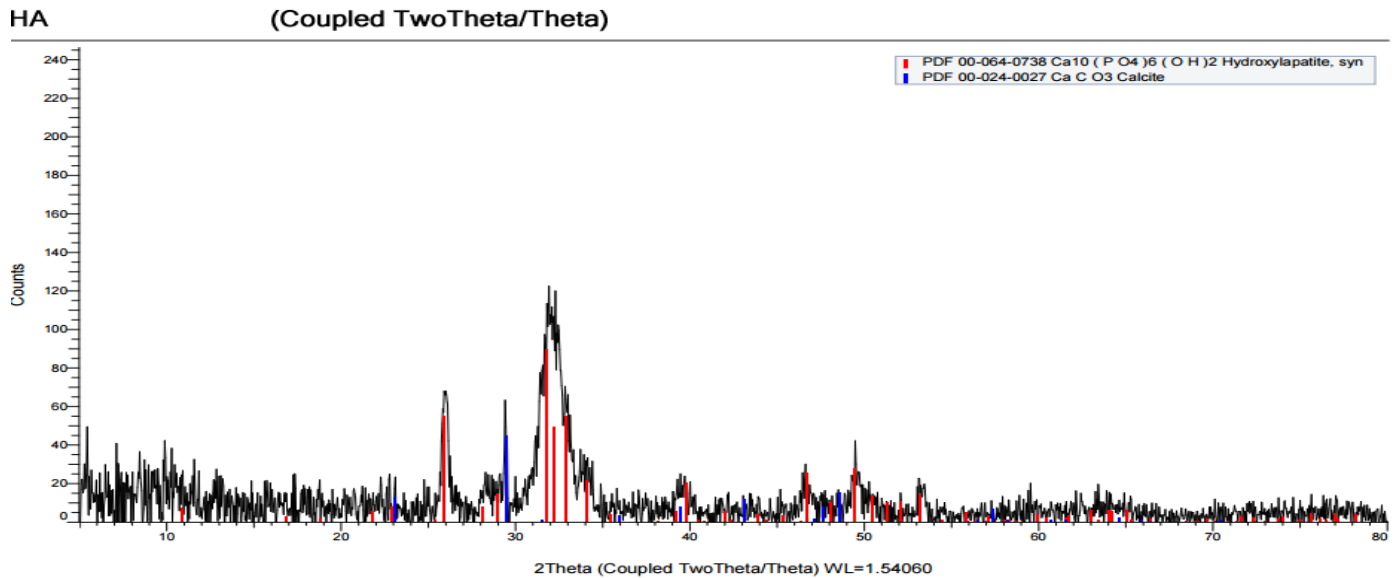
pasa a una pantalla de observación donde la imagen es formada línea por línea y punto por punto. Los circuitos que dirigen las bobinas de barrido (que obligan al haz a barrer la muestra), son las mismas que dirigen la parte de colección de electrones y que producirán la imagen ⁽⁷⁾. La microscopía electrónica de barrido es una técnica que sirve para analizar la morfología de materiales sólidos de todo tipo (metales, cerámicos, polímeros, biológicos, etc.), con excepción de muestras líquidas. La resolución permite estudiar características de los materiales a una escala muy pequeña y sirve para hacer análisis elemental. Con esta técnica se pueden detectar todos los elementos químicos con número atómico mayor a 4 de manera cualitativa y semicuantitativa. Una de las grandes ventajas respecto a otro tipo de microscopía es la facilidad de preparación de muestras ya que sólo en casos especiales se puede tornar laboriosa⁽⁸⁾, se producen cuando un electrón del haz pasa muy cerca del núcleo de un átomo de la muestra, proporcionando la suficiente energía a uno o varios de los electrones interiores para saltar fuera de la muestra. Estos electrones son de muy baja energía (por debajo de 5 keV), por lo que deben encontrarse muy cerca de la superficie para poder escapar. Precisamente por eso proporcionan una valiosa información topográfica de la muestra, y son los utilizados principalmente en microscopía de barrido⁽⁹⁾.



