



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CALCIO PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL POR LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN”

TESIS

Para obtener el grado de
INGENIERO EN MATERIALES

Presenta:

CARLOS PAÚL PÉREZ MORALES

Asesor de tesis:

DR. EFRAÍN RUBIO ROSAS

Coasesora de tesis:

MTRA. ERIKA MUÑOZ GRACIA

ENERO 2025





AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, agradezco mucho a la vida y a dios por permitirme estar aquí, con salud y las ganas de querer superarme y no dejarme rendir por ninguna circunstancia.

También y no menos importante la oportunidad de poder tener siempre el apoyo y confianza de mis padres que han sido el pilar para seguir avanzando con fuerza y por todo lo que han hecho por mí, lo cual no tengo palabras para describir lo realmente agradecido que estoy con ellos. Lo único que les pido es que pase lo que pase siempre estén conmigo, sean felices, sonrían mucho y a pesar de las diferentes circunstancias.

A mis hermanos con los cuales he compartido muchísimos momentos de diversión, aventuras y sobre todo el cariño. Mi hermano Kenny que ha sido alguien con quien he compartido muchos momentos de diversión, aquellos días jugando fútbol en mi casa, después entrenar taekwondo juntos y que sin importar el paso de los años, siempre me ha motivado para ser alguien mejor y seguir aprendiendo cada día algo nuevo, para mi él es una total inspiración y lo admiro mucho, así que gracias por los muchos momentos que hemos vivido y estar ahí para mí.

Dr. Efraín Rubio rosas, quien ha sido fundamental para el apoyo de poder desarrollar este proyecto de principio a fin, al igual que brindarme su confianza y los consejos. Por estar al pendiente de todo y alentándome para salir y crecer. Le tengo un enorme aprecio, que la vida siga brindándole salud y bendiciones.

A la Dra. Erika Muñoz Gracia por estar al pendiente de todos mis avances, sus consejos y guiándome para hacer este proyecto de la mejor manera, buscando siempre la manera de apoyarme con las caracterizaciones, gracias por el apoyo, por resolver mis dudas y por todo el tiempo dedicado a revisar mis avances.

Mis sinodales, la Dra. Eva Almanza Águila y el Dr. José Andrés Reyes Avendaño, por su tiempo dedicado a las revisiones de protocolo, observaciones,

disposición y contribuir de alguna forma en este proyecto. Y mencionar que aprendí mucho en sus clases, excelentes docentes sin duda.

A mis amigos y amigas, con los que he compartido momentos de diversión, risas y aprendizajes, sé que algunos ya están formando sus propios caminos y les está yendo bien, de todo corazón les deseo lo mejor, gracias por todas esas anécdotas, siempre voy a agradecer esas ayudas que me brindaron, las veces que me apoyaron como podían y sobre todo, por estar ahí para mí en momentos donde más lo necesitaba.

Agradezco mucho la oportunidad que tuve de irme de campamento y poder conocer a excelentes personas de diferentes países, sobre todo Colombia, Polonia, mismo de México, no tengo palabras para expresar todo lo vivido con cada uno de ustedes, nos apoyamos unos a otros, momentos de diversión, risas y cada día mostrando nuestra mejor actitud a pesar de los días difíciles. Gracias por apoyarme en momentos difíciles, de todo corazón lo agradezco. Espero haber sido alguien que por lo menos les llevo a sacar alguna sonrisa, estoy seguro de que cada uno cumplirá ese sueño que algún momento platicamos.

A todas aquellas personas con las que en algún momento de mi vida compartí momentos buenos, malos y de mucho aprendizaje, también me ayudaron mucho a conocerme y aprender de mis propios errores y de aquellas experiencias que me han servido para crecer personalmente quizá por razones que solo nosotros sabemos ya no es posible seguir en tanta comunicación, pero les agradezco por los momentos vividos juntos, les deseo lo mejor.

A mis mascotas que molestan mucho, pero siempre con mucha energía para jugar todo el día, perdonen si no siempre puedo jugar o estar con ustedes, pero los amo mucho. Iker... siempre te llevare presente, gracias por todo.



ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	X
OBJETIVO GENERAL	XI
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Nanomateriales. _____	1
1.2 Actividad antibacterial de nanomateriales. _____	3
1.2.1 Nanopartículas de plata.....	3
1.2.2 Nanopartículas de oro.	5
1.2.3 Nanopartículas de óxido de zinc.....	6
1.2.4 Aplicación de las nanopartículas en diferentes áreas industriales.	7
1.2.4.1 Nanopartículas en aplicaciones médicas.....	7
1.2.4.2 Aplicaciones de las nanopartículas en la agroindustria.	7
1.3 Nanopartículas de óxido de calcio. _____	8
1.3.1 Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de calcio.	9
1.3.1.1 Reducción química.	9
1.3.1.2 Irradiación con microondas.	9
1.3.1.3 Método Sol – Gel.	10
1.3.1.4 Síntesis verde.	11
1.3.2 Aplicaciones de nanopartículas de óxido de calcio	11
1.4. Microdilución en caldo para la determinación inhibitoria de nanopartículas para la determinación inhibitoria de microorganismos. _____	12
CAPITULO II. METODOLOGÍA	17
2.1 Materiales. _____	17



