



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**“Síntesis de compósitos basados en hidroxiapatita con
función antibacteriana contra la *Streptococcus mutans*.”**

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Químicas

Especialidad:

Fisicoquímica

Presenta:

I.Q Vanessa Álvarez Viveros

Director de Tesis: Dr. Geolar Fetter

Codirector de Tesis: Dr. Franchescoli Didier Velázquez-Herrera

Puebla, Pue., Julio 2025



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Materiales Bioactivos de la Facultad de Ciencias Químicas.

Las pruebas microbiológicas fueron realizadas en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la BUAP.



DITCo



Parte de la caracterización se realizó en el Instituto Politécnico Nacional, así como la adquisición de la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La presente tesis contó con el apoyo de una beca por parte de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti).

**Ciencia y
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



A mi testaruda Von, a mi distraído Sebas y a mi bella Marjorie.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia en la elaboración de este proyecto tan complicado y extenuante, los amo con todo mi corazón. A mis padres, Armando y Betty, por motivarme cada día a superarme y a conocer más sobre la vida y el mundo, por su apoyo incondicional ante cada dificultad y por su amor constante, que ha sido mi mayor fortaleza.

A mis hermanos, Ivonne y Sebastián, por ser mi orgullo y mi alegría, por acompañarme a lo largo de este posgrado, escuchar mis interminables quejas cada vez que algo salía mal y recordarme, con paciencia y cariño, que siempre podía seguir adelante.

A mis gatitas, Marjorie y Catnip, por su compañía y el amor que me brindaron durante todo este proceso. En especial a mi querida Margi, por seguirme a todas partes y recordarme, que sin importar lo que pasara con la tesis, ella siempre estaría ahí.

A mis amigos, por escucharme en los momentos de tristeza, frustración y cansancio, por apoyarme cuando los resultados del laboratorio no eran los esperados, y por motivarme a mantenerme constante hasta alcanzar la meta de concluir esta maestría.

A mis colegas de investigación, por su paciencia y disposición para aclarar mis dudas a lo largo del posgrado, especialmente en el área de Microbiología, donde me enseñaron desde las técnicas más básicas, como la elaboración de placas en agar, hasta procedimientos más complejos. También agradezco a quienes me apoyaron en la caracterización de materiales, contribuyendo de manera fundamental a este trabajo. A mis asesores de tesis, Dr. Geolar Fetter y Dr. Franchescoli Didier Velázquez-Herrera, por su guía, orientación y acompañamiento durante todo el desarrollo de este proyecto. A mis jurados de tesis Dr. Gerardo Landeta Cortés, Dra. María Ana Pérez Cruz, Dra. Griselda Corro Hernández y Dra. Silvia Patricia Paredes Carrera por revisar y corregir de este trabajo, por su interés, apoyo y crítica.

Finalmente, agradezco al Posgrado en Ciencias por brindarme la oportunidad de cursar esta maestría, a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por la beca de maestría asociada al CVU 1309836, la cual hizo posible la realización de este trabajo académico y a la Vicerrectoría de investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo financiero al Proyecto ID 00563-PV/2025 del cual forma parte este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	IX
JUSTIFICACIÓN.....	XI
OBJETIVO.....	XI
Objetivo general.....	XI
Objetivos específicos.....	XI

1. MARCO TEÓRICO.....1

1.1 Bacterias	2
1.1.1 Genero <i>Streptococcus</i>	2
1.1.2 <i>Streptococcus mutans</i>	3
1.1.3 Cavidad oral.....	6
1.2 Hidroxiapatita	10
1.2.1 Métodos de síntesis.....	10
1.2.2 Aplicaciones de la hidroxiapatita	12
1.3 Hidrotalcitas.....	14
1.3.1 Estructura de las hidrotalcitas	15
1.3.2 Propiedades de las arcillas	16
1.3.3 Método de coprecipitación simultánea	16
1.3.4 Hidrotalcitas como agentes antimicrobianos	17
1.4 Compósitos Hidrotalcita- Hidroxiapatita.....	18

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....20

2.1 Síntesis de hidroxiapatita de referencia.....	20
2.2 Síntesis de hidroxiapatita con zinc	21
2.3 Síntesis de hidroxiapatita con cobre	21

2.4 Síntesis de hidrotalcita de referencia	22
2.5 Síntesis simultánea de compósitos hidrotalcita-hidroxiapatita por el método de ultrasonido.....	23
2.6 Materiales sintetizados	24
2.7 Caracterización de los materiales	26
2.7.1 Difracción de rayos X	26
2.7.2 Espectroscopía de infrarrojo	26
2.7.3 Fisisorción de nitrógeno.....	27
2.7.4 Microscopia electrónica de barrido.....	27
2.7.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)	27
2.8 Cepa bacteriana	27
2.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales.....	28
2.10 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....32	
3.1 Caracterización de los materiales	32
3.1.1 Difracción de rayos X (DRX).....	32
3.1.2 Espectroscopía de infrarrojo	36
3.1.2.1 Hidroxiapatita de referencia e hidroxiapatitas con iones de Cu^{2+} o Zn^{2+}	36
3.1.2.2 Hidrotalcitas de referencia	37
3.1.2.3 Compósitos hidrotalcita-hidroxiapatita	38
3.1.3 Fisisorción de nitrógeno.....	40
3.1.4 Microscopia electrónica de barrido.....	43
3.1.4.1 Hidroxiapatita de referencia	43
3.1.4.2 Hidrotalcitas de referencia	44
3.1.4.3 Compósitos HT-HA.....	46
3.1.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)	49
3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales.....	50
3.2.1 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	53
3.2.1 Dilución seriada	55
Conclusiones.....	59
Referencias	60

RESUMEN

La caries dental es la enfermedad crónica bucodental más prevalente y representa uno de los principales problemas de salud oral a nivel mundial. En la actualidad, se han desarrollado diversos materiales para su tratamiento, cuyo objetivo principal es inhibir la formación de la biopelícula responsable de la placa dental, así como promover la remineralización del esmalte. Entre estos materiales, las nanopartículas inorgánicas han demostrado interferir eficazmente con el metabolismo bacteriano y con el desarrollo de biopelículas. En particular, el uso de metales y óxidos metálicos como plata, zinc, titanio y cobre ha mostrado una notable actividad antimicrobiana, gracias a la liberación de iones con efecto bactericida, lo que también los convierte en potenciales agentes anticaries.

Los sólidos inorgánicos que contienen metales con propiedades antimicrobianas se ven favorecidos por su alta área superficial, la cual mejora el contacto con los microorganismos. Sin embargo, la composición química de estos materiales es el factor determinante en su eficacia antimicrobiana. Se ha comprobado que aquellos materiales que presentan una naturaleza básica poseen una mayor actividad bactericida.

Considerando que los compósitos inorgánicos pueden exhibir actividad antibacteriana y que metales como el zinc y el cobre actúan como agentes anticaries, en este estudio se sintetizaron compósitos de hidroxiapatita con hidrotalcitas conteniendo cobre. Estos compósitos fueron evaluados frente a *Streptococcus mutans*, la principal bacteria implicada en el desarrollo de caries dental.

Se llevó a cabo la síntesis de los siguientes materiales: hidroxiapatita de referencia (HA), hidroxiapatita dopada con zinc (HA-Zn), hidroxiapatita dopada con cobre (HA-Cu), y compósitos formados por hidrotalcita e hidroxiapatita con proporciones másicas de 30 (HT30-HA), 50 (HT50-HA) y 70 % (HT70-HA). También se sintetizaron hidrotalcitas de referencia con cobre (HT-Cu) y con cobre-magnesio (HT-CuMg). Todos los materiales fueron obtenidos mediante el método de coprecipitación simultánea.

La caracterización de los materiales se realizó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), fisisorción de nitrógeno, microscopía electrónica de barrido (MEB) y difracción de rayos X (DRX). La actividad antimicrobiana se evaluó frente a

Streptococcus mutans, observándose que los compósitos HT50-HA y HT70-HA, así como las hidrotalcitas de referencia, generaron halos de inhibición. En particular, el compósito HT70-HA mostró la mayor actividad antibacteriana, por lo que se determinó su concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual fue de 2 mg/mL a las 24 horas y de 10 mg/mL a las 48 horas de incubación.

ABSTRACT

Dental caries is the most prevalent chronic oral disease and represents one of the major health problems in the oral cavity worldwide. Currently, various materials have been developed for its treatment, with the main objective of inhibiting the formation of the biofilm responsible for dental plaque, as well as promoting enamel remineralization. Among these materials, inorganic nanoparticles have proven effective in interfering with bacterial metabolism and biofilm development. In particular, the use of metals and metal oxides such as silver, zinc, titanium, and copper, has demonstrated significant antimicrobial activity through the release of bactericidal ions, making them potential anti-caries agents. Inorganic solids containing bactericidal metals benefit from a high surface area, which enhances contact with microorganisms. However, the chemical composition of these materials is the most critical factor in determining their antimicrobial effectiveness. It has been demonstrated that materials with a basic nature exhibit better antibacterial activity. Considering that inorganic composites can exhibit antibacterial properties and that metals such as zinc and copper function as anti-caries agents, this study focused on the synthesis of hydroxyapatite composites with copper-containing hydrotalcites. These composites were tested against *Streptococcus mutans*, the primary bacterium responsible for the development of dental caries. The following materials were synthesized: reference hydroxyapatite (HA), zinc-doped hydroxyapatite (HA-Zn), copper-doped hydroxyapatite (HA-Cu), and composites formed by hydrotalcite and hydroxyapatite at mass percentages of 30 (HT30-HA), 50 (HT50-HA), and 70% (HT70-HA). Additionally, hydrotalcites with copper (HT-Cu) and with copper-magnesium (HT-CuMg) were synthesized. All materials were obtained via the simultaneous coprecipitation method. The materials were characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), nitrogen physisorption, scanning electron microscopy (SEM), and X-

ray diffraction (XRD). Antimicrobial activity was evaluated against *Streptococcus mutans*, with HT50-HA and HT70-HA composites, as well as the reference hydroxylapatites, generating inhibition zones. Among them, the HT70-HA composite showed the highest antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) for this material was determined to be 2 mg/mL after 24 hours and 10 mg/mL after 48 hours of incubation.

INTRODUCCIÓN

La caries dental, comúnmente conocida como caries, es la enfermedad crónica bucodental más prevalente y uno de los principales problemas de salud oral a nivel mundial. Esta afección puede manifestarse en todas las etapas de la vida, afectando entre el 60 % y el 90 % de los niños y hasta al 100 % de los adultos, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además, es considerada la cuarta enfermedad más costosa de tratar.

Las caries pueden originarse por múltiples factores, entre los cuales destacan la acción de microorganismos cariogénicos, la morfología dental, el tiempo de exposición y la susceptibilidad del huésped. Esta patología se produce como consecuencia de un desequilibrio en el entorno bucal que conduce a la pérdida de minerales en los tejidos dentales. La desmineralización progresiva, causada por la disolución de los componentes minerales del diente, da lugar a la destrucción de su estructura, lo que clínicamente se define como caries dental.

La disolución del esmalte es inducida por ácidos orgánicos generados durante la formación de la biopelícula bacteriana sobre la superficie dental. Los principales patógenos asociados con la caries dental son *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus acidophilus*.

La saliva, compuesta en un 99 % por agua y un 1 % por sólidos disueltos, actúa como solvente de diversos componentes orgánicos e inorgánicos. Su capacidad buffer, determinada por la presencia de iones bicarbonato y enzimas como la amilasa, varía según la glándula salival de origen. Sin embargo, este equilibrio puede alterarse por la actividad de bacterias cariogénicas, lo que provoca una disminución del pH salival (normalmente entre 6.7 y 7.3),

favoreciendo la pérdida de iones calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) de los tejidos dentales [Castañeda y col., 2012].

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})^2$), principal componente inorgánico del esmalte y la dentina, es especialmente vulnerable en entornos ácidos. En contacto con este medio, se produce una pérdida significativa de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , provocando desmineralización y facilitando la acción de patógenos.

En respuesta a esta problemática, se han desarrollado diversos materiales con el fin de prevenir o tratar las caries, centrados principalmente en inhibir la formación de la biopelícula dental y favorecer la remineralización del esmalte. Entre ellos, las nanopartículas inorgánicas han mostrado eficacia al interferir en el metabolismo bacteriano y en el desarrollo de biopelículas. Particularmente, las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos (como plata, zinc, titanio y cobre) han demostrado una notable actividad antimicrobiana gracias a la liberación de iones con efecto bactericida [Al-Hijazi y col., 2023].

Los sólidos inorgánicos compuestos por metales con propiedades bactericidas (efecto oligodinámico) presentan, además, una alta área superficial, lo que mejora su interacción con los microorganismos. No obstante, el factor más determinante en su eficacia es su composición química. Estudios recientes han confirmado que los soportes inorgánicos con carácter básico presentan mayor actividad antibacteriana [Lobo-Sánchez y col., 2018].

Dado que los compósitos inorgánicos pueden poseer actividad antimicrobiana y que metales como el zinc y el cobre actúan como agentes anticaries, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de hidroxiapatita dopada con zinc y cobre, así como compósitos formados por hidrotalcita e hidroxiapatita en proporciones másicas de 30, 50 y 70 %. Los materiales se obtuvieron mediante el método de coprecipitación, seguido de un tratamiento por ultrasonido. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó frente a la bacteria *Streptococcus mutans*, utilizando el método de Kirby-Bauer modificado y determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI).

JUSTIFICACIÓN

La caries dental es una enfermedad bucodental que puede presentarse en todas las etapas de la vida. Aunque existen productos preventivos, como enjuagues bucales, una vez que se desarrolla una lesión cariosa, esta solo puede ser tratada mediante empastes dentales. Sin embargo, con el tiempo, estos empastes pueden disminuir su efectividad, generando zonas vulnerables a la colonización de bacterias cariogénicas, como *Streptococcus mutans*.

Dado que los materiales compuestos a base de arcillas han demostrado actividad antimicrobiana frente a diversos tipos de bacterias, la incorporación de nanopartículas de arcillas aniónicas a la hidroxiapatita podría favorecer la inhibición de la bacteria *S. mutans*. De este modo, estos compuestos podrían integrarse en la formulación de empastes dentales, contribuyendo a prevenir la aparición de caries secundarias en dientes previamente restaurados.

OBJETIVO

Objetivo general

Sintetizar materiales basados en arcillas aniónicas e hidroxiapatita con actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

Objetivos específicos

- Sintetizar hidroxiapatitas dopadas con zinc (Ca/Zn) y cobre (Ca/Cu) con relaciones molares de 2 % de Zn o Cu.
- Sintetizar compósitos formados por hidroxiapatita e hidrotalcita, con proporciones máxicas de 30, 50 y 70 % de hidrotalcita.
- Caracterizar las muestras obtenidas mediante técnicas de difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (FTIR), fisorción de nitrógeno, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS).

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los materiales frente a *Streptococcus mutans*, utilizando el método de Kirby-Bauer modificado.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del material que presente la mayor actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*.

The page features a minimalist design with a white background. A vertical blue line is positioned on the left side. In the top right and bottom left corners, there are overlapping circles in two shades of blue: a lighter, pale blue and a darker, vibrant blue. The text 'MARCO TEÓRICO' is centered in a bold, blue, serif font.

MARCO TEÓRICO

1. MARCO TEÓRICO

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas con pocos micrómetros de tamaño; no poseen membrana nuclear, aparato de Golgi, ni retículo endoplasmático. La pared celular de las bacterias está constituida por la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por peptidoglucano; pueden ser Gram positivas o Gram negativas. Las bacterias Gram positivas cuentan con una capa gruesa de peptidoglucano, lo que les confiere una coloración violeta al utilizar la técnica de tinción de Gram, mientras que las bacterias Gram negativas poseen una capa delgada de peptidoglucano; al ser sometidas a la tinción de Gram, presentan una coloración rosada. Otra clasificación puede ser con base en tres formas básicas: esferas (cocos), bastones (bacilos) y espirales o hélices (espiroquetas), de las cuales se derivan los géneros de clasificación de las bacterias. También pueden ser clasificadas por su necesidad de oxígeno para vivir; aquellas que necesitan oxígeno se denominan aerobias, y las que no necesitan oxígeno y tienen problemas para vivir o crecer cuando hay oxígeno se denominan anaerobias. Las bacterias facultativas son aquellas que pueden vivir sin o con la presencia de oxígeno.

Las bacterias se encuentran presentes en el cuerpo humano, en el aire, agua o alimentos; algunas son benéficas para el ser humano, como la microbiota presente en el sistema digestivo y la microbiota vaginal. Sin embargo, algunas son perjudiciales para el ser humano, causando infecciones que pueden derivar en enfermedades mortales.

1.1 Bacterias

1.1.1 Genero *Streptococcus*

1.1.1.2 Características generales

Los *Streptococcus* son microorganismos con una morfología particular; son cocos que forman cadenas al crecer, parecidas a un rosario, como se muestra en la Figura 1.1. Este género contiene especies fermentadoras de ácido láctico [Magidan y col.,2003]. Son grampositivas esféricas u ovoides con un diámetro $>2\mu\text{m}$, no poseen la enzima catalasa, por lo que no producen esporas ni gases; además, son anaeróbicas facultativas e inmóviles [Shenep, J. L.,2000].

Al ser un grupo tan diverso, cuenta con varias clasificaciones en términos de la morfología de sus colonias, reacciones hemolíticas, antígenos de Lancefield y reacciones bioquímicas [Carroll y col.,2016].

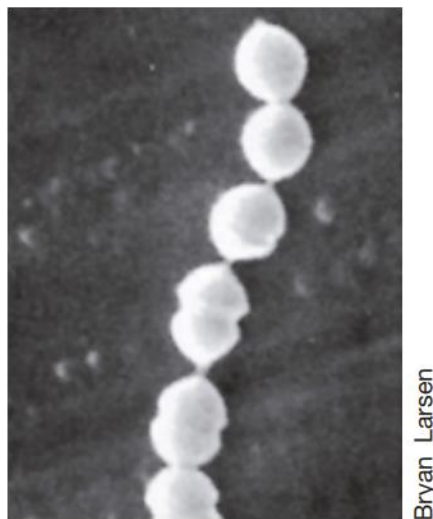


Figura 1.1. Streptococcus sp., micrografía electrónica de barrido.

Extraída de [Magidan y col.,2003].

1.1.2 Streptococcus mutans

1.1.2.1 Características generales

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1924, por J. Clarke, llamándola *Streptococcus mutans* debido a que la forma ovalada de las células parecía una mutación de las formas de estreptococos. Como se observa en la Figura 1.2, se encuentra en cadena y es catalasa negativa. En la Figura 1.3 se observa su morfología al crecer en medio de cultivo MRS.

Su relevancia médica se dio hasta mediados de 1960, cuando se descubrió su relación con la caries dental. Siendo su hábitat natural la cavidad oral, es una de las bacterias Gram positivas más estudiadas, así como una productora de ácido láctico capaz de modificar el pH hasta 4.2 [Lemos, J. A. y col.,2019]. Pertenece al grupo *viridans*; debido a esto, la *S. mutans* puede llegar a la circulación sanguínea causando un traumatismo que posteriormente lleva a una endocarditis en las válvulas cardíacas. Después de la extracción de piezas dentales, se presenta bacteriemia en al menos el 30% de los pacientes, por lo que la posibilidad de que se desarrolle es significativa.

Se encuentra específicamente en la placa dental, que es una biopelícula formada en la superficie dura del diente y está compuesta por diversas especies. El potencial cariogénico de la *S.mutans* se debe a tres características fundamentales: i) capacidad de síntesis de cantidades significativas de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarosa, ayudando a la colonización y permanencia en el diente; ii) la **acidogenicidad**, la capacidad de metabolizar y transportar un conjunto significativo de carbohidratos en ácidos orgánicos; y iii) **aciduricidad**, la capacidad de desarrollarse bajo condiciones de estrés ambiental, especialmente a un pH bajo [Lemos y col.,2019].