El resultado de las energías dispersivas se puede ver y analizar en los espectros y en las gráficas, así como en las micrografías y las tablas que nos muestran el microanálisis elemental de la muestra de hidroxiapatita, HA, se trata de electrones secundarios que emergen de la superficie del polvo de HA con una energía inferior a 50 keV, solo los elementos que están más próximos a la superficie tienen alguna probabilidad de escapar y proporcionan una imagen tridimensional, si el electrón se desprende de capas internas el átomo regresa a su estado basal liberando energía mediante un fotón con frecuencia que corresponde a los rayos X que son característicos de cada elemento químico, en el espectro se puede observar que los rayos X característicos tienen una cierta intensidad para una determinada longitud de onda y es proporcional a la concentración relativa del elemento químico a esa longitud de onda.

RESULTADOS

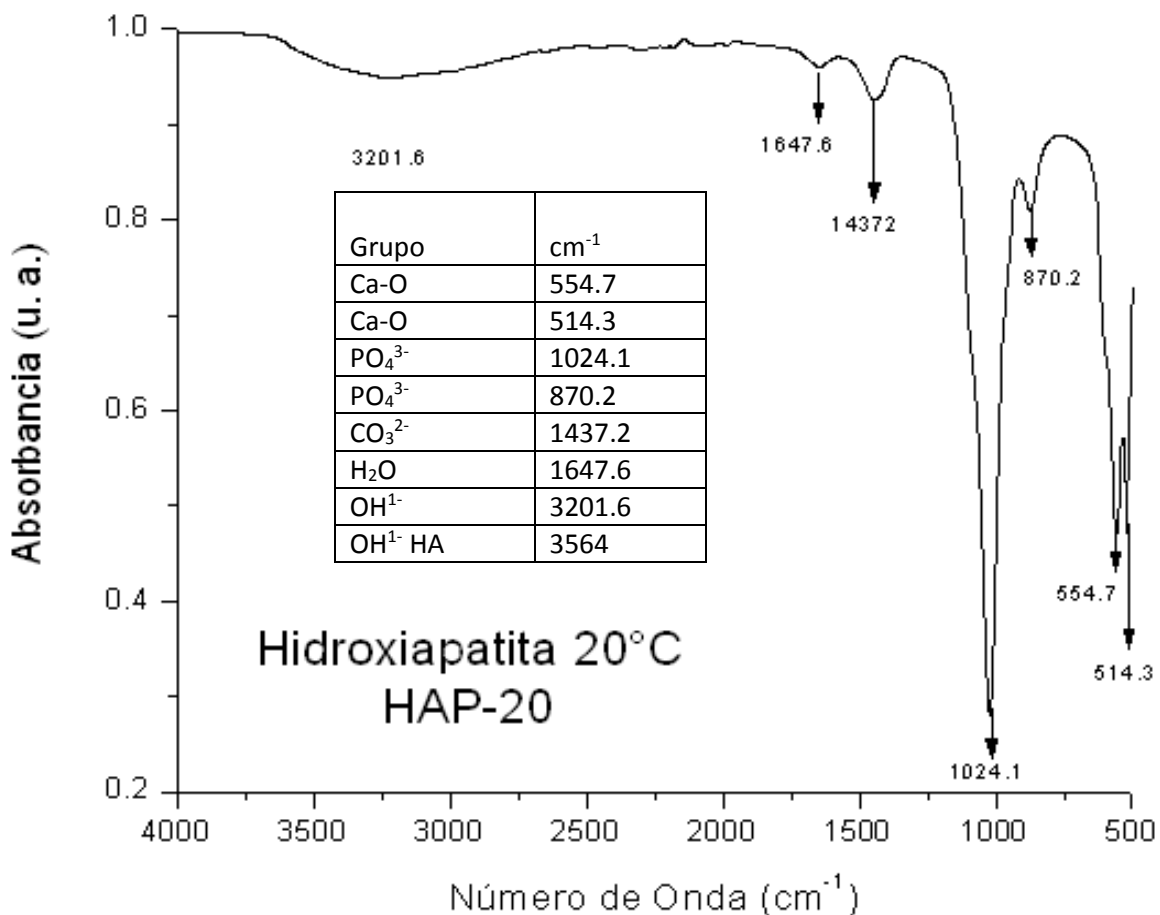
Difracción de Rayos X

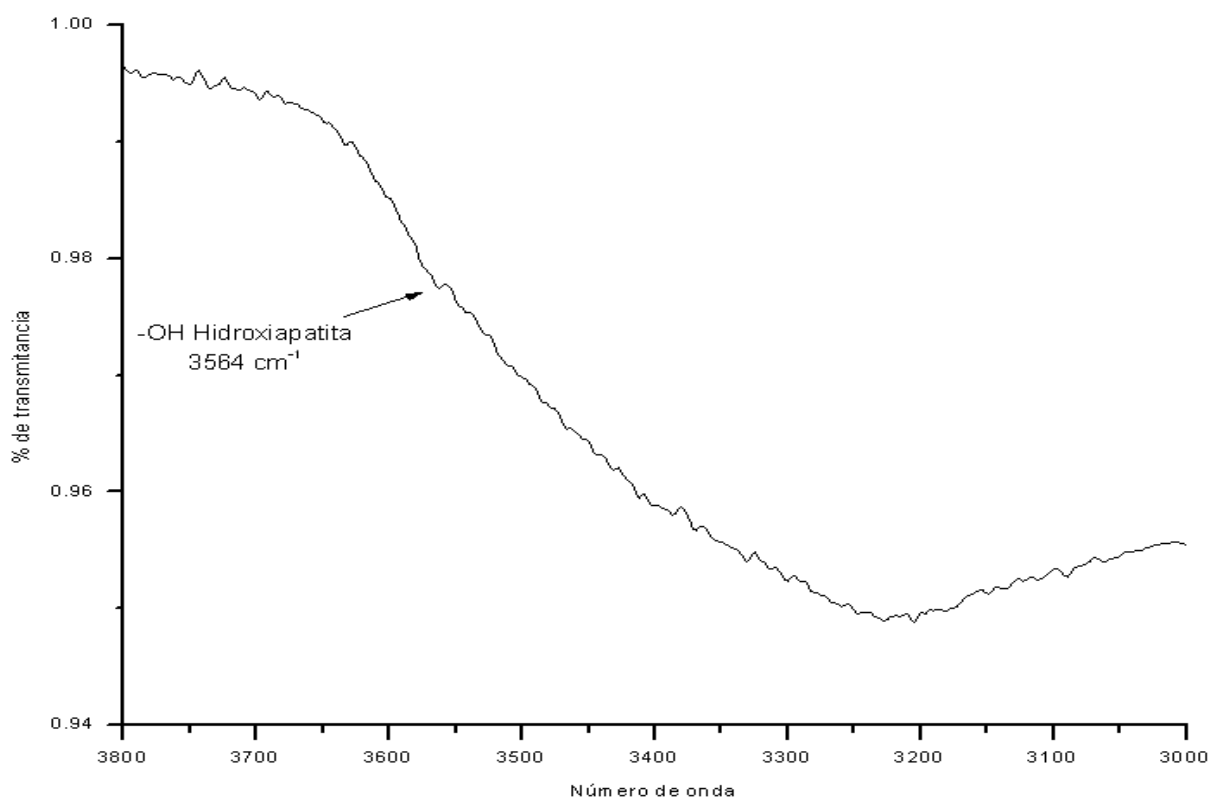


d	2θ	h	k	l	Geometría	I (intensidad)
3.43995	25.880	0	0	2	Hexagonal	614
3.08373	28.931	1	2	0		164
2.81399	31.774	1	2	1		1000
2.77806	32.196	1	1	2	hexagonal	549
2.71964	32.907	0	3	0		614
2.62979	34.065	0	2	2		238
2.26284	39.804	1	3	0		231
1.94337	46.703	2	2	2	Cúbico	286
1.94337	46.703	1	2	3		307
1.72000	53.211	0	0	4	Hexagonal	154