2.2 Bacterias. _____	17
2.3 Síntesis de óxido de calcio _____	17
2.4 Evaluación antibacterial. _____	18
2.5 Técnicas de Caracterización. _____	22
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1 Síntesis de las nanopartículas de óxido de calcio. _____	23
3.2 Caracterización por difracción de rayos X (DRX) _____	25
3.3 Caracterización por espectroscopía de energía dispersiva (EDS). _____	28
3.4 Caracterización por microscopía de fuerza atómica (AFM) _____	30
3.5 Caracterización por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier. _____	32
3.6 Efecto antibacterial de las nanopartículas de CaO en <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . _____	34
3.7 Eficacia antibacterial de las nanopartículas de óxido de calcio vs otros agentes bacterianos. _____	41
CAPITULO IV. CONCLUSIÓN	46
BIBLIOGRAFIA	48



ÍNDICE FIGURAS

Capítulo I. Marco teórico	1
Figura I - 1 Las principales áreas de estudio de la nanotecnología y sus aplicaciones.....	2
Figura I - 2 Nanopartículas de Plata.....	4
Figura I - 3 Efecto antibacterial de nanopartículas de plata en membranas celulares.....	5
Figura I - 4 Nanopartículas de óxido de zinc	7
Capítulo II. Metodología	16
Figura II - 1 PDA (Potato Dextrose Agar) es el un medio de cultivo que se utiliza para cultivar hongos y levaduras, y para identificarlos.....	19
Figura II - 2 Muestras de las bacterias antes de ser depositadas en las placas.....	20
Capítulo III. Resultados y discusión	23
Figura III - 1 Método de síntesis utilizado para la obtención de las nanopartículas.....	23
Figura III - 2 Obtención de nanopartículas de CaO a) antes de calcinarlas y b) después de introducir las a la mufla.....	24
Figura III - 3 Espectros XRD de nanopartículas de CaO sintetizadas a 800, 700 y 650 °C respectivamente, por un tiempo de 1.5 horas a una tasa de calentamiento de 5°C por minuto	25
Figura III - 4 a) Micrografía de nanopartículas de CaO a una escala de 700 nm y b) su respectivo espectro	29
Figura III - 5 Topografía de nanopartículas de CaO obtenida mediante microscopía de fuerza atómica, donde a) se muestra la medida del área escaneada y b) se muestran 5	30
Figura III - 6 Espectro FTIR de las nanopartículas obtenidas	29
Figura III - 7 Rango de lectura utilizado para la espectroscopia Uv/Vis	30
Figura III - 8 Resazurina utilizada para las pruebas de indicación bacteriológica de las nanopartículas y sus propiedades de inhibición	34
Figura III - 9 Placas de TSA con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	35



Figura III-10 Imagen visual de a) el control de viabilidad donde las bacterias están vivas y b) el control de inhibición de estas.....35

Figura III - 11 Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de óxido de calcio frente a las bacterias *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC BAA977(+). 37

Figura III - 12 Medio de cultivo Luria Bertani (LB), utilizado para cultivar y mantener cepas principalmente de *Escherichia coli* 38

Figura III - 13 Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para las cepas *Escherichia coli* ATCC 8739EA y *Escherichia coli* ATCC 25922 40



ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla I – 1 Comparativa de la microdilución en caldo vs otras técnicas biológicas para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos.....	16
Tabla II – 1 Cálculo de concentraciones para conocer la cantidad de nanopartículas a utilizar en cada pozo para la cinética microbiana.....	21
Tabla III – 1 Medidas de las nanopartículas visualizadas en AFM.....	31
Tabla III – 2 Longitud de las nanopartículas marcadas en la figura III – 5 b).....	31
Tabla III - 3 Longitud de las nanopartículas apreciables en la figura III – 5	32