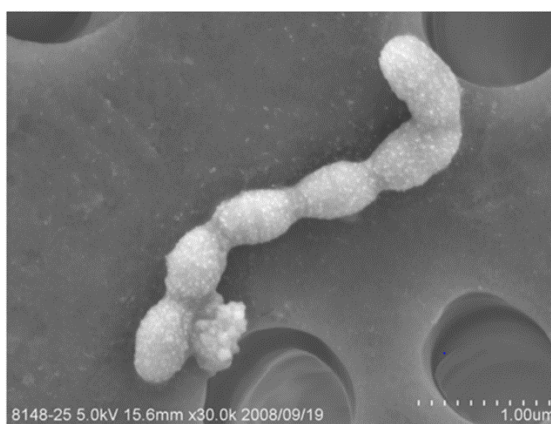


Figura 1.2. Imagen tomada por microscopio electrónico de barrido de Streptococcus mutans.



Figura 1.3 Streptococcus mutans crecida en medio MRS.

Es capaz de modificar su entorno, formando un medio con bajo pH y abundante en polisacáridos extracelulares, de tal forma que sea un nicho próspero para otras bacterias que presentan características similares a ella, como la acidogenicidad y aciduricidad. Además de estar relacionada con la caries dental, la *S. mutans* está involucrada en otros padecimientos como la endocarditis bacteriana subaguda, una inflamación potencialmente mortal de las válvulas cardíacas, entre otros ocasionados por un subconjunto de cepas.

Por otra parte, al tratarse de una bacteria láctica, requiere realizar un proceso de glucólisis para obtener energía. Es capaz de metabolizar una amplia variedad de carbohidratos, siendo la sacarosa el más cariogénico de ellos. Esto se debe a que la *S. mutans* puede catabolizar la sacarosa por diversas vías para producir ácido, así como convertir la sacarosa por medio de glicosiltransferasas en un polímero extracelular similar al glucano, que funge como pegamento durante la formación de biopelículas, favoreciendo la adhesión a las superficies dentales y a otros microorganismos [Lemos, J. A. y col.,2019].

1.1.2.2 Formación de biopelículas

Las glicosiltransferasas producidas por *S. mutans* se adsorben a la película de esmalte o a las superficies bacterianas; al encontrarse presente la sacarosa, se cataboliza, produciendo grandes cantidades de glucanos que contribuyen a la formación de una robusta matriz extracelular de polisacáridos, conteniendo en mayor medida componentes insolubles.

La matriz sirve como soporte para la estructura de la biopelícula, mediando la estrecha adherencia al esmalte dental y a las bacterias. Otro componente significativo para la biopelícula oral es el ADN extracelular que forma nanofibras, contribuyendo así a la integridad estructural y la estabilidad de la biopelícula.

El consumo constante de sacarosa provoca cambios estructurales que favorecen el crecimiento de bacterias acidulantes y acidogénicas, como la *S. mutans*, que presenta una respuesta de tolerancia al ácido, causando alteraciones en la biopelícula oral, debido al aumento de ácidos orgánicos producidos por dichas bacterias, contribuyendo a la disminución del pH ambiental.

Al predominar la *S.mutans* respecto a otras bacterias, ocasiona un cambio en el entorno, transformando el pH que rodea la estructura de hidroxiapatita del esmalte dental a un pH mucho más ácido, provocando la desmineralización e iniciando el proceso de caries.

1.1.2.2 *S. mutans* y la prevención de las caries

Las caries son una enfermedad polimicrobiana, sin embargo, atacar selectivamente a la *S.mutans* es el camino adecuado a la prevención, debido al papel que desempeñan los glucanos que sintetiza a partir de la sacarosa. Este compuesto es vital para la formación de la matriz de las biopelículas que favorecen la colonización bacteriana en las superficies dentales y actúan como barrera para mantener el medio ácido.

Se ha demostrado que existen varios productos naturales que son eficaces contra la formación de biopelículas y la caries dental. Algunos de ellos son: el propóleo, la curcumina, el arándano rojo y los extractos de té verde. No obstante, ninguno de ellos ha mostrado selectividad contra la *S.mutans* [Lemos y col.,2019].

1.1.3 Cavidad oral

1.1.3.1 Saliva

La saliva es un líquido que humedece la cavidad oral; es secretada en un 93% de su volumen por las glándulas salivales mayores y el 7% restante por las glándulas salivales menores. Es definida como un líquido diluido compuesto por un 99% de agua que funge como solvente para los otros componentes que la forman, siendo: componentes orgánicos proteicos, componentes no proteicos y componentes inorgánicos o electrolitos

Las proteínas salivales son relevantes para la dinámica de la cavidad bucal, ya que le dan las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la saliva, participan en la lubricación y mantenimiento de la mucosa, así como incrementan su capacidad como buffer y promueven la remineralización.

1.1.3.2 Remineralización y caries dental

La saliva tiene un papel primordial en la conservación de las propiedades fisicoquímicas del esmalte dental por medio de la modulación y la remineralización. Al brotar los dientes, la saliva es la que suministra los iones de calcio Ca^{2+} y fosfato PO_4^{3-} necesarios para que la superficie dental adquiera dureza y sea menos permeable, formando hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Este proceso depende del pH y de la saturación que se tenga de los iones. Al estar en contacto con el medio ácido, ocurre una pérdida de iones en los tejidos, ocurriendo una desmineralización, como se muestra en la Figura 1.4. Durante la fase de remineralización, se generan cristales de hidroxiapatita.

Asimismo, la saliva contiene fluoruro, que es necesario para brindar estabilidad a los minerales dentales, aun cuando se encuentra presente en bajas cantidades. La concentración de fluoruro depende del consumo, particularmente del contenido en el agua potable, pero también pueden aportarlos productos dentales para la prevención de caries.

Los iones de fluoruro en fase líquida disminuyen la solubilidad de la hidroxiapatita, evitando la desmineralización al disminuir el pH, así como la reducción de la producción de ácidos en la biopelícula. Si bien los iones de fluoruro brindan protección frente a las caries, el papel de la saliva va mucho más allá debido a las características que posee: eliminación y dilución de azúcares consumidos por medio de los alimentos, equilibrio desmineralización-remineralización, la capacidad y su acción antimicrobiana [Castañeda y col.,2012].

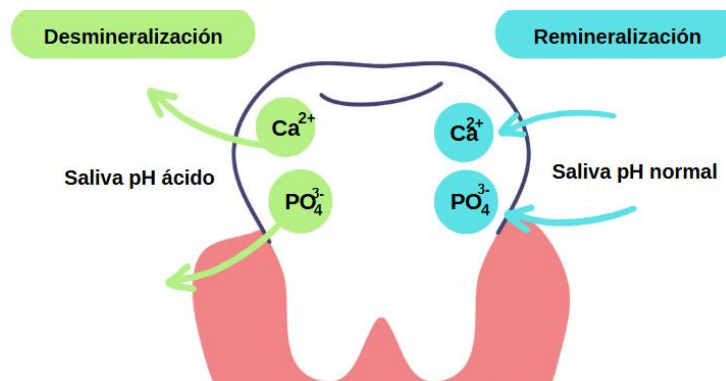


Figura 1.4. Diagrama desmineralización-remineralización.

1.1.3.3 Microbiota oral

La microbiota oral, también llamada “placa dental”, es una de las microbiotas más complejas del cuerpo humano; se han identificado más de 700 especies bacterianas. La placa supragingival está conformada en su mayoría por bacterias Gram positivas como *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* y lactobacilos, mientras que en la placa supragingival las bacterias predominantes son anaerobias Gram negativas como *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophoga spp.*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, y espiroquetas orales como el *Treponema* [Xue-song, He y col.,2009].

1.1.3.4 Nanomateriales en la inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* para evitar la caries dental

Los nanomateriales dentales han tenido un desarrollo prometedor en los últimos años, dando como resultado algunos materiales comerciales y disponibles en el mercado. Se ha logrado un avance significativo en los materiales anticaries, confirmando que el uso de algunas nanopartículas inorgánicas puede reducir la producción de biopelículas y promover la remineralización [Nizami y col., 2021].

Las nanopartículas de plata en combinación con otros materiales han dado resultados significativos al combatir la *Streptococcus mutans*, que es una de las bacterias causantes de caries, específicamente disminuyendo la formación de biopelículas. La adición de nanopartículas de Ag al poli-metacrilato de metilo le otorgó propiedades antibacterianas sin perder sus propiedades mecánicas; al ser añadidas a resinas, mejoró el efecto antibacterial contra la *Streptococcus mutans*. La incorporación de nanopartículas de plata al dimetilacrilato de amonio cuaternario resultó en una disminución de la actividad metabólica de las bacterias cariogénicas, así como en su producción de ácido, ocasionando una reducción en la formación de biopelículas [Nizami y col., 2021].

Por su parte, las nanopartículas de zinc pueden inhibir la *S. mutans*, reducir la formación de placa y facilitar la remineralización, ya sea solas o al combinarse con otros metales como el cobre, el flúor, la plata, así como compuestos orgánicos. Se ha demostrado que a concentraciones de 10

mg/mL las nanopartículas de óxido de zinc mostraron una zona de inhibición de 24 mm, además de suprimir el 90% de las biopelículas de *S. mutans* [Nizami y col., 2021]. El quitosano, al unirse con óxido de zinc-zeolita, formó un hidrogel que no presenta citotoxicidad y reduce la formación de biopelículas. Los nano híbridos de celulosa y nano cristales de óxido de zinc en resinas dentales mejoraron la resistencia a la compresión, el módulo de flexión y las propiedades antibacterianas. Es decir, que las nanopartículas de zinc adquieren relevancia en la prevención de las caries al formar compuestos híbridos, ya que mejoran sus capacidades antibacterianas, así como expanden sus usos al ser mezclados en productos dentales ya existentes [Nizami y col., 2021].

A diferencia de los otros metales y óxidos mencionados, las nanopartículas de cobre tienen un costo menor comparado a otros metales como la plata, así como una elevada área superficial, lo que las vuelve ideales para mezclarse con compuestos como polímeros y adhesivos dentales que inhiban el crecimiento de la *S. mutans* y eviten las manchas blancas que son la primera evidencia clínica de caries, como el Polimetilmetacrilato (PMMA) que, al ser unido con CuO a concentraciones de 2.5% y 7.5%, presentó actividad antimicrobiana. El bajo costo del cobre lo vuelve una alternativa a futuras investigaciones para la prevención de las caries, ya que una disminución de costos permitiría una accesibilidad mayor en entornos clínicos [Al-hijazi y col., 2023].

Otro material que ha sido considerado relevante en la prevención de las caries es la hidroxiapatita, ya que es un compuesto clave en el proceso de remineralización; a pesar de ello, no ha presentado una actividad antibacterial por sí misma. Se han realizado investigaciones usando nanopartículas de fosfato de calcio por ser los minerales que la hidroxiapatita pierde, pero la inhibición del crecimiento bacteriano no ha sido el eje principal de la investigación, aunque se han obtenido buenos resultados con la fluorapatita para inhibir la formación de biopelículas de la *S. mutans* [Nizami y col., 2021]. La hidroxiapatita permite el intercambio de iones de calcio por otros iones metálicos oligodinámicos como el Zn^{2+} , el Cu^{2+} o el Ag^+ . Cuando estos iones metálicos alcanzan la membrana de las células microbianas, se absorben fácilmente y penetran en la pared celular, provocando la pérdida de la capacidad de proliferación y la muerte de las células bacterianas. Incorporando estos iones a la hidroxiapatita se da lugar a nuevos compuestos con propiedades antibacterianas [Jaafar y col., 2020].

1.2 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) es un biocristal con fórmula condensada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)^6(\text{OH})_2$; se encuentra presente en dientes y huesos dándoles su dureza característica, pertenece a la familia de las apatitas y tiene una estructura hexagonal. La hidroxiapatita natural contiene un porcentaje mínimo de sodio, cloro, magnesio y carbonatos, por lo cual no se considera una apatita pura [García-Garduño y col.,2006]; posee bioactividad, osteoconductividad, área superficial de 100 m^2/g y una relación de Ca/P de 1.67.

La hidroxiapatita natural puede obtenerse de diversas fuentes, tales como huesos bovinos, huesos de caballo, de peces y de camellos. Así como a partir de piedra caliza algunas plantas, algas y cáscaras de huevo [Etinosa y col.,2024]. Al tener una estructura cristalográfica y química similar a la estructura ósea humana, su uso en biomedicina más común es su incorporación para favorecer la formación de hueso nuevo al colocar implantes en algún defecto óseo. Se ha utilizado en diversas presentaciones como revestimiento de implantes metálicos, rellenos de matrices, matrices poliméricas, cementos óseos e incluso como gránulos o estructuras conformadas [Thian y col.,2013].

1.2.1 Métodos de síntesis

Existen varios métodos para sintetizar polvo de HA; algunos de ellos son el método sol-gel [Layrolle y col., 1998], la precipitación química [Looet y col., 2008], la reacción hidrotérmica y la reacción en estado sólido [Sobczaket y col., 2009]. Estas son algunas de las vías que pueden utilizarse para fabricar polvo de hidroxiapatita, cuya apariencia se muestra en la Figura 1.5. Al utilizar diferentes métodos de síntesis, se obtienen características diferentes como morfología, patrones estereoquímicos, tamaños de grano y cristalinidad, entre otras [Etinosa y col.,2024]. A continuación, se discutirán algunos de estos métodos.



Figura 1.5. Hidroxiapatita sintética.

1.2.1.1 Obtención de hidroxiapatita a partir de fuentes naturales

La hidroxiapatita puede ser obtenida de diversas fuentes; la hidroxiapatita de huesos de pescado, especialmente los huesos de peces como el bagre, es rica en calcio, fosfato y carbonato, y se utiliza para sintetizar HA mediante diversos métodos como calcificación, reacción hidrotérmica o el proceso sol-gel. Los huesos de bovino son la materia prima más común para producir hidroxiapatita; se utilizan técnicas como la calcificación a altas temperaturas (hasta 1400 °C) para eliminar impurezas orgánicas.

1.2.1.2 Síntesis sonoquímica

La síntesis sonoquímica fue uno de los primeros métodos usados para la producción de nanomateriales. En este proceso, las moléculas de agua se ven afectadas por la aplicación de radiación ultrasónica intensa, causando la formación, crecimiento y desintegración de microburbujas en una fase acuosa. De esta forma se acelera la reacción entre los reactantes líquidos y sólidos [Etinosa y col.,2024]. En el caso de la HA, se ha demostrado en diversas investigaciones que el uso de esta síntesis acelera el crecimiento de cristales de HA hasta 5.5 veces [Burdusel y col.,2023] y que las nanopartículas obtenidas presentan cristales más uniformes pequeños, con menor aglomeración y un área superficial mayor. Este proceso se ha combinado con otros como el tratamiento hidrotérmico y la molienda para producir HA con huesos de cerdo; de esta forma se mantienen las concentraciones traza de Mg, Na, K y Zn, permitiendo que pueda ser utilizada en

aplicaciones relacionadas con biomedicina por su compatibilidad. El uso de este método también da pie a la obtención de polvos ultrafinos de HA natural con tamaño de partículas de 30-36 nm [Etinosa y col.,2024].

1.2.1.3 Precipitación química

La precipitación química es un método común y bastante utilizado para la producción de HA, debido a que permite producir grandes cantidades a un bajo costo. Los parámetros de esta síntesis son variables; se lleva a cabo a un pH mayor a 4.2 y la temperatura va de un rango de 25°C hasta cerca de los 100°C. Los precursores de la síntesis son reactivos que contienen calcio y fósforo en su estructura, como el hidróxido de calcio o nitrato de calcio como fuentes de iones de calcio (Ca^{2+}) y el fosfato de diamonio o ácido fosfórico como fuentes de fosfatos (PO_4^{3-}) [Etinosa y col.,2024] [Segura-Pérez y col., 2020]. Para mantener la proporción estequiométrica de Ca/P, los reactivos se agregan gota a gota en agitación constante. Este método produce partículas de HA de rango nanométrico y estructuras de diversas formas; la cristalización y morfología se ve afectada por la temperatura, el tiempo de síntesis y la calcificación. La desventaja que presenta esta síntesis es que las partículas producidas pueden tener defectos estructurales, ya que el control de la proporción estequiométrica es imperfecto. Esto puede ser debido a que la HA presenta afinidad química a otros iones como el dióxido de carbono que se encuentra en el aire [Segura-Pérez y col.,2020] o por vacíos en la estructura cristalina, propiciando un orden cristalino irregular, por lo que, para obtener HA de alta calidad, controlar el pH, la temperatura y el tiempo de reacción es crucial [Etinosa y col.,2024].

1.2.2 Aplicaciones de la hidroxiapatita

Las aplicaciones de la hidroxiapatita son variadas, la más común es su uso como biomaterial con diferentes propósitos como la liberación de medicamentos, la proliferación ósea, como fertilizantes o adsorbentes. Se discutirán algunas de estas aplicaciones a continuación.

1.2.2.1 Restauración ósea

La hidroxiapatita es utilizada en aplicaciones biomédicas como la cirugía dental y ortopédica debido a su estructura y propiedades similares al componente inorgánico del sistema óseo, haciendo que sea ideal como tratamiento para deficiencias o injertos óseos. La HA actúa como andamios que favorecen la regeneración del tejido óseo, fomentando la mineralización, vascularización y osteoconductividad (capacidad de soportar el crecimiento de células óseas). Al ser combinada con hidrogeles poliméricos, estos andamios se ven favorecidos mecánicamente; al obtener andamios más porosos, el crecimiento de hueso nuevo se ve favorecido [Etinosa y col.,2024]. La HA producida a partir de huesos de mamíferos, peces o caparzones es utilizada como sustituto óseo, ya que al contener elementos traza como Na, Cl, Mg y carbonatos permite un mejor rendimiento en la proliferación de osteoblastos [Firdaus y col., 2022].

1.2.2.2 Recubrimientos

Los recubrimientos de HA han tenido diversos usos en implantes metálicos y liberación de medicamentos. Los implantes metálicos recubiertos con HA tienen la función de mejorar la osteoconductividad y bioactividad; de esta forma, permiten la integración del implante al tejido óseo [Firdaus y col., 2022], permitiendo que el hueso crezca sobre el recubrimiento y forme una interfaz fuerte desde el punto de vista mecánico, así como una reducción en la tasa de degradación del entorno fisiológico y una protección anticorrosión [Salman y col., 2013]. Para la liberación de medicamentos, las nanopartículas de HA son utilizadas especialmente en enfermedades óseas; pueden ir cargadas con diversos fármacos como antibióticos, antiinflamatorios, agentes anticancerígenos, entre otros. Así mismo, la HA puede ser combinada con otros componentes bioactivos como el quitosano o el ácido hialurónico para regular la tasa de liberación del medicamento, dando como resultado una liberación controlada y sostenida [Firdaus y col., 2022].

1.2.2.3 Otras aplicaciones

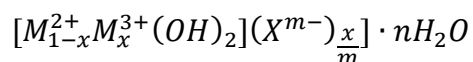
En los últimos años la investigación se ha enfocado en la creación de materiales compósitos que combinen la HA con otros agentes pépticos osteoinductivos o medicamentos antibacterianos para prevenir el riesgo de infecciones [Firdaus y col., 2022]. La HA también ha sido usada como fertilizante como alternativa ecológica, debido a que es poco soluble en agua y es rica en fósforo y

calcio que son nutrientes esenciales para las plantas, al estar en contacto con la acidez del suelo estos componentes se van liberando, modificando su pH mejorando las condiciones para el crecimiento de las plantas, además de que su composición química puede ser modificada para incluir otros nutrientes para las plantas como potasio o magnesio [Cruz-Hernández y col., 2023]. Otra aplicación para la HA es como adsorbente, en el estudio de Sani y colaboradores en el año 2016, da una solución al exceso de flúor en el agua subterránea, gracias a su composición química la HA es capaz de retener el flúor, pero puede ser mejorada su capacidad como adsorbente al ser llevada a la escala nanométrica obteniendo nanopartículas de HA combinadas con hidrotalcita, obteniendo una mayor retención de flúor que cuando ambos materiales se ocupan por separado [Sani y col., 2016].