El Difractograma de Hidroxiapatita muestra que se trata de un material cristalino cuya estructura es hexagonal mezclada con la estructura romboédrica de la calcita, lo cual se comprueba más adelante con otros resultados, las señales más importantes las encontramos en los siguientes datos del ángulo 2θ : 25.880, 28.931, 31.774, 32.196, 32.907, 34.065, 39.804, 46.703, 49.491 y 53.211, que corresponden a los picos de los planos de reflexión (002), (120), (121), (112), (030), (022), (130), (222), (123) y (004), respectivamente estos datos coinciden con la información que ha sido publicada en la literatura, la mayoría corresponde a la estructura cristalina hexagonal, con excepción de la reflexión (222) que corresponde a cúbica, las longitudes son las siguientes: $a = b = 9.42100$; $c = 6.8800$, los ángulos son respectivamente: α, β son ángulos de 90° y $\gamma = 120^\circ$. Lo anterior se encuentra resumido en la siguiente tabla.

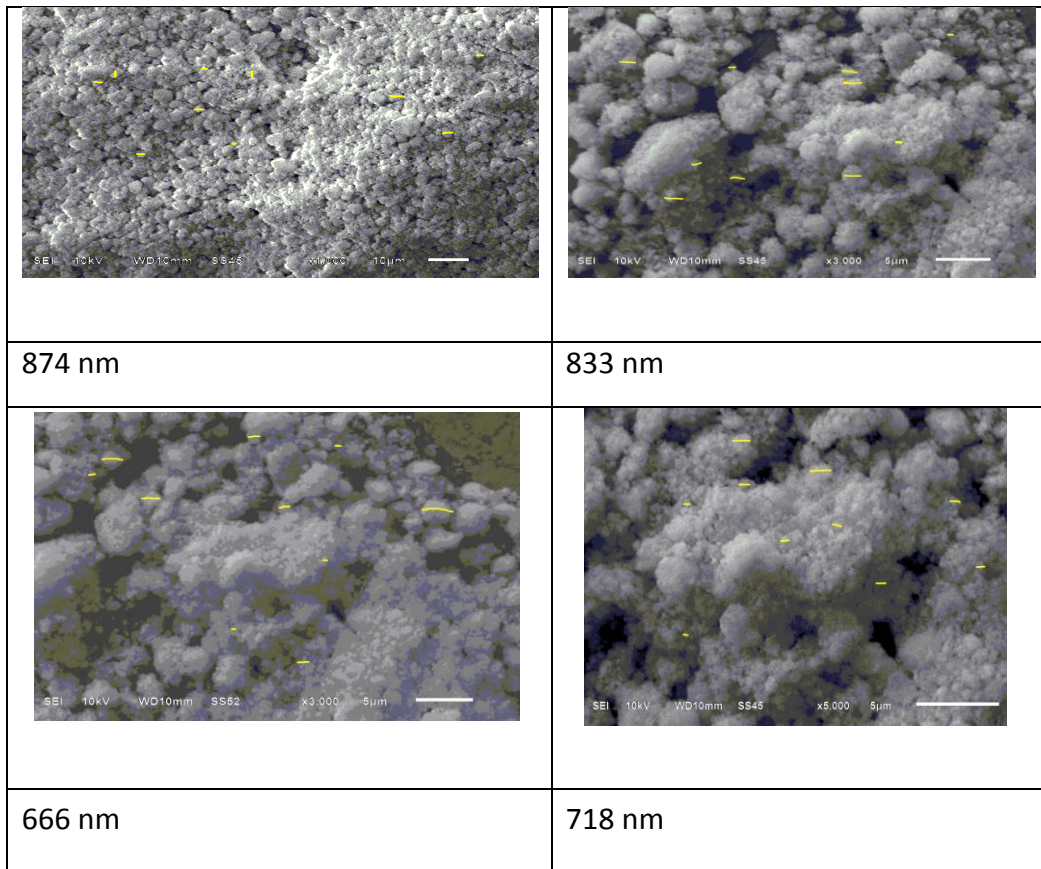
Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)