1.3 Hidrotalcitas

Las arcillas aniónicas son materiales básicos constituidos por capas apiladas cargadas positivamente debido a sustituciones de metales, también se les conoce como “hidróxidos doble laminares” (HDL), hidrotalcitas o compuestos tipo hidrotalcita. Entre capas existen aniones hidratados que neutralizan la carga de las capas, la naturaleza de estos y su proporción determina las propiedades de la arcilla aniónica, como se muestra en la Figura 1.6. El tamaño de las especies aniónicas que se pueden incorporar a la estructura no está limitado, debido a la capacidad de expansión de estas arcillas, por lo que compuestos bactericidas pueden integrarse como una especie intercalada o en la superficie formando materiales híbridos.

Su fórmula química general es:



Donde M^{2+} y M^{3+} son metales divalentes y trivalentes, X^{m-} es el anión que compensa las cargas con su carga $m-$; x representa el radio del metal $M^{3+}/(M^{3+} + M^{2+})$ y n es el número de moléculas de agua [Lobo-Sánchez y col., 2018].

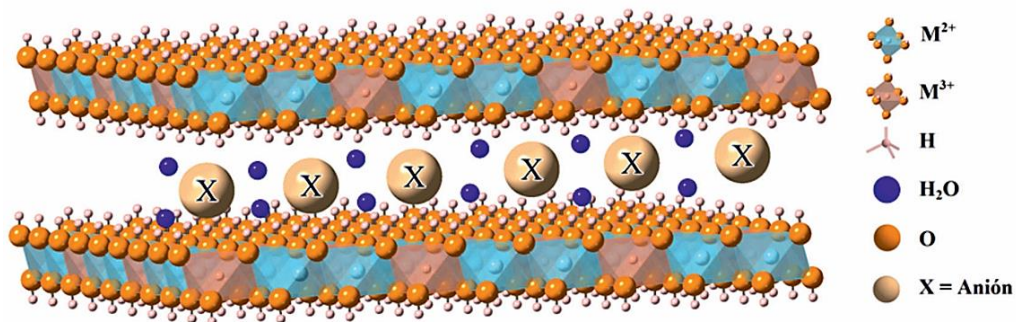


Figura 1.6. Estructura de un compuesto tipo hidrotalcita [Fetter G. y col., 2022].

1.3.1 Estructura de las hidrotalcitas

La estructura de las hidrotalcitas consiste en capas bidimensionales basadas en la brucita ($Mg(OH)_2$) coordinación metálica octaédrica. Las capas que conforman la estructura se encuentran unidas entre sí por interacciones de Coulomb y Van der Waals, así como por enlaces de hidrógeno. Las moléculas de agua que se encuentran entre las láminas se encuentran unidas de forma desorganizada a los iones OH^- y a los aniones. Usualmente las hidrotalcitas puras tienen una relación del radio molar de M^{2+}/M^{3+} que toma valores de 2:1 a 4:1, pero ha habido síntesis donde se ha utilizado relaciones de 0.5 o de 10.

Los iones metálicos divalentes pueden ser sustituidos por iones trivalentes, creando una capa cargada positivamente, estos se encuentran unidos por enlaces covalentes. Los iones divalentes más frecuentes en las hidrotalcitas son Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} , usualmente sus radios iónicos varían entre 65 pm, que es el radio iónico del Mg, hasta 80 pm (Mn), mientras que los iones trivalentes más comunes son Al^{3+} , Fe^{3+} y Ga^{3+} , los radios iónicos van desde 50pm (Al) hasta 69 pm (Cr). Sin embargo, también hay hidrotalcitas que han utilizado cationes con número de coordinación diferentes de dos o tres, como Zr^{4+} , Sn^{4+} , Li^+ y Ti^{4+} o cationes orgánicos. Los aniones pueden ser muy diversos, teniendo un orden de afinidad de $CO_3^{2-} > SO_4^{2-} > OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^-$, pero también pueden ser orgánicos como la hemoglobina, el ADN o siRNA. Debido a esta diversidad las hidrotalcitas pueden tener diversas aplicaciones como catalizadores, adsorbente, materiales antimicrobianos y para la liberación de fármacos [Velázquez-Herrera y col., 2024].

1.3.2 Propiedades de las arcillas

Las hidrotalcitas son arcillas con gran diversidad estructural, cada una de ellas presenta características y propiedades diferentes, pero se pueden identificar algunas propiedades que se comparten las arcillas en general, según [Mukherjee, 2013] estas son las más importantes:

1. **Capacidad de hinchamiento y compactación:** Las arcillas tienen la capacidad de adsorber o perder agua dependiendo de la densidad de sus partículas.
2. **Esfuerzo cortante:** Son capaces de oponer resistencia a la presión.
3. **Capacidad de intercambio de iones:** Entre sus láminas se encuentran cationes y aniones, pueden presentar una carga positiva o negativa dependiendo de la neutralización de cargas que presenten.
4. **Penetrabilidad gaseosa:** Pueden contener gases en su estructura, por lo que al ser usadas en procesos de fertilización permiten que los gases lleguen a capas del suelo con mayor profundidad.
5. **Difusividad de iones:** Al ser materiales con porosidad variada las arcillas pueden transportar iones en su estructura, ya sea de forma superficial o interlaminar.
6. **Liberación controlada:** Los iones o moléculas contenidos estructuralmente en las arcillas se liberan de forma gradual, por consiguiente, son muy útiles en el ámbito farmacéutico y de fertilizantes.

Muchas de estas propiedades se relacionan unas con otras, dando pie a arcillas con propiedades muy específicas en términos de área superficial, porosidad, entre otros [Fetter G. y col., 2022].

1.3.3 Método de coprecipitación simultánea

El método de coprecipitación simultánea consiste en la adición lenta y constante de sales metálicas mixtas que contienen los aniones y cationes que pertenecerán a la estructura, así como una solución alcalina en un reactor con agua, llevando la reacción a cabo en un pH determinado, que suelen ser de 8 a 10, pero se han reportado la síntesis en rangos de pH menores a 6 y mayores a 10 [Velázquez-Herrera y col., 2024].

El siguiente paso es un tratamiento hidrotérmico, que es utilizado para promover la cristalización de la hidrotalcita y controlar el tamaño de los cristales. En la actualidad los tratamientos hidrotérmicos utilizados son la irradiación por microondas y ultrasonido, en los trabajos realizados por Segura-Pérez y col., Lobo-Sánchez y col., el ultrasonido es usado para la síntesis de compósitos de hidrotalcita con otros materiales. Después del tratamiento hidrotérmico, el material se filtra, se lava y finalmente es secado. La Figura 1.7 muestra la secuencia de pasos involucrados en este proceso. [Velázquez-Herrera y col., 2024].

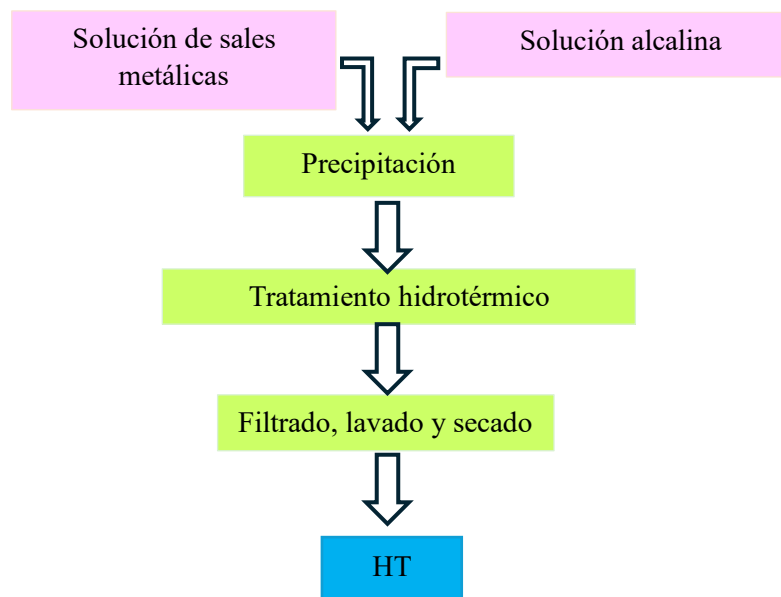


Figura 1.7. Esquema de síntesis de hidrotalcita por el método de coprecipitación simultánea.

1.3.4 Hidrotalcitas como agentes antimicrobianos

Las hidrotalcitas debido a su estructura química, han mostrado gran capacidad antibacteriana contra diversos microorganismos. León-Vallejo y col., en el 2019 desarrollaron varias hidrotalcitas y las probaron contra la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* que se encuentra presente en la orina humana y es responsable del olor característico de esta. Sus estudios demostraron que las hidrotalcitas que contenían magnesio y cobre no presentaron actividad antibacteriana contra esta bacteria, sin embargo, la hidrotalcita con zinc mostró excelente actividad bactericida eliminando en un 98.1% del número de colonias a las 24 h de incubación con una concentración de 20 mg/mL de hidrotalcita y con 50 mg/mL con el mismo tiempo de incubación hubo una reducción de 99.9 %.

Otro estudio realizado por Velázquez-Herrera y col. en el 2018, demostró la capacidad fungicida de las hidrotalcitas, utilizando hidrotalcitas de Zn-Al, MgZn-Al y CuZn-Al. Todos los materiales inhibieron el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*. La hidrotalcita con contenido de cobre fue la que presentó una mejor actividad antifúngica, por lo que es posible controlar la dispersión fúngica a través de estas arcillas.

1.4 Compósitos Hidrotalcita- Hidroxiapatita

En el caso de los compósitos de HA con hidrotalcitas en el año 2018 el trabajo realizado por Segura-Pérez y col., evaluó la actividad bactericida de compósitos con composición CuZnAl-HA, CuMgAl-HA y ZnMgAl-HA, así como las respectivas hidrotalcitas, contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*. La hidrotalcita con zinc no mostró ninguna actividad antimicrobiana, incluso a concentraciones mayores a los 14 mg/mL, mientras que aquella que contenía cobre sí presentó una inhibición en el crecimiento.

En el caso de la hidrotalcita de CuZnAl, para las bacterias *S. epidermis*, *S. aureus*, *E. fecalis* y *S. marcescens*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.5 mg/mL fue suficiente, pero para la bacteria *E. coli* fue necesaria una concentración de 4 mg/mL y para la *P. aeruginosa* se necesitó una concentración de 6 mg/mL. Respecto a la hidrotalcita CuMgAl, se requirió concentraciones de 0.5 mg/mL contra la *E. fecalis* y 1 mg/mL para la *S. marcescens*. Pero concentraciones más altas de 6 y 8 mg/mL fueron necesarias para inhibir *P. aeruginosa* y *E. coli*. Entre tanto, los compósitos CuMgAl-HA y CuZnAl-HA solo pudieron inhibir el crecimiento de *S. epidermidis*, *S. aureus* y *E. fecalis* con una concentración de 0.5 mg/mL; sin embargo, no se obtuvo esta actividad para el resto de las bacterias.



**DESARROLLO
EXPERIMENTAL**

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este apartado se describen las condiciones experimentales utilizadas para la síntesis de hidrotalcitas, hidroxiapatitas y compósitos. En la Tabla 3.1 se muestran los reactivos utilizados para la síntesis de hidrotalcitas, hidroxiapatitas y compósitos.

Tabla 2.1. Reactivos empleados para la síntesis.

Reactivo	Masa molar (g)	Pureza	Marca
H ₃ PO ₄	98	85	Sigma Aldrich
Ca(OH) ₂	74.09	96	Sigma Aldrich
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	297.47	98	Sigma Aldrich
Cu(NO ₃) ₂ ·2.5 H ₂ O	232.59	98	Sigma Aldrich
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256.41	99	Sigma Aldrich
Al(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	375.13	98	Sigma Aldrich
NaOH	40	99	Merk

2.1 Síntesis de hidroxiapatita de referencia

La síntesis se llevó a cabo con la preparación de dos soluciones. La primera solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) a una concentración de 0.8 M y la segunda con una concentración de 2M de Ca(OH)₂. Las dos disoluciones se llevaron a precipitación gota a gota en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado en agitación constante; el pH se mantuvo constante a 9. Finalizada la precipitación, la muestra se llevó a un tratamiento hidrotérmico por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos. Después del tratamiento ultrasónico, los sólidos fueron recuperados por decantación y lavados con agua desionizada (250 mL/g) tres veces, para finalmente ser secados a 70 °C por 24 horas en una estufa. La Figura 2.1 muestra la secuencia de pasos involucrados en este proceso.

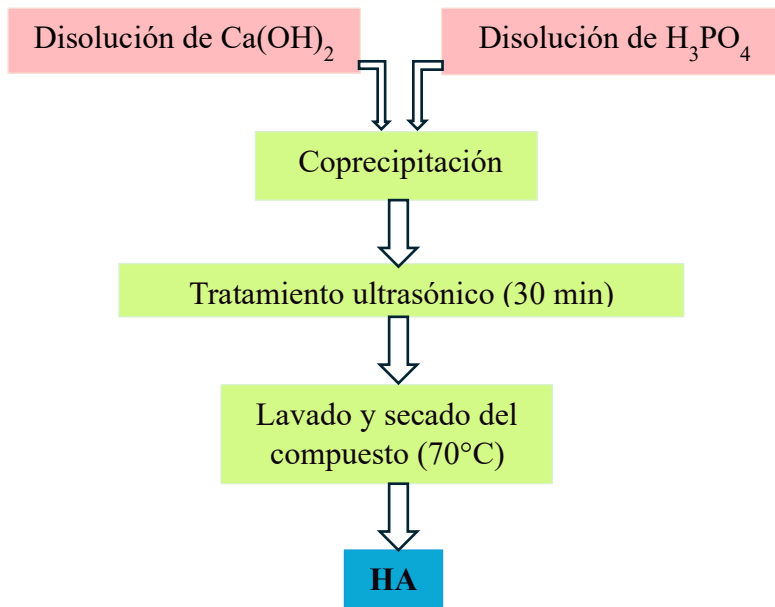


Figura 2.1. Procedimiento de síntesis de HA.

2.2 Síntesis de hidroxiapatita con zinc

La síntesis se llevó a cabo con la preparación de tres soluciones. La primera solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) a una concentración de 0.8 M, la segunda con una concentración de 2M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y la tercera de nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2M. Las tres disoluciones se llevaron a precipitación constante gota a gota en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado en agitación constante; el pH se mantuvo constante a 9.

Finalizada la precipitación, la muestra se llevó a un tratamiento hidrotérmico por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos. Después del tratamiento ultrasónico, los sólidos fueron recuperados por decantación y lavados con agua desionizada (250 mL/g) tres veces, para finalmente ser secados a 70 °C por 24 horas en una estufa.

2.3 Síntesis de hidroxiapatita con cobre

La síntesis se llevó a cabo con la preparación de tres soluciones. La primera solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) a una concentración de 0.8 M, la segunda con una concentración de 2M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y la tercera de nitrato de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2M. Las

tres disoluciones se llevaron a precipitación constante gota a gota en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado en agitación constante; el pH se mantuvo constante a 9.

Finalizada la precipitación, la muestra se llevó a un tratamiento hidrotérmico por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos. Después del tratamiento ultrasónico, los sólidos fueron recuperados por decantación y lavados con agua desionizada (250 mL/g) tres veces, para finalmente ser secados a 70 °C por 24 horas en una estufa. La secuencia de pasos que componen estos procesos se representa en la Figura 2.2

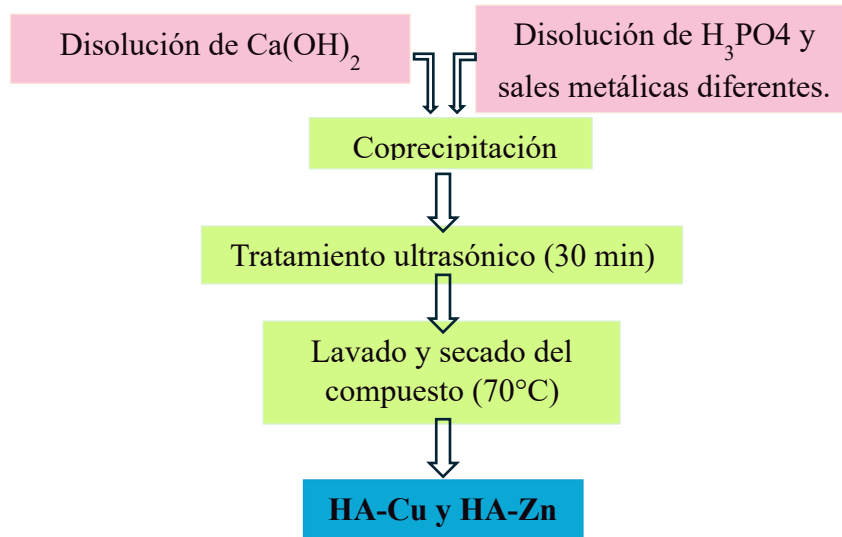


Figura 2.2. Procedimiento de síntesis de HA con iones metálicos.

2.4 Síntesis de hidrotalcita de referencia

La síntesis se llevó a cabo utilizando cuatro soluciones. La primera solución de nitrato de cobre ($\text{CuN}_2\text{O}_6 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2.5 M, la segunda una solución de nitrato de magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2.5 M, la tercera una solución de nitrato de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2.5 M y una solución de hidróxido de sodio como agente precipitante a una concentración de 2 M. Las cuatro disoluciones se llevaron a precipitación constante gota a gota en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado en agitación constante; el pH se mantuvo constante a 9.

Finalizada la precipitación, la muestra se llevó a un tratamiento hidrotérmico por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos. Después del tratamiento ultrasónico, los sólidos fueron recuperados por decantación y lavados con agua desionizada (250 mL/g) tres veces, para finalmente ser secados a 70°C por 24 horas en una estufa. En la Figura 2.3 se presenta la secuencia de etapas que conforman este proceso

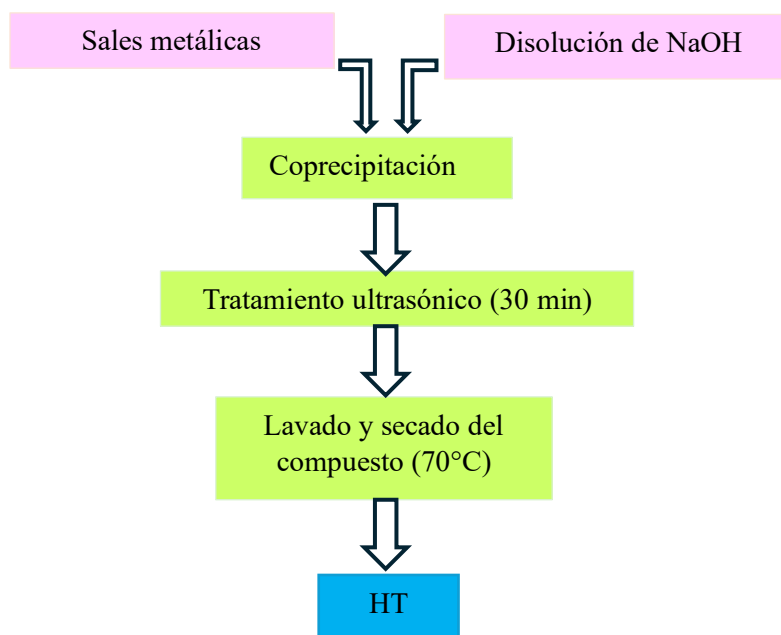


Figura 2.3. Procedimiento de síntesis de HT.

2.5 Síntesis simultánea de compósitos hidrotalcita-hidroxiapatita por el método de ultrasonido

Las síntesis de los materiales compósitos se llevó a cabo por el método de síntesis simultánea que consiste en la adición de varias soluciones acuosas correspondientes a las hidroxiapatitas y a los compuestos tipo hidrotalcita. Para las hidroxiapatitas se colocarán soluciones acuosas, de ácido fosfórico y de hidróxido de calcio, para la hidrotalcita se utilizarán disoluciones acuosas de nitratos de los metales correspondientes a una concentración de 2.5 M y una solución de hidróxido de sodio como agente precipitante a una concentración de 2 M. Para la síntesis de los compósitos se colocarán los precursores de las hidroxiapatitas y las hidrotalcitas en buretas diferentes adicionándolas de forma lenta y simultánea a un vaso de precipitado con 50 mL de agua

en agitación y a un pH constante de 9. El gel resultante se lleva a tratamiento por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos. Después de la sonificación, los sólidos se recuperaron por decantación y se lavaron con agua desionizada tres veces, para finalmente ser secados a 70°C por 24 horas en una estufa. Se prepararon 3 tipos de compósitos HT(CuMg)-HA a una relación de 30, 50 y 70% en masa de HA. La secuencia de pasos de este proceso se explica en la Figura 2.4.

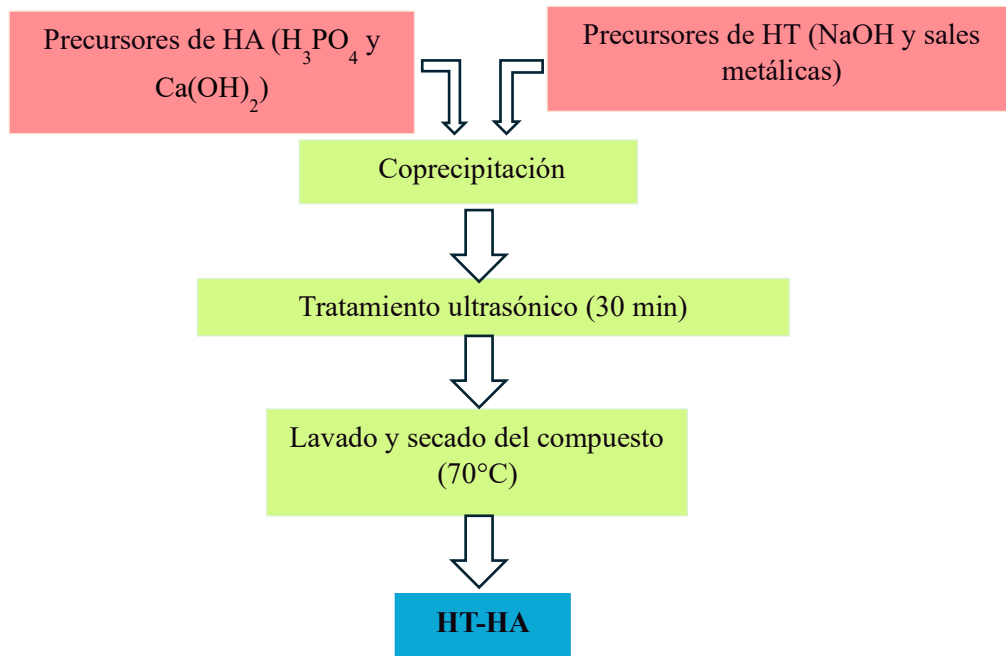


Figura 2.4. Procedimiento de síntesis de compósito HA-HT.

2.6 Materiales sintetizados

Se sintetizó un total de ocho materiales diferentes: la hidroxiapatita (HA), hidroxiapatita con zinc (HA-Zn), hidroxiapatita con cobre (HA-Cu), dos hidrotalcitas de referencia (HT) una con cobre y magnesio como metales divalentes (HT- CuMg) y una con cobre como único metal divalente (HT-Cu) y tres compósitos de hidrotalcita e hidroxiapatita con porcentajes máxicos de 30, 50 y 70%. Las características de estas muestras se encuentran resumidas en la Tabla 2.2, así como fotografías de algunos materiales en la Figura 2.5.

Tabla 2.2. Materiales sintetizados.

Materiales sintetizados			
Clave	Composición	Porcentaje másico de HT-HA	Relación molar del componente HT (M^{2+}/Al)
HA	HA	-	-
HA-Zn	HA-Zn	-	-
HA-Cu	HA-Cu	-	-
HT30-HA	HT(CuMg)-HA	30-70	2
HT50-HA	HT(CuMg)-HA	50-50	2
HT70-HA	HT(CuMg)-HA	70-30	2
HT-CuMg	HT(CuMg)	-	2
HT-Cu	HT(Cu)	-	2

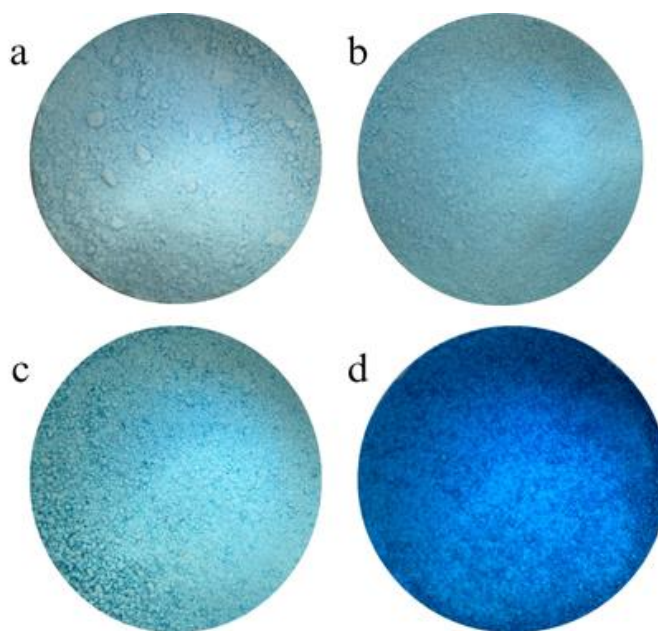


Figura 2.5. Muestras: a) HT50-HA, b) HT70-HA, c) HT-CuMg y d) HT-Cu.

2.7 Caracterización de los materiales

2.7.1 Difracción de rayos X

Este análisis permite calcular la distancia interlaminar utilizando la ley de Bragg ($n\lambda = 2d \sin \theta$), los parámetros de celda a ($a = 2 \times d_{110}$) y c ($c = 3 \times d_{003}$) y el diámetro promedio de poro obtenido por la ecuación de Scherrer, que relaciona la anchura media FWHM (Full Width at Half Maximum) de un pico en el difractograma, su posición, la longitud de onda de rayos X y una constante k , llamada constante de Scherrer.

$$D_p = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

k = Constante de Scherrer = 0.9

β = Full Width at Half Maximum.

λ = Longitud de onda de rayos X (1.54178 Å).

θ = Posición del pico en el difractograma.

Asimismo, los difractogramas se pueden comparar con las tarjetas clasificadas del Joint Committee of Power Diffraction Standards (JCPDS) que contienen más de 16 000 difractogramas de rayos X clasificados y ordenados para identificar la estructura, cristalinidad y pureza de los compuestos. Los análisis de difracción de rayos X se realizaron con un difractómetro para polvos modelo Bruker D8 Advance utilizando como radiación la línea $K\alpha$ de cobre (1.54056 Å). El tamaño de paso fue de 0.03 con un incremento de 0.3 para un barrido de 5 a 70° en ángulos 2θ . El tamaño de paso fue de 0.03 con un incremento de 0.3 para un barrido de 5 a 70° en ángulos 2θ .

2.7.2 Espectroscopía de infrarrojo

Se identificaron las bandas características de los sólidos en los espectros de infrarrojo obtenidos con el equipo Digilab Excalibur FTS 3000 con un rango de escaneo de 4000 a 400 cm^{-1} con una media de 32 scans. Las muestras se prepararon con KBr puro (99.999%, Merck) y se analizaron en forma de pastilla.

2.7.3 Fisisorción de nitrógeno

Las áreas específicas BET y la distribución de tamaño de poros de los materiales compósitos, así como las hidrotalcitas de referencia se obtuvieron en el equipo Micromeritics ASAP 2020. Se colocó en el equipo de 500 a 150 mg según el material a 80 °C durante 2 h y 150 °C durante 8 h a un vacío de 30 μmHg . Después del pretratamiento, el material se evaluó en intervalos de presión relativa de P/P_0 entre 0.0005 y 0.99 a una presión de desgasificación 5 μmHg . Las distribuciones de tamaños de poro se determinaron mediante el modelo BJH.

2.7.4 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido proporciona información sobre la morfología y distribución de tamaño de partícula, utilizando el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. En este análisis se empleó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6610LV, que opera a 20 kV y cuenta con un detector de dispersión de energía de rayos X (EDS). Esta técnica necesita que las muestras sean previamente cubiertas con oro para evitar la distorsión de las imágenes durante el análisis.

2.7.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)

La espectroscopía de dispersión de rayos X se utilizó para determinar la composición elemental de una muestra en sitios específicos. Con esta técnica se obtuvieron las relaciones molares de la hidroxiapatita de referencia (HA), las hidrotalcitas de referencia (HT-CuMg y HT-Cu) y los compósitos HT-HA, utilizando el mismo equipo usado para la técnica de microscopía electrónica de barrido, es decir JEOL JSM-6610LV.

2.8 Cepa bacteriana

La cepa bacteriana utilizada en este ensayo fue adquirida en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales

Las condiciones generales para el crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) es el uso del medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), con una incubación a 37° C durante 24 a 48 h en condiciones microaerofílicas. Se sembró en placas de medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), utilizando el método de Kirby-Bauer modificado. Las hidroxiapatitas con iones metálicos, así como los compósitos fueron probados con una cantidad de 50 mg colocados sobre las placas con un diámetro de 1.2 cm. Después las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, al concluir esas 24 h se determinó visualmente la presencia de halos de inhibición. Las placas fueron regresadas a la incubadora por 24 h más, al concluir ese tiempo se volvió a evaluar la presencia de halos de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.10 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se empleó una versión modificada del método de microdilución en caldo, siguiendo los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El procedimiento consistió en lo siguiente: Un pre inculo de la cepa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) se colocó en 25 mL de caldo MRS. Se colocaron 8 tubos de ensayo con 10 mL de caldo MRS, se depositaron diferentes concentraciones del compósito HT70-HA a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25 mg/mL) y dos tubos de 10 mL de MRS, uno como control negativo y otro como blanco sin contener la bacteria. Debido a que el compósito presenta una coloración azul causada por el cobre, se midió primero la absorbancia del medio con el material sin bacteria, así como la absorbancia del medio sin material y sin bacteria (blanco).

A cada tubo se le agregó 20 µL del preinoculo de la batería *S. mutans*, equivalente al 0.5 de la escala McFarland que equivale aproximadamente a 1×10^8 UFC/mL y se colocaron en la incubadora a 37 °C por 24 h. Finalizado ese tiempo se midió la absorbancia a 620 nm, restando la absorbancia ocasionada por el material y seleccionando la concentración que haya presentado una absorbancia resultante menor. Los tubos de ensayo fueron regresados a la incubadora por 24 h más y se midió la absorbancia y se seleccionó la absorbancia menor. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Del tubo seleccionado se realiza una disolución seriada en 5 tubos con 9 mL de agua de peptona colocando 1 mL como volumen de paso en cada tubo. Una vez realizada la dilución se coloca 1 mL de la solución de cada tubo en placas Petri vacías por duplicado para ser llenadas con Agar de medio MRS. Las placas se dejaron gelificar a 37°C durante 24 h. Después del tiempo de incubación se hace la cuantificación de colonias formadas en cada placa usando un equipo contador de colonias (Q-20) para poder conocer la cantidad de colonias que se encuentran en el tubo seleccionado, realizando una media de las colonias contadas. Este procedimiento se resume en las Figuras 2.6 y 2.7.

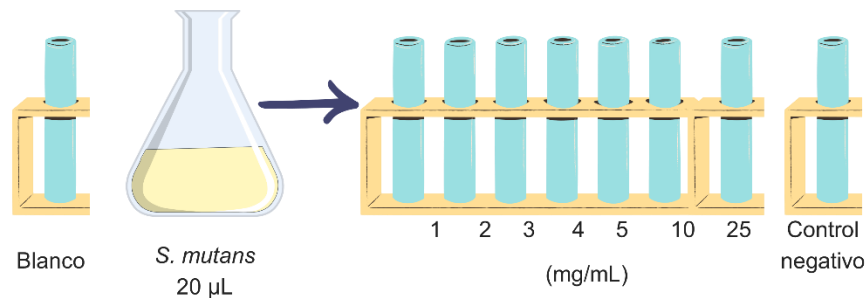


Figura 2.6. Adición del compuesto HT70-HA y la bacteria *S. mutans*.

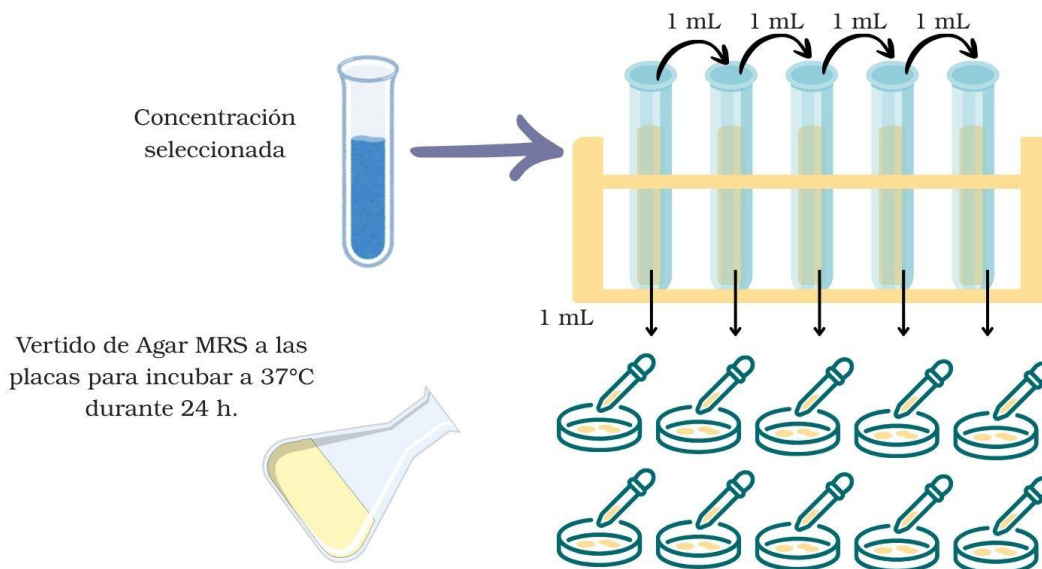


Figura 2.7. Esquema de procedimiento de disolución seriada y de vertido en placa.

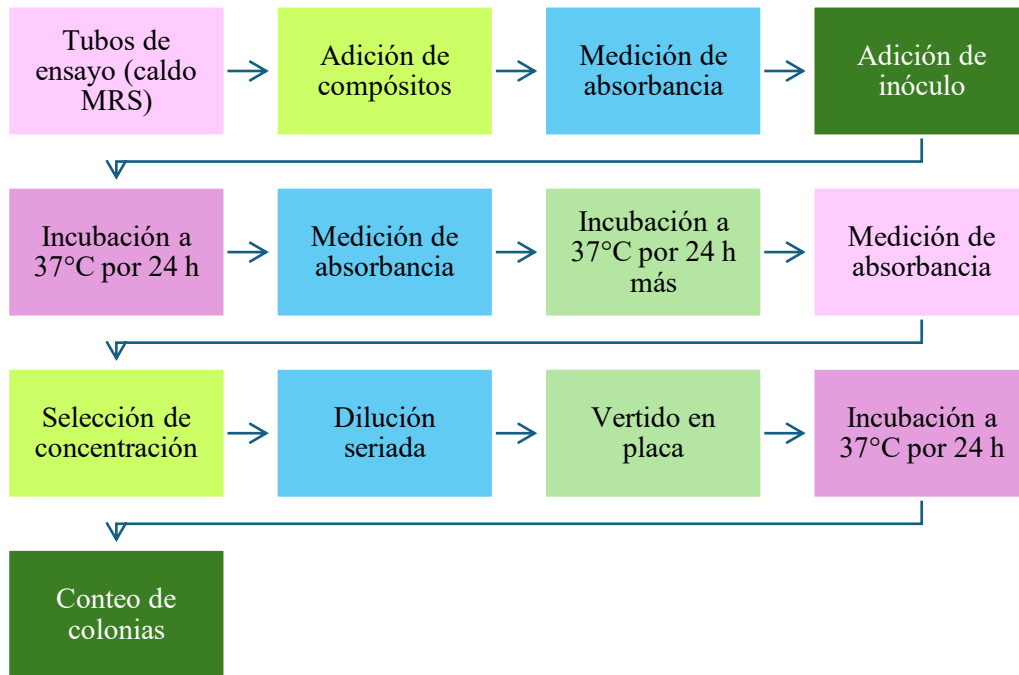


Figura 2.8. Esquema de obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria.

The page features a vertical blue line on the left side and several overlapping blue circles of different shades in the top right and bottom left corners. The main text is centered in a blue, serif font.

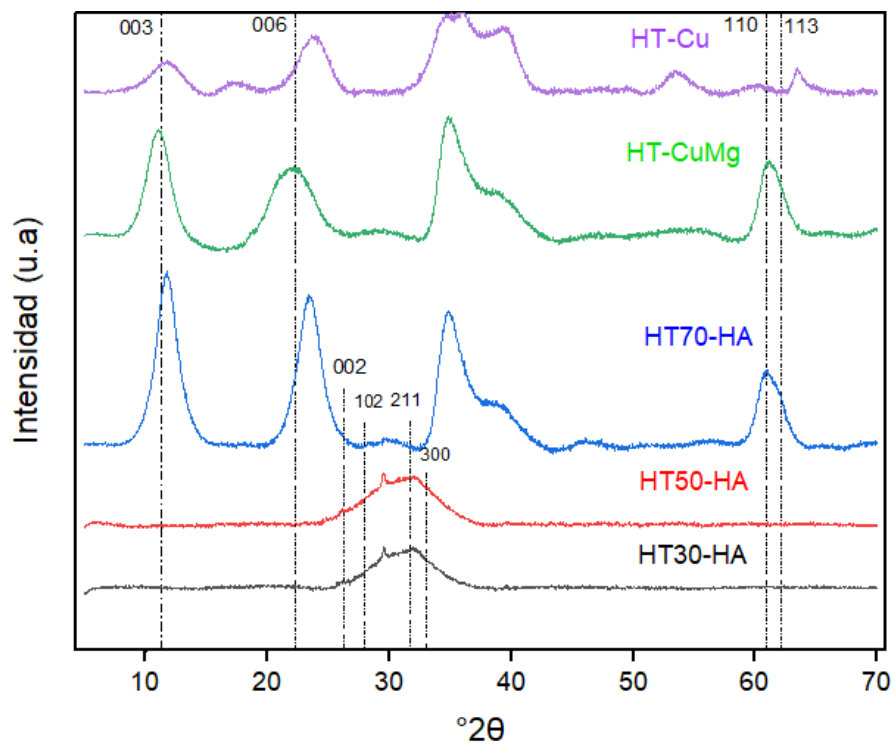
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los materiales

3.1.1 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X (DRX) constituye una de las principales técnicas de caracterización estructural empleadas en la identificación de materiales tipo hidrotalcita y sus compósitos. En la Figura 3.1 se presentan los difractogramas correspondientes tanto a las hidrotalcitas de referencia como a los compósitos sintetizados. Las muestras HT-Cu, HT-CuMg y HT70-HA exhiben los picos característicos de las hidrotalcitas, de acuerdo con la tarjeta JCPDS 014-0191.