Se presenta el espectro de infrarrojo de la muestra de hidroxiapatita tratada a 20 °C las bandas observadas a 554.7 cm⁻¹ y 514.3 cm⁻¹ características de vibraciones del enlace metal oxígeno, lo cual nos muestra la presencia de las interacciones entre el calcio y el oxígeno, la banda aguda que aparece a 1024.1 cm⁻¹ y 870.2 cm⁻¹ corresponden al grupo funcional fosfato, PO₄³⁻⁽¹⁾ tanto el estiramiento como el doblado de los enlaces químicos. A 1437.2 cm⁻¹ se observa una banda débil que corresponde a las vibraciones carbono oxígeno característico del grupo funcional de los iones carbonato, CO₃²⁻, no muestra la presencia del dióxido de carbono durante la reacción química. La banda alrededor de los 1647.6 cm⁻¹ puede ser atribuida a los cambios en el ángulo de enlace del hidrógeno en aguas cristalizadas, a 3201.6 cm⁻¹ aparece una banda ancha muy característico de absorción de los grupos funcionales oxidrilos, OH⁻¹ finalmente encontramos la banda de absorción más importante que ha sido reportado en diferentes publicaciones ⁽⁴⁾, característica de la Hidroxiapatita a una longitud de onda de 3564 cm⁻¹.

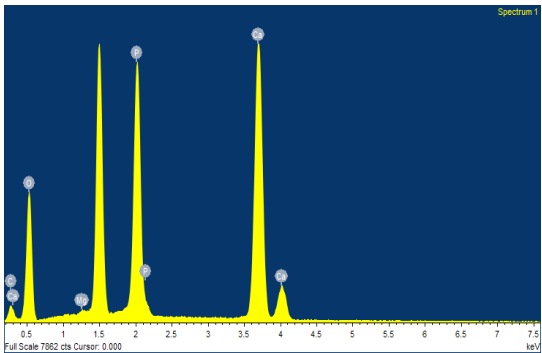
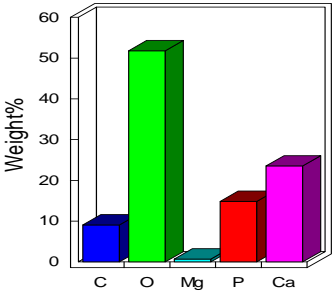
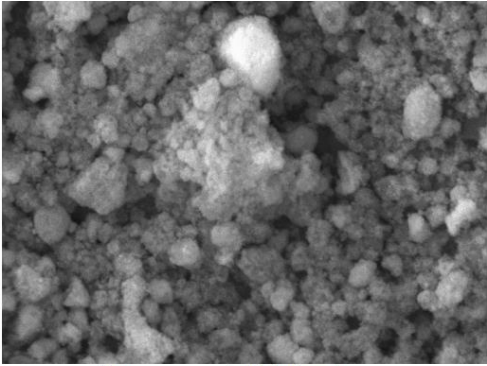
Microscopia Electrónica de Barrido