Figuras 3.1. Difractogramas de rayos X de las hidrotalcitas de referencia (HT-Cu y HT-CuMg) y los compósitos HT30-HA, HT50-HA y HT70-HA.

Se observan reflexiones intensas a valores de 2θ cercanos a 11.5° y 23.0° , correspondientes a los planos cristalográficos (003) y (006), respectivamente. La alta intensidad de estos picos sugiere una estructura altamente cristalina y un notable grado de ordenamiento en el apilamiento de las láminas. En la Tabla 3.2 se reportan las distancias basales derivadas de la reflexión (003), con valores de 7.5, 8.0 y 7.6 Å para las muestras HT-Cu, HT-CuMg y HT70-HA, respectivamente. Estos valores son indicativos de la presencia predominante de aniones carbonato en el espacio interlaminar, en lugar de nitratos.

La simetría y la presencia de un único máximo en los picos (003) y (006) indican una distribución homogénea de aniones en la región interlaminar [Velázquez-Herrera et al., 2021]. En el caso de la muestra HT-Cu, se observa una menor intensidad de los picos, atribuible a la presencia exclusiva de Cu^{2+} como catión divalente. Este ión genera distorsiones estructurales considerables debido al efecto Jahn-Teller, lo que afecta negativamente la cristalinidad de la hidrotalcita [Velázquez-Herrera y col., 2021]. En contraste, la muestra HT-CuMg, que incorpora Mg^{2+} como catión divalente adicional, muestra picos más definidos y de mayor intensidad, evidenciando una mejor organización estructural.

En estas muestras se observan dos picos en el rango de 2θ entre 35.5° y 40° , los cuales corresponden al plano cristalográfico (200) del óxido de cobre (CuO), según la tarjeta JCPDS 00-041-0254. La presencia de este compuesto indica una impureza en las muestras tratadas hidrotérmicamente (HT), especialmente en la muestra HT-Cu. Esto se debe a su alto contenido de cobre, lo que favorece la formación de CuO como resultado del efecto Jahn-Teller en los iones Cu^{2+} [Tanasoí y col., 2009] [Bin Mobarak y col., 2024].

Todas las muestras analizadas presentan tamaños de cristalito relativamente pequeños, lo que puede estar relacionado con las condiciones de síntesis. En particular, la síntesis se llevó a cabo a pH constante de 9, generando una sobresaturación moderada. Además, el tratamiento ultrasónico aplicado durante 30 minutos interrumpió el crecimiento cristalino, limitando el desarrollo de estructuras de mayor tamaño [Velázquez-Herrera y col., 2021].

Los parámetros de celda cristalina correspondientes a las muestras analizadas se presentan en la Tabla 3.2. El parámetro *a* se mantiene constante en un valor de 3.0 Å, lo cual indica que la distancia promedio entre cationes metálicos dentro de las capas es similar en todas las muestras.

Este parámetro está directamente relacionado con la distancia metal-metal en las láminas de la hidrotalcita [Velázquez-Herrera y col., 2021].

En cuanto al parámetro *c*, que representa la altura de la celda unitaria, que se relaciona con el espaciado interlaminar y la naturaleza de los aniones y cationes presentes, se observaron variaciones en función de la composición de cada muestra. Para la muestra HT-Cu, el valor de *c* es de 22.5 Å; para HT-CuMg, 24.1 Å; y para el compuesto HT70-HA, 22.9 Å.

Según la literatura, el parámetro *c* para hidrotalcitas intercaladas con aniones carbonato es de aproximadamente 22.95 Å, mientras que para aquellas que contienen aniones nitrato, el valor asciende a 26.37 Å [Velázquez-Herrera y col., 2018]. El valor observado para el compuesto HT70-HA se encuentra en concordancia con la presencia de aniones carbonato como especie predominante en la región interlaminar. Por otro lado, los valores obtenidos para las muestras HT-Cu y HT-CuMg no coinciden completamente con ninguno de los valores característicos mencionados. Esto sugiere que ambas hidrotalcitas contienen una mezcla de aniones carbonato y nitrato en su espacio interlaminar.

El diámetro promedio de cristalito para las muestras analizadas se presenta en la Tabla 3.1. En todos los casos, se observó un valor inferior a 1 Å, lo cual puede atribuirse al tratamiento ultrasónico aplicado durante la síntesis. Este tratamiento tiende a limitar el crecimiento cristalino, promoviendo la formación de estructuras de menor tamaño [Etinosa y col.,2024].

Tabla 3.1. Parámetros de celda de las muestras.

Muestra	Parámetros de celda			
	<i>d</i> ₀₀₃ (Å)	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	<i>D_p</i> (Å)
HT-Cu	7.5	3.1	22.5	0.9
HT-CuMg	8.0	3.0	24.1	0.8
HT70-HA	7.6	3.0	22.9	0.7

En cuanto a los compósitos HT30-HA y HT50-HA, no se detectaron los picos característicos de la hidrotalcita. En su lugar, se observa únicamente un pico ancho y de baja intensidad en el intervalo de 20° entre 25° y 35°. Este rango comprende reflexiones correspondientes a los planos (002), (102), (211) y (300), asociados a la fase de hidroxiapatita,

según la tarjeta JCPDS 014–0191. Dichas reflexiones aparecen como un único pico amplio en los tres compósitos analizados, aunque con una intensidad considerablemente menor en la muestra HT70-HA [Velázquez-Herrera y col., 2018].

La aparición de un solo pico ancho podría deberse a la presencia de partículas extremadamente pequeñas, es decir, podría corresponder a un compuesto de hidroxiapatita formado por partículas muy pequeñas, o a la formación de un material de naturaleza amorfa. Este tipo de señal es típico de compuestos que presentan un ordenamiento estructural de corto alcance, característico de materiales amorfos [Segura-Pérez y col.,2020].

El comportamiento amorfo observado en los compósitos podría estar relacionado con la sustitución iónica dentro de la estructura de la hidroxiapatita. La incorporación de iones Cu^{2+} , con radio iónico de 0.73 Å, puede provocar una disminución en los parámetros de celda a y c , favoreciendo la formación de fases secundarias como el fosfato β -tricálcico. Por otro lado, la presencia de iones Mg^{2+} , cuyo radio iónico es de 0.65 Å (menor que el del ion Ca^{2+} , que es de 0.68 Å), puede inducir un acortamiento de los enlaces a lo largo del eje c de la estructura de la hidroxiapatita (HA), lo cual también contribuye al desorden estructural [Velázquez-Herrera y col., 2018].

De acuerdo con el análisis del difractogramas, se confirma formación hidrotalcita en las muestras HT-Cu, HT-CuMg y HT70-HA, a través de la presencia de picos característicos localizados en valores de 2θ cercanos a 11.5° y 23.0° , correspondientes a los planos (003) y (006), respectivamente. La muestra HT-Cu mostró menor cristalinidad, atribuida al efecto Jahn-Teller generado por la presencia exclusiva de Cu^{2+} como catión divalente. La incorporación de Mg^{2+} en la muestra HT-CuMg favoreció una mejor organización estructural, evidenciada por picos más definidos y de mayor intensidad en el difractograma. Las distancias basales (d_{003}) obtenidas, junto con los valores del parámetro de celda c , sugieren que las muestras HT-Cu y HT-CuMg contienen una mezcla de aniones carbonato y nitrato en el espacio interlaminar, mientras que en el compósito HT70-HA predomina la presencia de aniones carbonato.

Los compósitos HT30-HA y HT50-HA no presentaron picos asociados a la fase hidrotalcita. En su lugar, se identificó un único pico ancho y de baja intensidad en el rango de 2θ entre 25° y 35° , correspondiente a reflexiones típicas de la hidroxiapatita, aunque con características asociadas a materiales amorfos o materiales formados por partículas muy pequeñas.

3.1.2 Espectroscopía de infrarrojo

3.1.2.1 Hidroxiapatita de referencia e hidroxiapatitas con iones de Cu^{2+} o Zn^{2+}

El análisis mediante espectroscopía infrarroja permitió identificar las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales característicos de la hidroxiapatita (HA). Los espectros obtenidos para las distintas muestras se presentan en la Figura 3.2.

La hidroxiapatita muestra bandas distintivas asociadas al grupo fosfato (PO_4^{3-}) en torno a los 1036, 604 y 565 cm^{-1} . Los grupos hidroxilo (OH^-), presentes en la estructura de la HA, exhiben una banda intensa a 3444 cm^{-1} , atribuida al estiramiento vibracional de alta energía, así como una banda a 1635 cm^{-1} correspondiente a la flexión del grupo OH. Cabe señalar que la intensidad de estas bandas puede verse influenciada por el grado de hidratación de la muestra, ya que las moléculas de agua absorben en regiones espectrales similares. Asimismo, se identificaron bandas correspondientes a iones carbonato (CO_3^{2-}), los cuales pueden incorporarse en pequeñas cantidades durante la síntesis, debido a la absorción de CO_2 atmosférico. Estas bandas se localizan típicamente en las regiones de 1420 y 871 cm^{-1} [Rivera y col., 2011].

En la Figura 3.2, los espectros correspondientes a la hidroxiapatita de referencia muestran las bandas del grupo fosfato en 1034, 606 y 562 cm^{-1} ; las bandas de los grupos OH aparecen en 3438 y 1642 cm^{-1} , y las bandas asociadas a los carbonatos, de baja intensidad, se ubican en 1411 y 865 cm^{-1} . En la muestra HA-Zn, las bandas correspondientes al grupo hidroxilo también se observaron en 3438 y 1642 cm^{-1} , mientras que las del grupo fosfato se localizaron en 1023, 606 y 562 cm^{-1} . Las bandas atribuibles a los iones carbonato se identificaron a 1417 y 877 cm^{-1} . La muestra HA-Cu mostró igualmente las bandas características de la hidroxiapatita. Las bandas correspondientes a los grupos OH se detectaron en 3433 y 1642 cm^{-1} , asociadas tanto a los hidroxilos estructurales como al contenido de agua en la muestra. Las bandas del grupo fosfato se localizaron en 1034 y 562 cm^{-1} , mientras que las correspondientes a los iones carbonato se presentaron, con menor intensidad, a 1417 y 871 cm^{-1} .

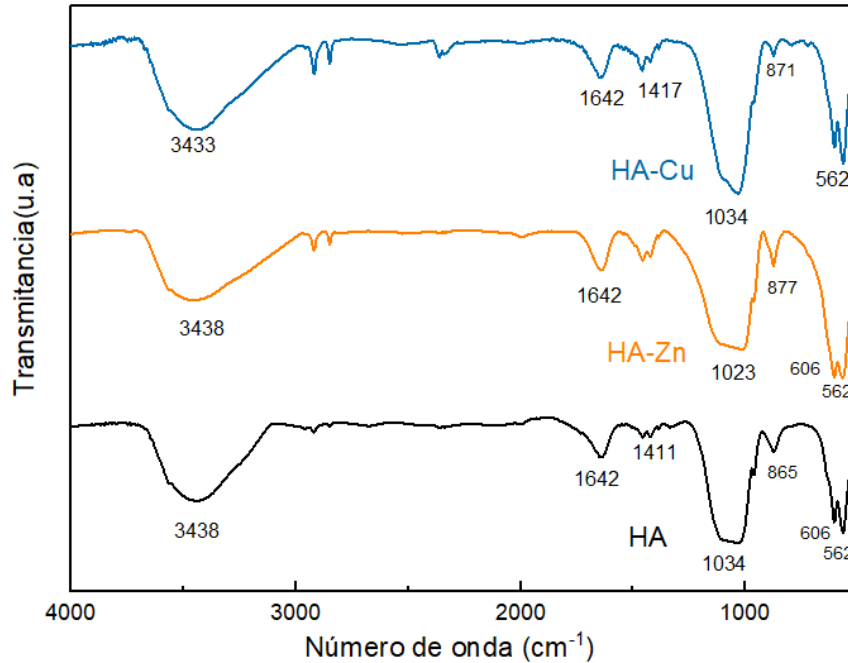


Figura 3.2. Espectros de infrarrojo de la hidroxiapatita de referencia y de hidroxiapatitas con iones metálicos Cu y Zn.

El análisis espectroscópico confirmó la presencia de los grupos funcionales característicos de la hidroxiapatita en todas las muestras estudiadas. Se identificaron consistentemente las bandas correspondientes a los grupos fosfato, hidroxilo y, en menor medida, a los carbonatos. Estos resultados respaldan la formación de hidroxiapatita en condiciones estándar.

3.1.2.2 Hidrotalcitas de referencia

Los espectros de infrarrojo correspondientes a las hidrotalcitas de referencia se presentan en la Figura 3.3. En el caso de la muestra HT-CuMg, se identificaron bandas de absorción a 3463 y 1636 cm^{-1} , asociadas a las vibraciones del grupo funcional hidroxilo (OH^-) y a la presencia de moléculas de agua interlaminar. Se observa una banda intensa a 1382 cm^{-1} , atribuida al grupo nitrato, debido al uso de sales precursoras nitrato en la síntesis de esta hidrotalcita. Adicionalmente, se identificaron bandas de absorción a 432 y 826 cm^{-1} , las cuales se relacionan con las vibraciones de enlace metal-oxígeno (Mg-O , Cu-O y Al-O), de acuerdo con lo reportado por Kloprogge et al. (2004).

En el espectro de la hidrotalcita con cobre (HT-Cu), las bandas correspondientes al grupo OH se localizan en 3456 y 1636 cm^{-1} , mientras que la banda del grupo nitrato también aparece a

1382 cm^{-1} , aunque con menor intensidad en comparación con HT-CuMg. Asimismo, se detectó una única banda de absorción a 419 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de enlace Cu-O y Al-O.

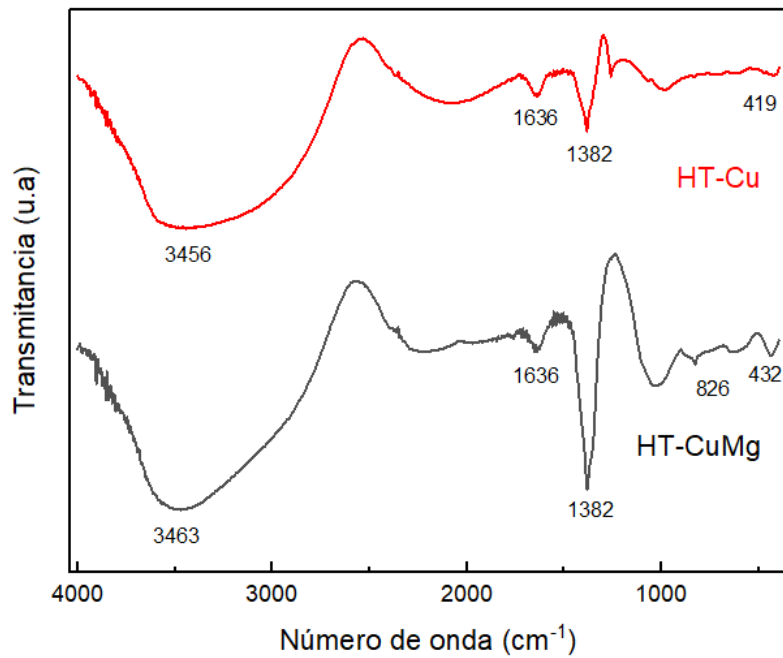


Figura 3.3. Espectros de infrarrojo de las hidrotalcitas de referencia.

Los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja permitieron identificar las bandas características de los grupos funcionales presentes en las hidrotalcitas HT-Cu y HT-CuMg. Ambas muestras presentaron bandas atribuibles a los grupos hidroxilo y nitrato, confirmando la presencia de agua estructural y aniones interlaminares provenientes de los precursores utilizados. La mayor intensidad de la banda de nitrato en HT-CuMg indica una mayor concentración relativa de este anión en la estructura.

3.1.2.3 Compósitos hidrotalcita-hidroxiapatita

En la Figura 3.4 se presentan los espectros de infrarrojo correspondientes a los tres compósitos sintetizados con proporciones másicas de 70, 50 y 30 % de HT y HA.

Para el compósito HT70-HA, las bandas correspondientes al grupo hidroxilo (OH^-) se localizan a 3464 y 1644 cm^{-1} . Las bandas características del grupo fosfato (PO_4^{3-}), propias de la

hidroxiapatita, se detectan a 1045 y 573 cm^{-1} , aunque con baja intensidad y menor anchura en comparación con la HA de referencia. Esta disminución puede atribuirse a la baja proporción de HA en la muestra. En contraste, la banda a 1383 cm^{-1} , correspondiente al grupo nitrato (NO_3^-), presenta una intensidad y anchura mayores respecto a los otros compósitos, debido a la mayor cantidad relativa de hidrotalcita en esta muestra.

En el espectro del compósito HT50-HA, las bandas de absorción del grupo OH aparecen a 3470 y 1638 cm^{-1} . El grupo fosfato presenta bandas a 1102 y 559 cm^{-1} . La banda de absorción de los nitratos se encuentra a 1317 cm^{-1} y muestra una intensidad considerablemente menor que en el compósito HT70-HA, lo que refleja la reducción del contenido de hidrotalcita.

Finalmente, el compósito HT30-HA presenta cinco bandas significativas. Las correspondientes al grupo hidroxilo se ubican a 3470 y 1630 cm^{-1} . La banda de nitrato, localizada en la región entre 1378 y 1383 cm^{-1} , muestra una intensidad mucho menor que en los compósitos anteriores y en las hidrotalcitas de referencia, debido a la baja concentración de esta fase en la muestra. Las bandas del grupo fosfato se identifican a 1105 y 553 cm^{-1} , con mayor intensidad y nitidez, lo cual concuerda con la mayor proporción de HA en este compósito.

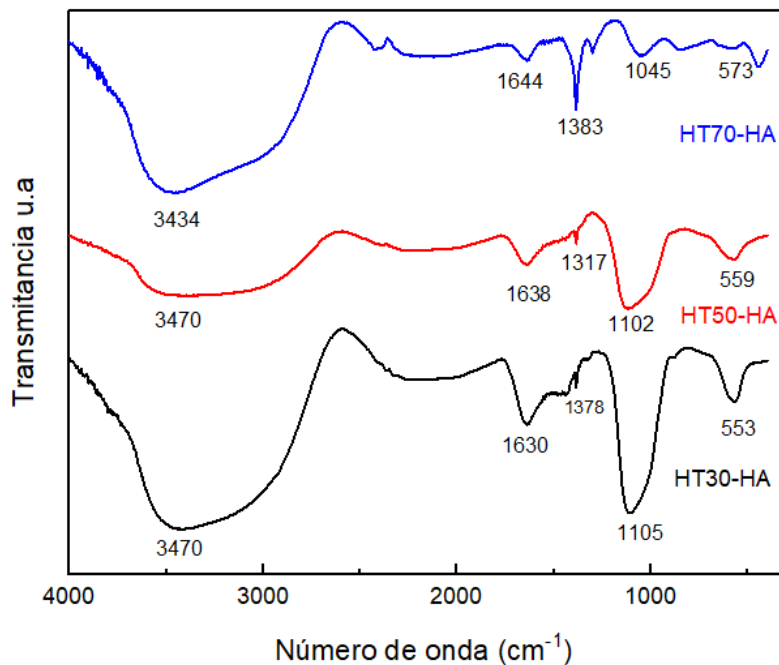


Figura 3.4. Espectros de infrarrojo de los compósitos hidrotalcita- hidroxiapatita.

La caracterización por espectroscopía infrarroja de los compósitos HT-HA permitió identificar las diferencias de las bandas de absorción en función de la proporción másica de los compósitos. Se observaron tendencias consistentes: a mayor contenido de hidrotalcita, mayor intensidad y anchura de la banda del grupo nitrato, mientras que un aumento en el porcentaje de hidroxiapatita favoreció la aparición más definida de las bandas del grupo fosfato. Las bandas asociadas a los grupos OH estuvieron presentes en todas las muestras, evidenciando la presencia de agua estructural y enlaces hidroxilo en ambos compuestos. Estos resultados confirman la formación de compósitos en la proporción másica teórica con base a las características de cada banda detectada por infrarrojo.

3.1.3 Fisisorción de nitrógeno

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución del diámetro de poros para las muestras HT-Cu, HT-CuMg, HT50-HA y HT70-HA se muestran en las Figuras 3.5 y 3.6. La muestra HT-Cu presenta una isoterma de tipo IV, característica de las hidrotalcitas, con un lazo de histéresis tipo H2. Este tipo de lazo se asocia con estructuras porosas complejas, formadas por poros interconectados de diversas formas y tamaños. En el caso de la muestra HT-CuMg, también se observa una isoterma de tipo IV, lo cual es coherente con su naturaleza arcillosa. Sin embargo, presenta un lazo de histéresis tipo H3, típico de materiales con estructura laminar o con poros en forma de hendidura.

Las isothermas correspondientes a los compósitos también se clasifican como tipo IV, lo que es común en materiales mesoporosos como la hidroxiapatita [Cruz-Hernández y col., 2023]. No obstante, se observan diferencias en el tipo de histéresis entre ambos compósitos. La muestra HT50-HA presenta un lazo de histéresis tipo H3, asociado tanto a partículas laminadas propias de las hidrotalcitas como a una red porosa que no se llena completamente durante el proceso de fisisorción. Por otro lado, el compósito HT70-HA presenta un lazo tipo H4, característico de partículas con poros en forma de hendidura ubicados en el rango de los microporos [Thommes y col., 2015].

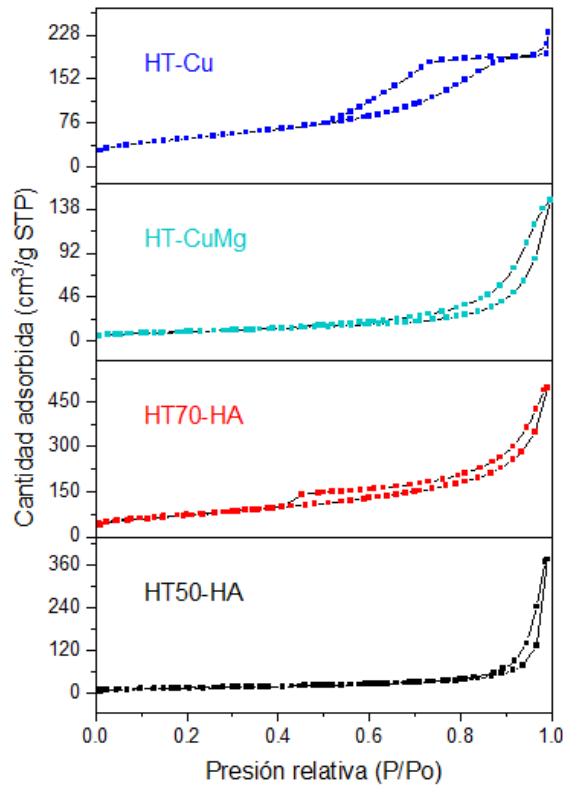


Figura 3.5. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno.

La distribución del tamaño de poro para las muestras HT50-HA y HT70-HA, así como para las hidrotalcitas de referencia, se muestra en la Figura 3.6. En la muestra HT-Cu se observan varios picos en el rango de 20 a 50 Å, siendo el más intenso el ubicado en 25 Å, lo cual indica un predominio de mesoporos. Para la muestra HT-CuMg se identifican únicamente dos picos, a 25 Å y 30 Å, siendo este último el de mayor intensidad. Ambos reflejan una elevada proporción de mesoporos en la estructura del material.

En cuanto a los compósitos, la muestra HT50-HA presenta cinco picos de baja intensidad distribuidos entre los 25 y 90 Å, mientras que el compósito HT70-HA muestra un único pico de alta intensidad a los 30 Å. Al igual que en las hidrotalcitas de referencia, ambos compósitos exhiben una distribución predominante de mesoporos, en concordancia con lo reportado en la literatura [Segura-Pérez et al., 2020].

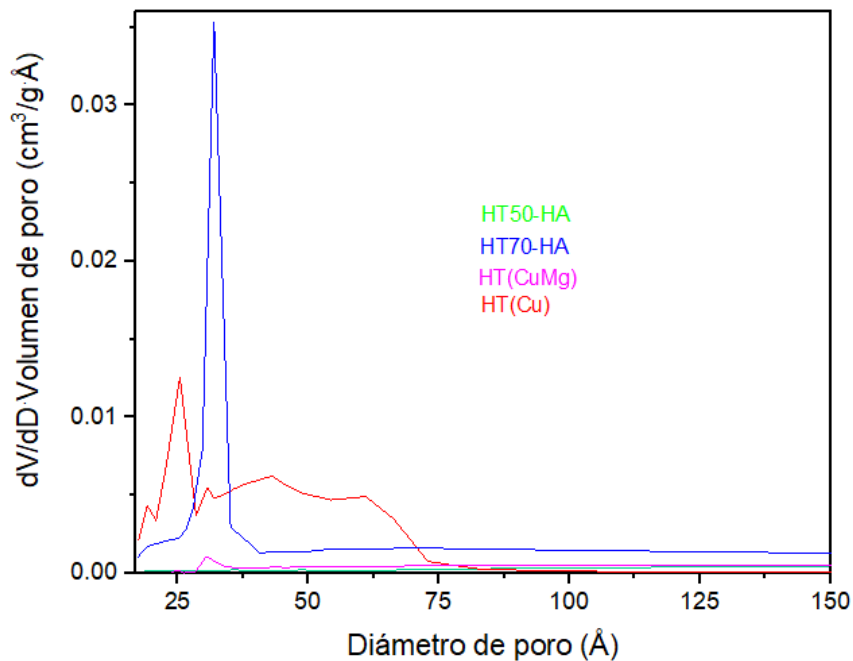


Figura 3.6. Distribuciones de tamaños de poros de las hidrotalcitas HT-Cu, HT-CuMg y los compósitos HT50-HA y HT70-HA.

Asimismo, en la Tabla 3.2 se reporta el área superficial y diámetro promedio de poro para las muestras; el área superficial de las hidrotalcitas de referencia fue de $9.3 \text{ m}^2/\text{g}$ para la HT-CuMg y de $32.9 \text{ m}^2/\text{g}$ para la HT-Cu. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura [Fetter y col., 2000]. Los compósitos HT-HA presentan áreas superficiales de $27.5 \text{ m}^2/\text{g}$ y $79.5 \text{ m}^2/\text{g}$ para las muestras de HT50-HA y HT70-HA, respectivamente. Ambos compósitos tienen un área superficial mayor que la que presenta la HT-CuMg. Al aumentar el porcentaje másico de hidrotalcita hay un aumento significativo en el área superficial, casi del doble en comparación con el compósito que solo contiene 50% de hidrotalcita y cuya área superficial es menor a la de la hidroxiapatita sintetizada a pH 9 que es de $66 \text{ m}^2/\text{g}$ [Cruz-Hernández y col., 2023]. Los diámetros de poros (D_p) de las hidrotalcitas de CuMg y Cu fueron de 27.5 y 35.82 \AA , respectivamente, mientras que el compósito HT50-HA presentó un diámetro promedio de 45.36 \AA y el compósito HT70-HA un diámetro menor, siendo de 31 \AA . El diámetro de poro de ambos compósitos es mayor que el que presenta la HT (CuMg) y el que contiene un porcentaje másico mayor de HA tiene un diámetro de poro mayor al que solo tiene 30%. Estos resultados sugieren que la presencia de

partículas de HA obstruye la superficie de la hidrotalcita debido a su alto grado de dispersión [Segura-Pérez y col.,2020].

Tabla 3.2. Área superficial y diámetro de poro promedio de las muestras.

Clave	Área superficial (m ² /g)	Dp (Å)
HT50-HA	27.5	45.6
HT70-HA	79.5	31
HT-CuMg	9.3	27.5
HT-Cu	32.9	35.85

El análisis de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución del tamaño de poro permitió caracterizar adecuadamente las propiedades de las hidrotalcitas sintetizadas (HT-Cu y HT-CuMg) y sus respectivos compósitos con hidroxiapatita (HT50-HA y HT70-HA). Las isotermas tipo IV observadas en todas las muestras confirman que son estructuras arcillosas, mientras que las diferencias en los tipos de lazos de histéresis (H2, H3 y H4) evidencian variaciones en la geometría y conectividad de los poros, influenciadas tanto por la composición como por el grado de incorporación de hidroxiapatita.

Las distribuciones de tamaño de poro respaldan estos hallazgos, mostrando que tanto las hidrotalcitas como los compósitos presentan un predominio de mesoporos, con ciertas diferencias en el número y la intensidad de los picos según la muestra analizada. En particular, la incorporación de hidroxiapatita en distintas proporciones modifica la estructura porosa, lo que podría influir en las propiedades funcionales de los materiales.

3.1.4 Microscopía electrónica de barrido

Con el propósito de determinar la morfología y la distribución de tamaño de partícula se realizó la caracterización de microscopía electrónica de barrido de todos los materiales sintetizados.

3.1.4.1 Hidroxiapatita de referencia

La morfología y el tamaño de partícula de la hidroxiapatita (HA) de referencia se determinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 3.7a se presenta la micrografía con una ampliación de 10 000X, en la cual se observa la formación de partículas uniformes, con tamaños variables que oscilan aproximadamente entre 0.05 a 0.2 μm y se encuentran en un denso aglomerado. En la Figura 3.7b, correspondiente a una micrografía con una ampliación de 20 000X, se observa que las partículas presentan superficies irregulares. La síntesis condujo a la formación de cristales irregulares con una distribución de tamaños heterogénea.

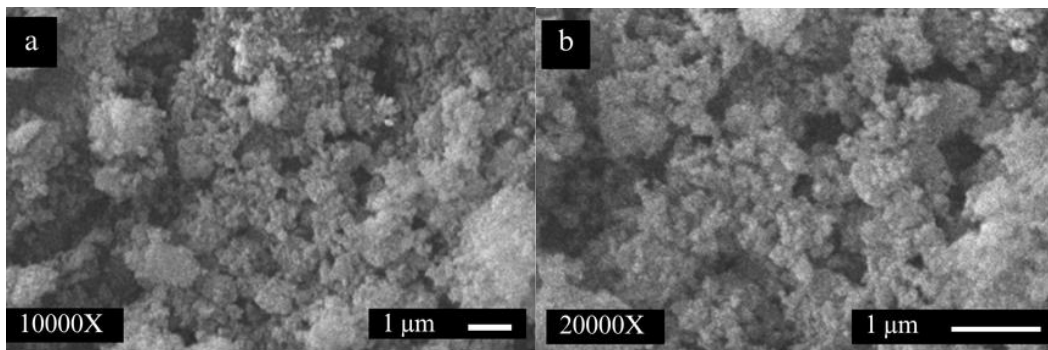


Figura 3.7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la hidroxiapatita de referencia (HA): a) aumento de 10 000X y b) aumento de 20 000X.

3.1.4.2 Hidrotalcitas de referencia

En la Figura 3.8a se muestra la micrografía de la muestra HT-CuMg, en la que se observa un notable grado de aglomeración. Las partículas se presentan compactadas, con formas y tamaños irregulares, en un rango aproximado de 0.05 a 0.1 μm . Se distinguen densos aglomerados con apariencia laminar. Los aglomerados de mayor tamaño presentan superficies lisas, mientras que las de menor tamaño exhiben superficies irregulares.

En la Figura 3.8b, correspondiente a una ampliación de 20 000X, se aprecian bloques de gran tamaño con morfología similar a la observada previamente. Estos aglomerados poseen superficies lisas, esta morfología es característica de las hidrotalcitas.

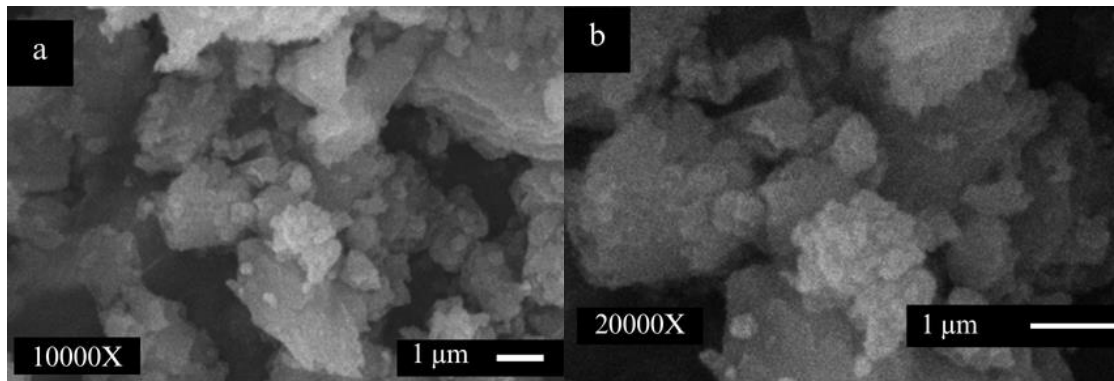


Figura 3.8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la hidrotalcita de referencia (HT-CuMg): a) aumento de 10 000X y b) aumento de 20 000X.

En la Figura 3.9a se muestra la micrografía de la muestra HT-Cu, obtenida con una ampliación de 5 000X. En ella se observan densos aglomerados de gran tamaño con superficies lisas, sobre cuya superficie se encuentran partículas de diferentes tamaños que van desde 0.06 a 1.2 μm y que aportan rugosidad a los aglomerados.

La Figura 3.9b corresponde a una micrografía de la misma muestra con el doble de aumento. Los bloques de material presentan una menor compactación, y pueden observarse partículas más pequeñas. Finalmente, en la Figura 3.9c, con una ampliación de 20 000X, las partículas se aprecian más en las superficies de los aglomerados. Esta morfología heterogénea es indicativa de una estructura compleja.

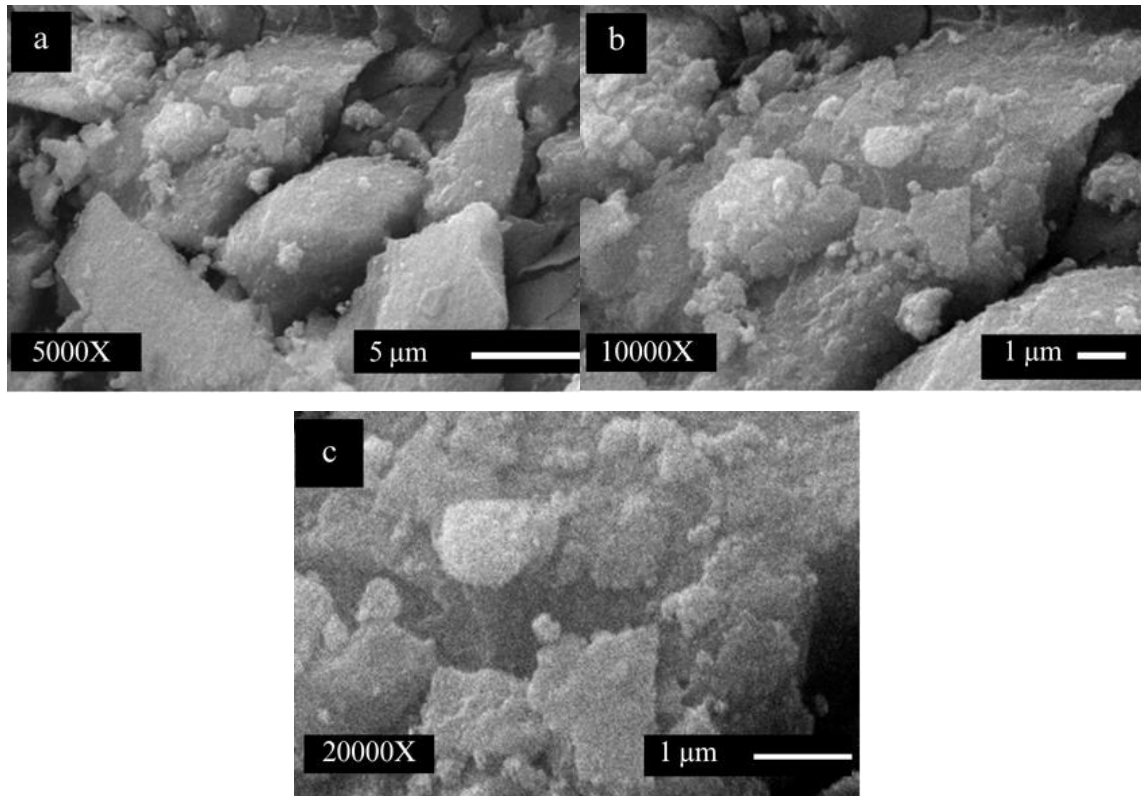


Figura 3. 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la hidrotalcita de referencia (HT-Cu): a) aumento de 5,000X, b) aumento de 10,000X y c) aumento de 20,000X.

3.1.4.3 Compósitos HT-HA

Los compósitos HT-HA se formularon con porcentajes máxicos de hidrotalcita (HT-CuMg)) de 30, 50 y 70 %. En la Figura 3.10a se muestra la micrografía correspondiente a un aumento de 10,000X de la muestra HT30-HA; en la cual se observan pequeñas partículas irregulares, distribuidas heterogéneamente. Los densos aglomerados presentan una morfología similar a la hidroxiapatita (HA). El tamaño promedio de las partículas es de aproximadamente 0.3 µm, valor que coincide con el tamaño característico de la hidroxiapatita, la cual suele presentarse en forma de partículas finas. En contraste, la hidrotalcita generalmente se manifiesta en bloques con estructura laminar de mayor tamaño. La Figura 3.10b muestra un aumento de 20 000X que permite confirmar la heterogeneidad en el tamaño de las partículas observadas.

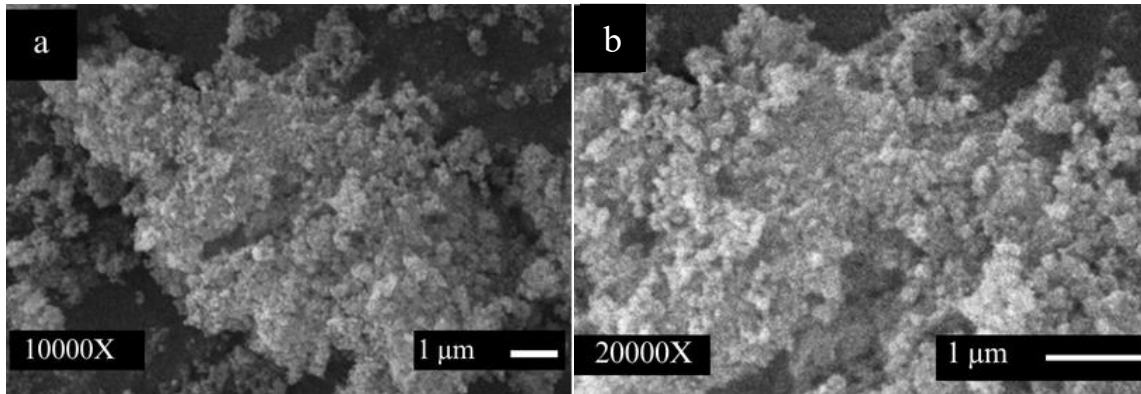


Figura 3.10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del compuesto HT30-HA: a) aumento de 10 000X y b) aumento de 20 000X.