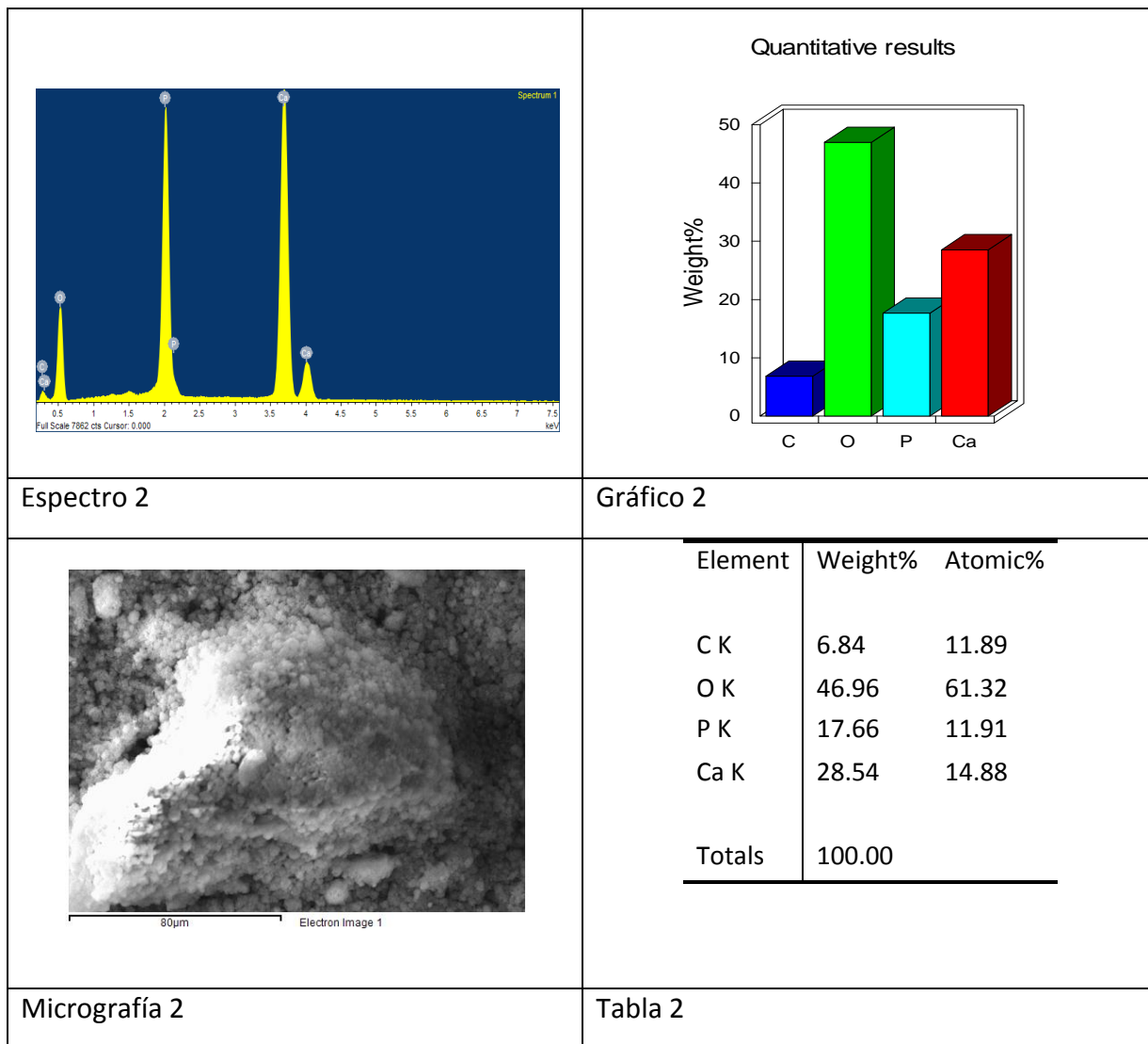


Secondary Electron Image	Ampliación	Promedio en nm
SEI	1000X	874
SEI	3000X	833
SEI	3000X	666
SEI	5000X	718
	Promedio en nm	773