En la Figura 3.11a se muestra la micrografía del compuesto HT50-HA obtenida a un aumento de 10 000X, donde se observa partículas pequeñas el tamaño de estas partículas se encuentra en un rango de 0.05 a 0.3 µm, con una distribución uniforme. En la Figura 3.11b, correspondiente a una micrografía con aumento de 20 000X, se aprecia una morfología similar, con la misma textura observada previamente. Esta apariencia podría estar relacionada con la composición equitativa del compuesto, el cual contiene un 50 % en masa de cada uno de los componentes, hidrotalcita e hidroxiapatita.

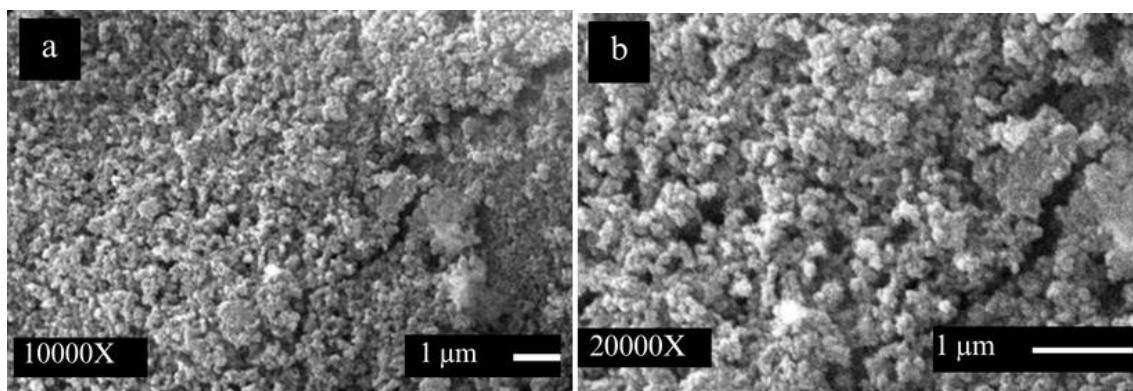


Figura 3.11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del compuesto HT50-HA: a) aumento de 10 000X y b) aumento de 20 000X.

A partir de la muestra HT70-HA se obtuvieron tres micrografías con aumentos de 5 000X, 10 000X y 20 000X, respectivamente. En la Figura 3.12a se observan partículas con tamaños

irregulares, que varían entre 0.06 y 0.12 μm , los aglomerados poseen una superficie rugosa pero también se identifican densos aglomerados de superficie lisa, características asociadas a la hidrotalcita. En la Figura 3.12b, correspondiente a un mayor acercamiento, se evidencia la porosidad de las partículas. Algunas de estas partículas se presentan aglomeradas, mientras que otras conforman bloques de pequeñas unidades. Finalmente, en la Figura 3.12c, con un aumento de 20 000X, se aprecian aglomerados con superficies tanto rugosas como lisa de forma heterogénea. Esta morfología confirma la coexistencia de ambos compuestos en el sistema y sugiere la incorporación efectiva de la hidrotalcita dentro de la matriz de hidroxiapatita.

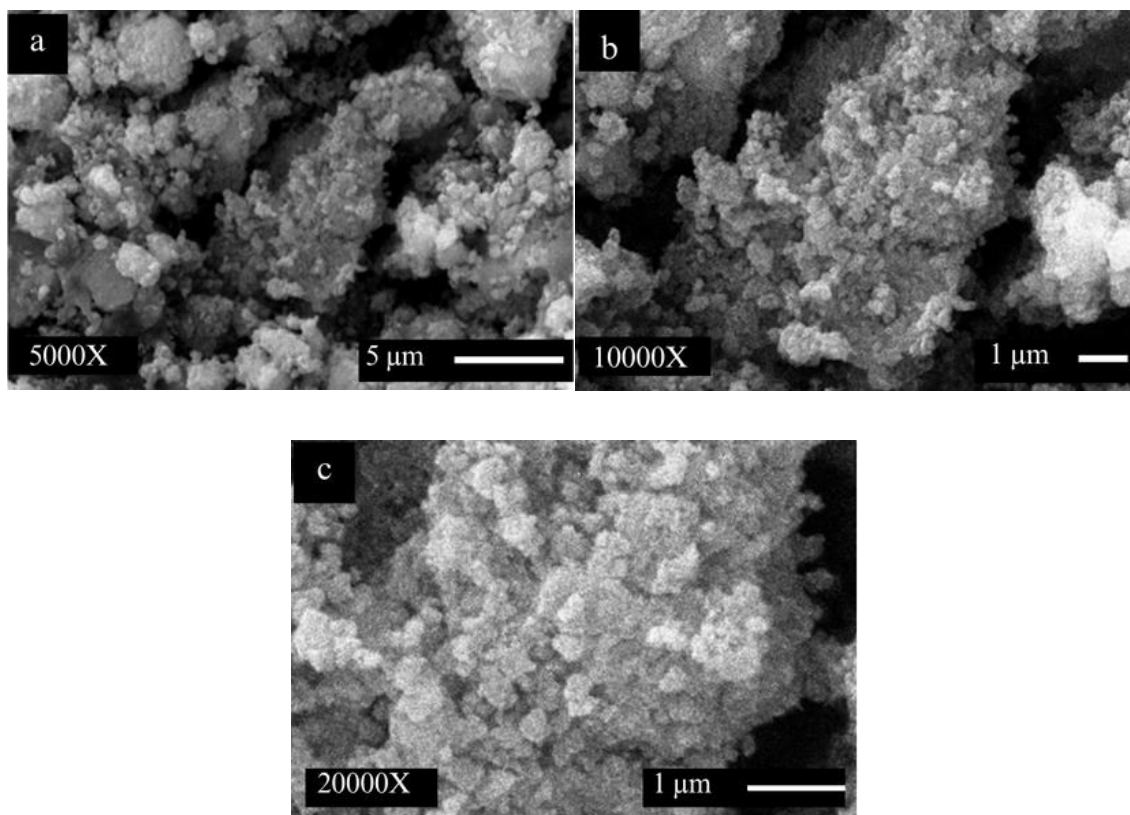


Figura 3.12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del compuesto HT70-HA: a) aumento de 5 000X, b) aumento de 10 000X y c) aumento de 20 000X.

El análisis morfológico realizado a las muestras de hidroxiapatita, hidrotalcita y los compósitos HT-HA permitió identificar características distintivas de cada material y evidenciar la interacción entre ambas fases en los compósitos obtenidos. A través de las micrografías

electrónicas se observó que la morfología de las partículas varía con el contenido de hidrotalcita, mostrando desde partículas pequeñas y homogéneas hasta estructuras aglomeradas con superficies lisas y rugosas, lo cual confirma la coexistencia e integración de las dos fases en los compósitos. Las micrografías también sugieren que la incorporación de la hidrotalcita influye en la distribución y tamaño de las partículas, así como en la porosidad del material.

3.1.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)

En la Tabla 3.3 se presentan las relaciones molares correspondientes a la hidroxiapatita de referencia, las hidrotalcitas de referencia y los tres compósitos HT-HA. La muestra de hidroxiapatita mostró una relación molar Ca/P de 1.5, valor que se aproxima al valor estequiométrico nominal de 1.67. La ligera disminución en esta relación podría atribuirse a las limitaciones de la técnica de espectroscopía de dispersión de energía (EDS), la cual solo permite el análisis superficial de la muestra, por lo que es posible que haya una mayor concentración de calcio en regiones más profundas que no son detectadas.

Para las hidrotalcitas de referencia, se obtuvieron relaciones molares Cu+Mg/Al y Cu/Al de 1.8 y 1.3, respectivamente. La hidrotalcita CuMg es la que más se aproxima a la relación teórica nominal de 2, lo cual indica que los cationes Cu^{2+} y Mg^{2+} se encuentran integrados en las capas de la hidrotalcita en una proporción adecuada respecto al Al^{3+} . En cambio, la hidrotalcita compuesta únicamente por Cu mostró una relación Cu/Al significativamente menor al valor esperado. Esta desviación puede estar relacionada con el efecto de la irradiación ultrasónica, la cual favorece la migración de iones Al^{3+} hacia el núcleo de las partículas de hidrotalcita [Velázquez-Herrera y col., 2018].

En cuanto a los compósitos HT-HA, las relaciones Ca/P determinadas fueron de 1.3, 0.9 y 1.3, todas ellas por debajo del valor nominal de 1.67. Esto sugiere que parte de los iones fosfato podrían no estar exclusivamente incorporados en la estructura de la hidroxiapatita, sino también actuando como aniones compensadores en la estructura de la hidrotalcita. Además, es posible que una fracción de estos no se encuentre en la superficie de la muestra y, por ende, no sean detectados mediante EDS. Por otro lado, las relaciones M^{2+}/Al (donde M^{2+} representa Cu^{2+} y Mg^{2+}) fueron de 2.0, 1.9 y 2.3 para los compósitos con 30 %, 50 % y 70 % de HT, respectivamente. Las dos primeras

se aproximan al valor teórico nominal para la hidrotalcita ($M^{2+}/Al = 2$), mientras que el compuesto HT-HA (70 %-30 %) presenta un valor superior en 0.3 unidades. Esta diferencia podría deberse a una mayor presencia de Cu y Mg en la superficie analizada, así como a la posible heterogeneidad química del área seleccionada para el análisis [Segura-Pérez y col., 2020; Velázquez-Herrera y col., 2018].

Tabla 3.3. Relaciones molares resultado de la composición elemental de los compuestos obtenida mediante la técnica EDS.

Clave	EDS	
	M^{2+}/Al	Ca/P
HA	-	1.5
HT-CuMg	1.8	-
HT-Cu	1.3	-
HT30-HA	2	1.3
HT50-HA	1.9	0.9
HT70-HA	2.3	1.3

Las relaciones molares obtenidas mediante espectroscopía EDS mostraron desviaciones respecto a los valores estequiométricos teóricos, tanto en la hidroxiapatita como en las hidrotalcitas y compósitos. Estas variaciones pueden atribuirse a las limitaciones propias de la técnica, como su carácter superficial, así como a efectos como la redistribución de iones inducida por la irradiación ultrasónica y a la posible heterogeneidad química de las muestras. En particular, las relaciones Ca/P menores a 1.67 en los compósitos sugieren una participación adicional de los fosfatos como aniones compensadores en la estructura de la hidrotalcita.

3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales

Se realizaron un total de 15 pruebas con el objetivo de evaluar la presencia de halos de inhibición de los diferentes materiales a las 24 y 48 horas de incubación, utilizando el método de Kirby-Bauer modificado. La medición de los halos de inhibición se realizó tomando en cuenta su diámetro total, incluyendo el área ocupada por el material, los resultados obtenidos se resumen en

la Tabla 3.4. En dicha tabla se reporta que las hidroxiapatitas con iones metálicos de cobre o zinc (HA-Cu y HA-Zn) no mostraron actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, al igual que el compósito HT30-HA. En contraste, el compósito HT50-HA presentó halos de inhibición de tamaño reducido, mientras que el compósito HT70-HA mostró los halos más amplios. Asimismo, las hidrotalcitas de referencia exhibieron una actividad antibacteriana significativa. Algunos de estos resultados se ilustran en la Figura 3.13.

La mayor actividad antimicrobiana observada en el compósito HT70-HA se atribuye a su mayor contenido de hidrotalcita (HT), y por lo tanto un mayor contenido de cobre. Al superar la concentración en la que el cobre actúa como micronutriente o cofactor enzimático, este metal genera efectos tóxicos en la bacteria. Específicamente, el exceso de cobre puede alterar los sitios activos de enzimas, oxidar componentes de la membrana celular y generar radicales hidroxilos, inhibiendo así el crecimiento bacteriano. Además, los iones hidroxilo presentes en la estructura de la HT actúan como potentes agentes oxidantes, provocando la desnaturalización de proteínas, daños en la membrana citoplasmática y el ADN, y facilitando la generación de radicales hidroxilos en presencia de oxígeno y agua. Estos mecanismos explican el incremento en la actividad antimicrobiana al aumentar la proporción de HT en el compósito [Segura-Pérez y col., 2018; Cervantes y col., 1994].

Tabla 3.4. Halos de inhibición obtenidos por el método Kirby-Bauer modificado.

Clave	Halos de inhibición (cm)	
	24 h	48h
HA	-	-
HA-Zn	-	-
HA-Cu	-	-
HT30-HA	-	-
HT50-HA	1.2	1.2
HT70-HA	1.6	1.7
HT-CuMg	1.4	1.4
HT-Cu	1.6	1.5

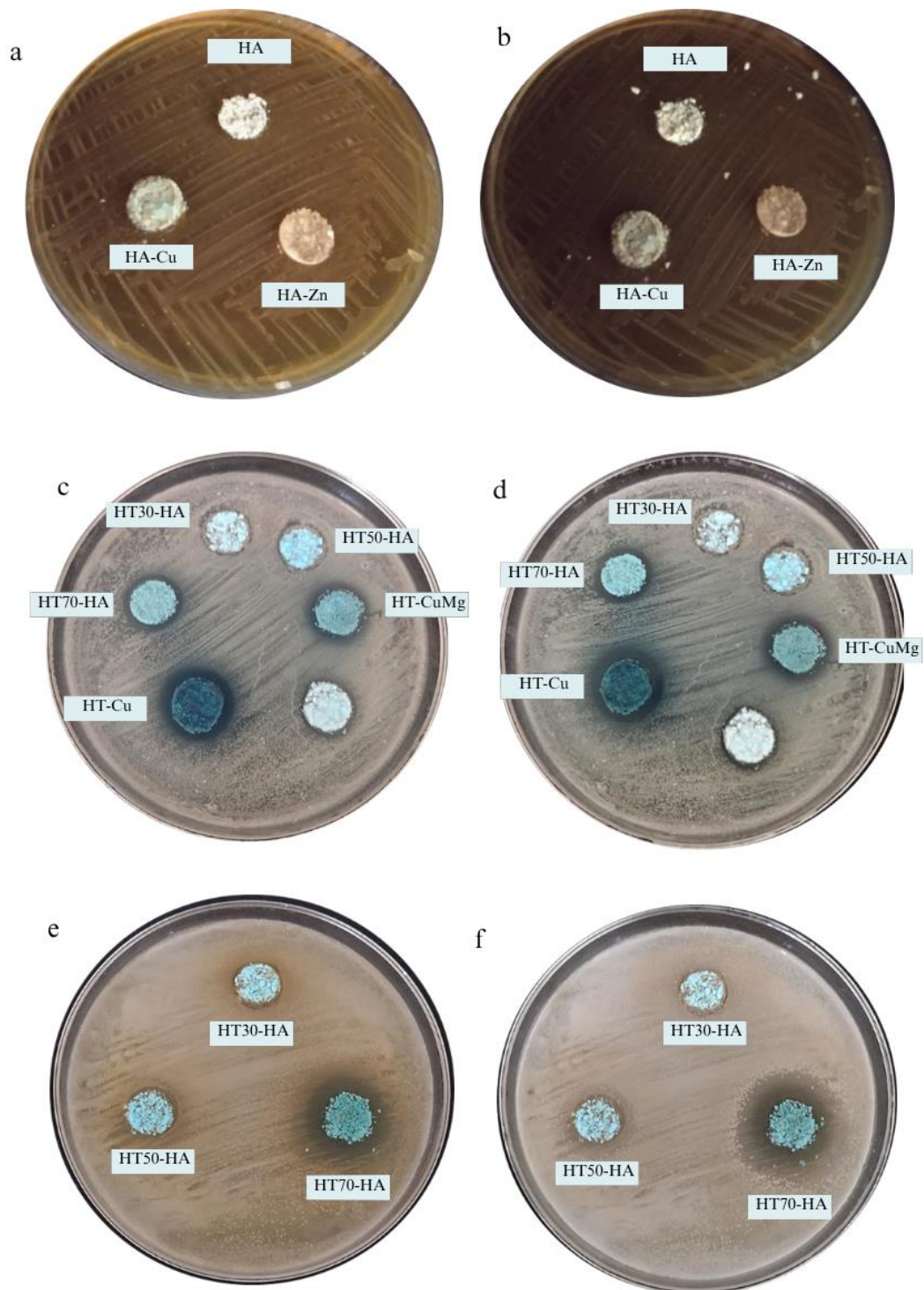


Figura 3.13. Halos de inhibición bacteriana obtenidos mediante el método de Kirby-Bauer modificado, tras 24 y 48 horas de incubación. a) y b) Hidroxiapatitas (de referencia, dopadas con zinc y con cobre); c) y d) Hidrotalcitas y compósitos; e) y f) Compósitos. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los materiales en diferentes combinaciones y tiempos de incubación.

Los resultados demuestran que la actividad antimicrobiana de los compósitos evaluados depende directamente de la proporción de hidrotalcita presente en su composición. En particular, el compósito HT70-HA presentó la mayor eficacia contra la *Streptococcus mutans*, atribuida a su elevado contenido de cobre y iones hidroxilo, los cuales generan efectos citotóxicos en las bacterias mediante mecanismos oxidativos. Estos hallazgos respaldan el potencial de los compósitos con alta concentración de HT como materiales antimicrobianos efectivos contra la *Streptococcus mutans*.

3.2.1 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el método de Kirby-Bauer modificado, el compósito HT70-HA fue el que generó los halos de inhibición de mayor tamaño. Por esta razón, se seleccionó dicho material para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando como criterio la absorbancia más baja, ya que una menor absorbancia indica una menor turbidez en la muestra y, por ende, una menor concentración bacteriana.

La determinación de la CMI se llevó a cabo utilizando concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25 mg/mL del compósito HT70-HA, realizándose cada ensayo por triplicado. Los resultados de absorbancia correspondientes se presentan en la Tabla 3.5. A las 24 horas de incubación, la menor absorbancia registrada fue de 0.22 para la concentración de 2 mg/mL, mientras que a las 48 horas de incubación la menor absorbancia fue de 0.48, correspondiente a la concentración de 10 mg/mL. Por lo tanto, se determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria del compósito HT70-HA es de 2 mg/mL a las 24 horas y de 10 mg/mL a las 48 horas de incubación.

Tabla 3.5. Absorbancia a las 24 y 48 h a las concentraciones 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25 mg/mL.

Absorbancia		
<i>Concentración</i>	<i>24h</i>	<i>48 h</i>
1 mg/mL	0.24	0.56
2 mg/mL	0.22	0.56
3 mg/mL	0.32	0.72
4 mg/mL	0.24	0.82
5 mg/mL	0.30	0.82
10 mg/mL	0.37	0.48
25 mg/mL	0.72	0.66

La concentración inicial de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), en ausencia del material, a las 24 horas de incubación, fue equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, lo cual corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL y una absorbancia de 1.874. Con base en esta referencia y en las absorbancias obtenidas para las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25 mg/mL del compuesto HT70-HA, se elaboró una gráfica (Figura 3.14) en la que se estiman las UFC/mL en función de la absorbancia.

En dicha gráfica, se observa que a la concentración correspondiente a la CMI (2 mg/mL) la cantidad estimada de UFC/mL es considerablemente menor, lo que confirma la inhibición del crecimiento bacteriano. Para obtener un valor más preciso de las UFC/mL a esta concentración, se realizó una dilución seriada, cuyos resultados se presentan en la sección posterior.

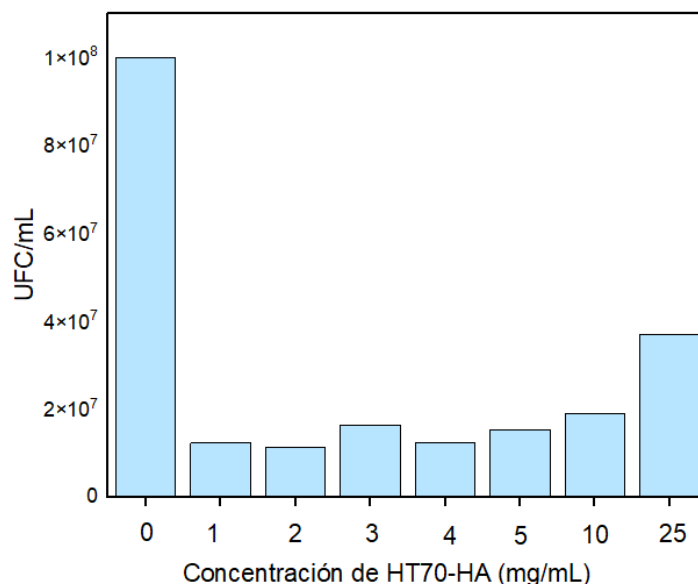


Figura 3.14. Gráfica de UFC/mL a distintas concentraciones del compuesto HT70-HA a las 24 h de incubación.