La textura se muestra en las micrografías que permiten la comparación del tamaño de las partículas de HA obtenida a 20°C, el polvo blanco observado a simple vista parece tener una textura amorfa y aún a los acercamientos de 1000X, 3000X y 5000X no se puede determinar si tiene una estructura cristalina, sin embargo es posible determinar el tamaño promedio de estos aglomerados: Si la ampliación es 1000X el tamaño promedio de las partículas es de 874 nm; si la ampliación es de 3000X el tamaño oscila entre 833 y 666 nm y si la ampliación es de 5000X el tamaño promedio es de 718 nm, lo cual nos permite suponer que el tamaño de las partículas tiene un promedio de 773 nm.

Espectrometro de Energia Dispersiva

	<p>Quantitative results</p> 																					
<p>Espectro 1</p>	<p>Gráfico 1</p>																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Element</th> <th>Weight%</th> <th>Atomic%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C K</td> <td>9.09</td> <td>14.86</td> </tr> <tr> <td>O K</td> <td>51.80</td> <td>63.60</td> </tr> <tr> <td>Mg K</td> <td>0.73</td> <td>0.59</td> </tr> <tr> <td>P K</td> <td>14.85</td> <td>9.42</td> </tr> <tr> <td>Ca K</td> <td>23.54</td> <td>11.53</td> </tr> <tr> <td>Totals</td> <td>100.00</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Element	Weight%	Atomic%	C K	9.09	14.86	O K	51.80	63.60	Mg K	0.73	0.59	P K	14.85	9.42	Ca K	23.54	11.53	Totals	100.00	
Element	Weight%	Atomic%																				
C K	9.09	14.86																				
O K	51.80	63.60																				
Mg K	0.73	0.59																				
P K	14.85	9.42																				
Ca K	23.54	11.53																				
Totals	100.00																					
<p>Micrografía 1</p>	<p>Tabla 1</p>																					



La información que presentamos en los espectros, gráficas, micrografías y tablas corresponden a la energía dispersiva de la misma muestra, nos proporciona la información de esa pequeña muestra analizada, dos muestras que proporcionan que el material en su superficie está constituida por Calcio, Fósforo, Oxígeno como es de esperarse, hay una composición porcentual muy importante de carbono que se justifica por la influencia que tiene el dióxido de carbono, CO₂, de la atmósfera en el momento de la síntesis y seguramente influye en la relación estequiométrica. Los resultados nos muestran la transición electrónica desde la capa K de cada uno de los átomos y que corresponde a la frecuencia de los rayos X.

La composición química de las dos muestras examinada por este microanálisis corresponde que en la línea espectral K a 0.3 keV corresponde al átomo de oxígeno y al átomo de calcio; 0.5 keV corresponde al átomo de oxígeno; 1.2 keV corresponde a la concentración de magnesio; a 1.5 keV hay un espectro muy pronunciado en una muestra mucho más que en la otra; entre 2 y 2.1 keV la frecuencia corresponde al átomo de fósforo; entre 3.5 y 3.8 keV hay una señal pronunciada que corresponde al átomo de calcio, a 4 keV nuevamente aparece una señal que corresponde al átomo de calcio. En resumen se puede hacer una comparación entre los resultados obtenidos y la composición porcentual en peso de la hidroxiapatita.

Elemento	Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)	Hidroxiapatita (%)
Carbono	9.09	6.84	0
Oxígeno	51.80	46.96	46.61
Fósforo	14.85	17.66	18.52
Calcio	23.54	28.54	39.84
Magnesio	0.73	0	0

La HA cuya fórmula se conoce bien, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es un fosfato de calcio con una composición muy similar a la del hueso humano; en general a la de todo vertebrado. Es un compuesto biocompatible incluso bioactivo con los tejidos vivos, sus elementos constituyentes son: calcio y fósforo. Con una razón estequiométrica cercana a 1.667^(11, 12). Por tal razón es muy importante revisar en los resultados la referencia de la estequiometría, como podemos ver en la comparación siguiente:

Elemento	Muestra 1. Moles	Muestra 2. Moles	HA. Moles
Calcio	0.5885	0.7135	0.996
Fósforo	0.4790	0.5697	0.5974
Relación estequiométrica: Ca/P	1.2286	1.2524	1.6672

CONCLUSIONES

- 1.- La hidroxiapatita es un material blanco cristalino que se obtuvo por el método de precipitación a temperatura ambiente, 1000 rpm y pH igual a 10.
- 2.- La solubilidad de la HA en solventes fisiológicos y no fisiológicos es muy baja, sin embargo en ácido clorhídrico es muy soluble.
- 3.- Los resultados arrojados por la difracción de Rayos X muestran que los cristales de HA tienen una estructura hexagonal.
- 4.- El espectro de IR nos muestra con claridad la presencia de las interacciones calcio-oxígeno, fosforo-oxígeno de los aniones fosfato y la presencia de los iones oxidrilo.
- 5.- La textura de la HA mostrada por los datos de SEM nos muestran un material aparentemente amorfo, pero corresponde a partículas esféricas de un tamaño promedio de 773 nm.
- 6.- La Espectroscopia de Energía Dispersiva nos muestra el microanálisis de la HA, el porcentaje en peso de Oxígeno y de Fósforo es muy cercano a la HA pura, en cambio el porcentaje de calcio disminuye considerablemente, probablemente por la formación de carbonato de calcio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Bull. Mater. Sci., Vol. 32, No. 5, October 2009, pp. 465–470. © Indian Academy of Sciences.
Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol–gel technique K P SANOSH†, MIN-CHEOL CHU, A BALAKRISHNAN†, T N KIM† and SEONG-JAI CHO
- 2.- Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 5 p. 109-118. Junio 2006 Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia) características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas Marta Elena Londoño¹ Alejandro Echavarría² Francenith De La Calle³
- 3.- V. P. Orlovskii*†, V. S. Komlev**, and S. M. Barinov** Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics Received February 26, 2002; in final form, April 18, 2002
- 4.- U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 75, Iss. 3, 2013 ISSN 1454-2331 SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOHYDROXYAPATITE POWDER USING WET CHEMICAL PRECIPITATION REACTIONS Syed Sibte Asghar ABIDI¹, Qasim MURTAZA²
- 5.- Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. CIMAV Monterrey
- 6.- Universidad Politécnica de Valencia. Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido.
- 7.-
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/melecbarrido.htm>
8. http://www.ccigs.uaemex.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=81&Itemid=83
- 9.- http://www.scai.uma.es/servicios/area_microscopia/sem/sem.html
- 10.- Jafet Portillo Guerrero, Caracterización composicional por microanálisis de películas de SnS₂ obtenido por inyección rápida, Tesis de licenciatura. 2013.
- 11.- LeGeros Racquel, “*Monographs in oral science. A calcium phosphates in oral biology and medicine*”, 1991, edit S Karger AG, pág 200.
- 12.- Syed Sibte, Asghar, Qasim, Murtaza, et al, “*Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction*”. 2013, U.P.B. Sci. Bull. Series B, Vol. 75, Iss. 3, pág. 3-10.
- 13.- Flores Papaqui Tania, Análisis de morfológico y estructural de la transformación CdCO₃→CdO, Tesis de licenciatura, 2012.

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., Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials*, 2001. 22: pg. 301-306.
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 pag.
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 hipovitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Canarias (España). *Endocrinol Nutr.* 2011;58(6):267-73 pag. Disponible en: [http:// www.elsevier.es/es/revistas/endocrinologia-nutricion-12/elevada-prevalencia-hipovitaminosis](http://www.elsevier.es/es/revistas/endocrinologia-nutricion-12/elevada-prevalencia-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, table of contents.
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 Invest* 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