3.2.1 Dilución seriada

El objetivo de la dilución seriada fue cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) presentes en el tubo de ensayo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada tras 24 horas de incubación, es decir, 2 mg/mL del material HT70-HA. Para ello, se realizaron diluciones sucesivas hasta 10^{-5} (1:100,000), por duplicado. Posteriormente, se sembraron en agar y se procedió al conteo de colonias.

Para el cálculo del promedio de UFC/mL, únicamente se consideraron las colonias obtenidas en las diluciones 10^{-2} (1:100) y 10^{-3} (1:1,000), ya que en la dilución 10^{-1} (1:10) el número de colonias fue demasiado elevado para ser contado con precisión, mientras que en las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} el recuento fue inferior a 3 colonias. El conteo de colonias en agar se muestra en la Tabla 3.6, mientras que en la Figura 3.15 se muestran estas observaciones.

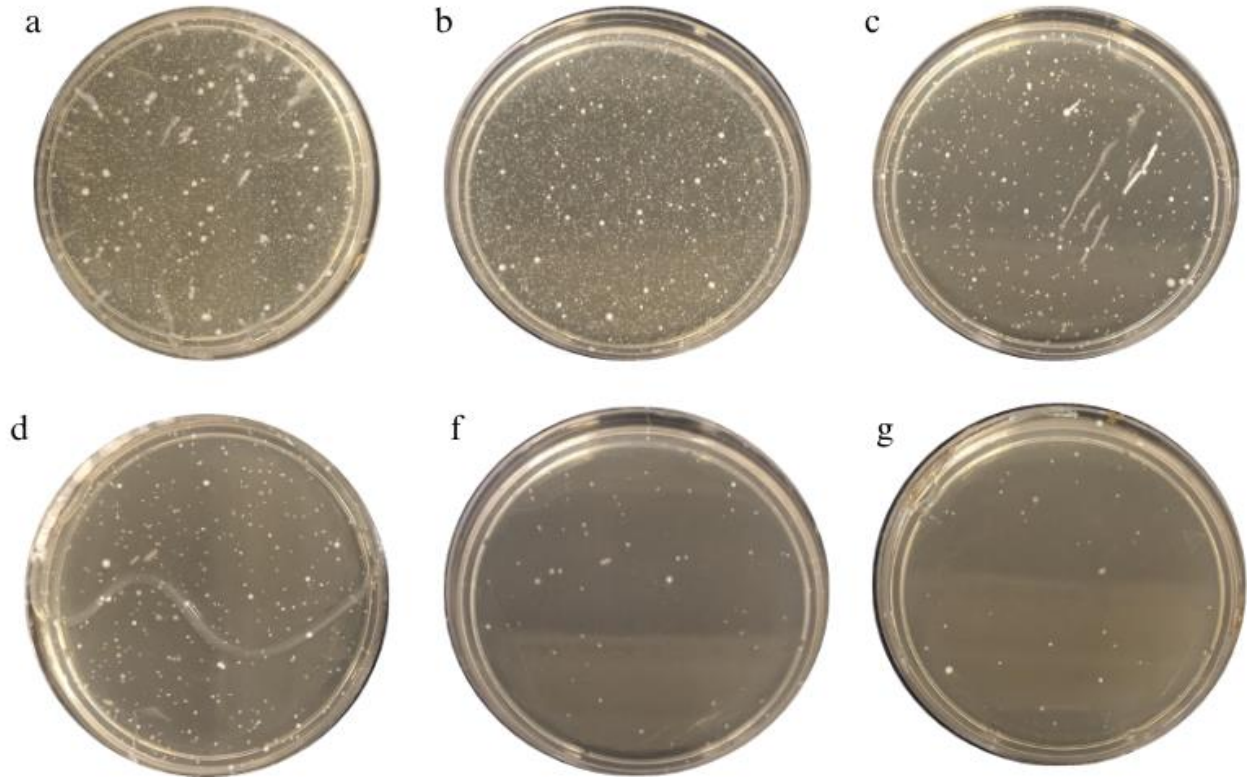


Figura 3.15. Dilución seriada en placa para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC): a) y b) dilución 10^{-1} (1:10); c) y d) dilución 10^{-2} (1:100); f) y g) dilución 10^{-3} (1:1 000).

El recuento de colonias se resume en la Tabla 3.7, la cual presenta el cálculo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) teniendo en cuenta el volumen sembrado y el factor de dilución aplicado. Para dicho cálculo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$N = \frac{C}{(V_s)(d)}$$

donde:

- N es el número de UFC/mL,
- C representa el número de colonias contadas en la placa de agar,
- V_s es el volumen sembrado (mL),
- y d corresponde al factor de dilución utilizado.

A partir de los recuentos obtenidos en las diluciones seleccionadas (10^{-2} y 10^{-3}), se calculó el promedio de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), utilizando la ecuación correspondiente. Con base en estos datos, se determinó que el tubo que contenía el compósito HT70-HA a una concentración de 2 mg/mL presentó una carga microbiana aproximada de 3×10^4 UFC/mL. Este valor representa una disminución de 3.523 unidades logarítmicas en comparación con la concentración inicial del preinóculo (1×10^8 UFC/mL), lo que corresponde a una reducción del 99.97 % en la población bacteriana.

La magnitud de esta reducción indica una actividad antimicrobiana significativa del compósito HT70-HA frente a la *S. mutans*, lo que sugiere que dicho material posee propiedades que afectan de manera efectiva la viabilidad bacteriana en las condiciones experimentales establecidas. Esta disminución en la carga microbiana y su impacto se ilustran visualmente en la Figura 3.16, donde se presenta la comparación entre la concentración inicial del inóculo y la concentración final de UFC/mL tras el tratamiento con el compósito.

Tabla 3.6. Conteo de colonias en agar de la dilución seriada hasta 10^{-5} .

Dilución	Conteo de colonias (UFC/mL)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
10^{-1}	Mayor a 300	Mayor a 300
10^{-2}	279	294
10^{-3}	46	32
10^{-4}	2	2
10^{-5}	0	0

Tabla 3.7. Recuento de colonias de la dilución seriada a 10^{-2} y 10^{-3} .

Recuento de colonias (UFC/mL)		
Dilución	Ensayo 1	Ensayo 2
10^{-2}	27900	29400
10^{-3}	46000	32000
	Media	33825

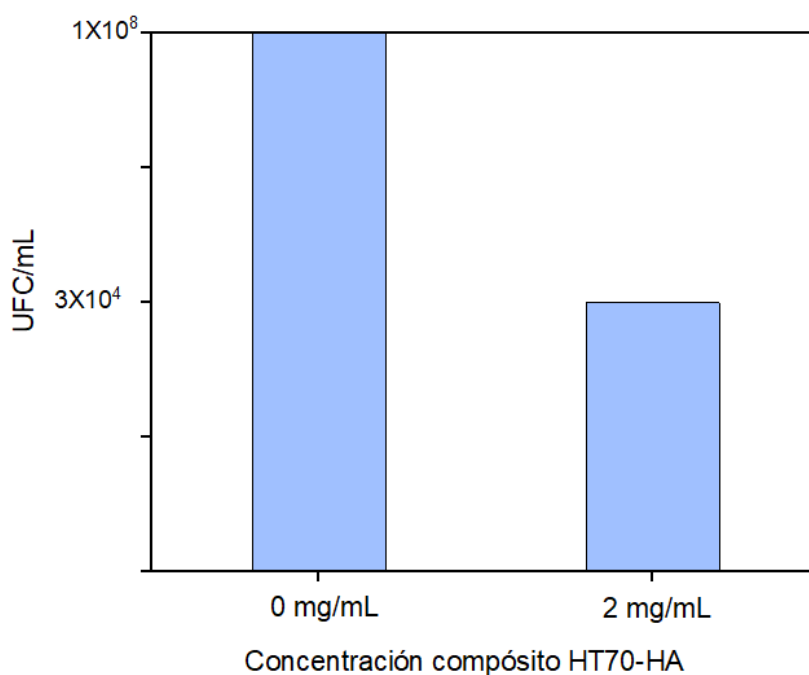


Figura 3.16. UFC/mL en función de la concentración del compósito HT70-HA

A partir de los ensayos realizados, se determinó que las hidroxiapatitas dopadas con iones metálicos (HA-Zn y HA-Cu) no presentaron actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, al igual que los compósitos HT30-HA y HT50-HA. Solo el compósito HT70-HA mostró actividad antimicrobiana significativa.

Este compósito (HT70-HA) generó halos de inhibición visibles a las 24 y 48 horas de incubación, lo que motivó su selección para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La CMI obtenida fue de 2 mg/mL a las 24 h y de 10 mg/mL a las 48 h, lo cual se confirmó mediante absorbancia y una disminución visual de turbidez. Además, mediante diluciones seriadas

se estimó que el número de UFC/mL se redujo de manera considerable respecto al preinóculo, lo que reafirma el efecto inhibitorio del material.

La eficacia del compósito HT70-HA se relaciona directamente con su mayor contenido de hidrotalcita, lo que implica una mayor disponibilidad de iones de cobre y radicales hidroxilos capaces de dañar estructuras bacterianas clave, como la membrana celular, proteínas y ADN. En conjunto, los resultados demuestran que una mayor proporción de HT en el compósito incrementa su actividad antimicrobiana, siendo HT70-HA el único con capacidad inhibitoria comprobada frente a *S. mutans* en las condiciones evaluadas.

Conclusiones

Se logró la síntesis exitosa de hidroxiapatita dopada con iones metálicos de cobre y zinc mediante el método asistido por ultrasonido. El análisis espectroscópico confirmó la presencia de los grupos funcionales característicos de la hidroxiapatita en todas las muestras obtenidas, identificándose de manera consistente las bandas correspondientes a los grupos fosfato, hidroxilo y, en menor medida, a los carbonatos.

Se sintetizaron satisfactoriamente hidrotalcitas dopadas con cobre (HT-Cu) y cobre-magnesio (HT-CuMg) mediante el mismo método, logrando además su incorporación en compósitos con hidroxiapatita en diferentes proporciones másicas (HT30-HA, HT50-HA Y HT70-HA). La caracterización estructural por difracción de rayos X permitió identificar la presencia de la fase hidrotalcita en las muestras HT-Cu, HT-CuMg y HT70-HA. Se observó que la adición de Mg^{2+} contribuyó a una mayor cristalinidad y orden estructural respecto a la hidrotalcita que contenía exclusivamente Cu^{2+} como catión divalente. Los valores obtenidos para la distancia basal y el parámetro de celda c , junto con la información espectroscópica infrarroja, evidenciaron la presencia de aniones carbonato y nitrato en el espacio interlaminar, siendo el anión carbonato el predominante en el compósito HT70-HA. El análisis textural, a través de isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno y distribución de tamaño de poro, reveló que tanto las hidrotalcitas como sus compósitos presentan una estructura mesoporosa, con variaciones en la conectividad y geometría de los poros, influenciadas por la proporción de hidroxiapatita incorporada.

En cuanto a la actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, las muestras de hidroxiapatita pura (HA), dopadas (HA-Zn y HA-Cu) y los compósitos HT30-HA y HT50-HA no presentaron efecto inhibitorio. En contraste, tanto las hidrotalcitas individuales como el compósito HT70-HA demostraron una actividad antimicrobiana significativa, lo cual evidencia que dicha propiedad está directamente relacionada con la proporción de hidrotalcita presente en el material. En particular, el compósito HT70-HA mostró capacidad inhibidora, con halos visibles de inhibición bacteriana y una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2 mg/mL. Además, se observó una disminución considerable en el número de unidades formadoras de colonia (UFC), lo que confirma su alta eficacia antimicrobiana. En conjunto, los resultados obtenidos indican que el aumento en la proporción de hidrotalcita no solo mejora las propiedades estructurales y texturales de los compósitos, sino que también incrementa de manera significativa su desempeño como agente antimicrobiano.

Referencias

Al-hijazi, A. Y., Hasan, N., Nasr, B. K., Jasim Al-Khafaji, H. H., Al-Khafaji, B., Abdah Alanssari, B. F., & Jalil, A. T. (2023). Recent advances in the use of inorganic nanomaterials as anti caries agents. In *Heliyon* (Vol. 9, Issue 4). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15326>

Bin Mobarak, M., Hossain, M. S., Chowdhury, F., & Ahmed, S. (2022). Synthesis and characterization of CuO nanoparticles utilizing waste fish scale and exploitation of XRD peak profile analysis for approximating the structural parameters. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(10). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104117>

Burdusel, A.-C., Neacsu, I. A., Birca, A. C., Chircov, C., Grumezescu, A.-M., Holban, A. M., Curutiu, C., Ditu, L. M., Stan, M., & Andronescu, E. (2023). Microwave-Assisted Hydrothermal Treatment of Multifunctional Substituted Hydroxyapatite with Prospective Applications in Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(7), 378.

<https://doi.org/10.3390/jfb14070378>

Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., ... & Sakanari, J. A. (2016). *Microbiología médica*. McGraw-Hill Interamericana.

Castañeda, A. A. H., & Moya, G. C. A. (2012). Características y propiedades fisicoquímicas de la saliva: una revisión. *UstaSalud*, 11(2), 102-112.

Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 121–137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00083.x>

Cruz-Hernández, M., Velázquez-Herrera, F. D., & Fetter, G. (2023). Synthetic hydroxyapatites as high-performance fertilizers for lettuce plant growth. *Rhizosphere*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100718>

Daniel, S., & Thomas, S. (2020). *Layered double hydroxides: fundamentals to applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101903-0.00001-X>

Etinosa, P. O., Osuchukwu, O. A., Anisiji, E. O., Lawal, M. Y., Mohammed, S. A., Ibitoye, O. I., Oni, P. G., Aderibigbe, V. D., Aina, T., Oyebo, D., & Nwigbo, S. C. (2024). In-depth review of synthesis of hydroxyapatite biomaterials from natural resources and chemical reagents for biomedical applications. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 17, Issue 12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.106010>

Fetter, G., & Velázquez-Herrera, F. D (2022) Arcillas: Desvelando sus secretos. https://repositorio.buap.mx/rdgp/public/inf_public/2022/4/Arcillas_Desvelando_sus_secretos.pdf

Fetter, G., Olguín, M. T., Olguín, O., Bosch, P., & Bulbulian, S. (2000). Surface Areas of Nitrated Hydrotalcites. In *Journal of Porous Materials* (Vol. 7).

Firdaus Hussin, M. S., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Abdul Wahap, M. A. (2022). Extraction of natural hydroxyapatite for biomedical applications—A review. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10356>

Ghosh, R., Swart, O., Westgate, S., Miller, B. L., & Yates, M. Z. (2019). Antibacterial Copper-Hydroxyapatite Composite Coatings via Electrochemical Synthesis. *Langmuir*, 35(17), 5957–5966. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00919>

He, X.-S., & Shi, W.-Y. (2009). Oral Microbiology: Past, Present and Future. In *International Journal of Oral Science* (Vol. 1, Issue 2).

Jaafar, A., Hecker, C., Árki, P., & Joseph, Y. (2020). Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review. In *Bioengineering* (Vol. 7, Issue 4, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040127>

Kloprogge, J. T., Hickey, L., & Frost, R. L. (2004). FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(11), 967–974. <https://doi.org/10.1002/jrs.1244>

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>

León-Vallejo, A. M., Velázquez-Herrera, F. D., Sampieri, Á., Landeta-Cortés, G., & Fetter, G. (2019). Study of layered double hydroxides as bactericidal materials against *Corynebacterium ammoniagenes*, a bacterium responsible for producing bad odors from human urine and skin infections. *Applied Clay Science*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105194>

Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J. A., & Fetter, G. (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Applied Clay Science*, 153, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.017>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock. Biología de los microorganismos 12 ed. Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp, 1064.

Menon, T. (2016). Understanding the viridians group streptococci: Are we there yet? In *Indian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 34, Issue 4, pp. 421–426). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.195371>

Multifunctional Substituted Hydroxyapatite with Prospective Applications in Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(7), 378.

Nizami, M. Z. I., Xu, V. W., Yin, I. X., Yu, O. Y., & Chu, C. H. (2021). Metal and metal oxide nanoparticles in caries prevention: A review. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano11123446>

Rivera, Johel & Fetter, Geolar & Bosch, P. (2010). Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria* (Rio de Janeiro). 15. 10.1590/S1517-70762010000400003.

Rocha Oliveira, G., Dias Do Amaral, L. J., Giovanela, M., da Silva Crespo, J., Fetter, G., Rivera, J. A., Sampieri, A., & Bosch, P. (2015). Bactericidal Performance of Chlorophyllin-Copper Hydroxalate Compounds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(9), 226–316. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2585-1>

Salman, S. A., Kuroda, K., & Okido, M. (2013). Preparation and characterization of hydroxyapatite coating on AZ31 Mg alloy for implant applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/175756>

Sani, T., Adem, M., Fetter, G., Bosch, P., & Diaz, I. (2016). Defluoridation Performance Comparison of Nano-hydroxalate/Hydroxyapatite Composite with Calcined Hydroxalate and Hydroxyapatite. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2786-2>

Segura-Pérez, V., Lobo-Sánchez, M., Velázquez-Herrera, F. D., Frías-Vázquez, D. A., Reyes-Cervantes, E., & Fetter, G. (2020). Hydroxalate/hydroxyapatite composites with high

bacterial activity against clinical bacteria. A new alternative to prevent osteomyelitis diseases. *Microporous and Mesoporous Materials*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110069>

Shenep, J. L. (2000). Viridans-group streptococcal infections in immunocompromised hosts. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 14). www.ischemo.org

Shih, W.J., Wang, M.C., Hon, M.H., 2005. *J. Cryst. Growth* 275 (1–2), e2339–e2344.
Shirkhanzadeh, M., 1998. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 9, 67–72. Shobana, K., Swamiappan, S., 2023. *Inorg. Chem. Commun.* 148, 110347

Tanasoi, S., Tanchoux, N., Urdă, A., Tichit, D., Săndulescu, I., Fajula, F., & Marcu, I. C. (2009). New Cu-based mixed oxides obtained from LDH precursors, catalysts for methane total oxidation. *Applied Catalysis A: General*, 363(1–2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2009.05.007>

Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. v., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., & Sing, K. S. W. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 87(9–10), 1051–1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>

Velázquez-Herrera, F. D., Fetter, G., Rosato, V., Pereyra, A. M., & Basaldella, E. I. (2018). Effect of structure, morphology and chemical composition of Zn-Al, Mg/Zn-Al and Cu/Zn-Al hydrotalcites on their antifungal activity against *A. niger*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3376–3383. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.069>

Velázquez-Herrera, F. D., Lobo-Sánchez, M., & Fetter, G. (2021). Effect of copper and eucalyptol on the bactericidal activity of ZnAl- and MgAl-LDH clays. In *MRS Communications* (Vol. 11, Issue 6, pp. 955–961). Springer Nature. <https://doi.org/10.1557/s43579-021-00137-6>

Velázquez-Herrera, F. D., Zarazua-Aguilar, Y., Garzón-Pérez, A. S., Álvarez-Gómez, K. M., & Fetter, G. (2024). Composites formed by layered double hydroxides with inorganic compounds: An overview of the synthesis methods and characteristics. In *MethodsX* (Vol. 13). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102912>