RESUMEN

En este trabajo, se sintetizaron nanopartículas de CaO mediante el método de precipitación y se evaluaron sus propiedades antibacterianas. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron usando las técnicas. DRX que mostró los picos de difracción $2\theta = 32.1^\circ, 37.5^\circ, 54.2^\circ, 64.7^\circ, \text{ y } 67.5^\circ$, correspondientes a la fase CaO, con estructura cubica simple y con una pureza de 97.5%. El análisis EDS determinó valores de porcentaje en peso: carbono 10.32%, calcio 52.84% y oxígeno 36.83%. El análisis por AFM reveló un tamaño de partícula promedio de 68-78 nm. En el análisis FTIR se identificó la banda característica en 505 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión del enlace Ca-O. Se utilizó la técnica de microdilución en caldo para evaluar la efectividad de las nanopartículas contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se variaron las concentraciones de CaO en cada pozo de la placa de Elisa para determinar la concentración mínima inhibitoria. Las nanopartículas de CaO mostraron variaciones en la MIC en diferentes cepas: *S. aureus* ATCC 25923 y ATCC BAA977+ fueron de 6.00 y 5.33 mg/ml respectivamente, y para *E. coli* ATCC 8739EA y ATCC 25922 fueron de 4.00 y 2.66 mg/ml respectivamente, indicando un 100% de mortalidad bacteriana. Las nanopartículas de CaO presentan buenas propiedades antibacteriales, lo que sugiere su potencial en el desarrollo de nuevos materiales antibacterianos, destacando su eficacia y sostenibilidad como una alternativa prometedora a los métodos convencionales de control bacteriano.



INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas han revolucionado diversas industrias, incluyendo la tecnología, agricultura, alimentos y salud. Entre ellas las nanopartículas de óxido de calcio (CaO) que son alcalinas y regulan varios procesos industriales. Sus propiedades estructurales y ópticas únicas dependen de su composición química y tratamiento térmico, los cuales son factores que determinan su efectividad. Y estas nanopartículas tienen aplicación en áreas como la electrónica, óptica, tratamientos de agua y como agente antibacterial (Angela M, 2016).

Este último punto es importante, porque esta característica justifica su investigación y síntesis adecuada, gracias a la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Ya que las bacterias presentes en alimentos contaminados, aguas y el cuerpo humano, como *E. coli* y *S. aureus* pueden causar enfermedades estomacales e infecciones (Poole, C. P., 2022).

A partir de los diversos métodos de síntesis, está la técnica de precipitación que es muy funcional debido a su capacidad para controlar el tamaño de las nanopartículas el cual es crucial, ya que las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas, como su reactividad y estabilidad, dependen en gran medida de su tamaño.

Y para caracterizar la morfología y microestructura de las nanopartículas se utilizan diversas técnicas como: difracción de Rayos X (DRX), espectroscopía de energía dispersiva (EDS), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y ultravioleta-visible (UV/VIS). Estas técnicas permiten una evaluación detallada de la capacidad antibacteriana y su potencial aplicación en diversos campos (Oporto Velasco, L. A. 2016).

Para la evaluación de su efectividad frente a las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, se emplea la microdilución en caldo, donde se cultivan las bacterias en presencia de diferentes concentraciones de las nanopartículas de CaO y se mide la reducción e inhibición del crecimiento bacteriano.

Entonces es esencial buscar nuevas alternativas para combatir las bacterias de manera eficaz y sostenible (Canata, M. et al., 2016).



OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de calcio y evaluar su efecto antibacterial en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por la técnica de microdilución.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar nanopartículas de óxido de calcio por el método de precipitación.
- Evaluar la actividad antibacterial de nanopartículas de óxido de calcio contra *S. aureus* y *E. coli* por la técnica microdilución y determinar la concentración mínima inhibitoria.
- Realizar un análisis comparativo de la eficacia antibacterial de las nanopartículas de óxido de calcio con agentes antibacterianos convencionales.
- Caracterizar morfología y microestructura de las nanopartículas por las técnicas; Difracción de Rayos X (DRX), espectroscopía de energía dispersiva (EDS), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y ultravioleta-visible (UV/VIS).



CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Nanomateriales.

Desde hace millones de años, los humanos han utilizado diversos materiales. En inicios de la civilización, emplearon huesos, barro y madera para cazar. Con el tiempo, surgieron y desarrollaron nuevas aplicaciones para los materiales. La edad de piedra, la edad de los metales (cobre y bronce), y la edad del hierro representaron miles de años de exploración y tratamiento de los materiales. Sin embargo, el mayor avance tecnológico trascendental se dio en la era del silicio. A partir de los años 80, el estudio nanométrico se expandió con el desarrollo de instrumental especializado para caracterizar la materia, lo que condujo a la aceptación de la mecánica cuántica, fundamental en la nanociencia (Álvarez L, 2020).

La nanotecnología se ocupa de las diversas formas y estructuras de los materiales a nivel nano (*1 a 100 nm*). Estos materiales pueden ser nanoestructurados, lo que implica que se pueden obtener nuevas aplicaciones o aplicaciones innovadoras con materiales ya existentes, sin embargo, también es posible que las nanopartículas sean mayores de 100 nm y aun así presenten propiedades útiles manteniendo sus propiedades dependiendo de la aplicación específica y las propiedades deseadas. (Wang, Zhao., 2021).

En la figura I – 1 se presentan diversas ilustraciones que muestran áreas en las que las nanopartículas tienen una gran relevancia en la actualidad, como la medicina, la electrónica y la energía. Estas aplicaciones incluyen el uso de nanopartículas en tratamientos médicos avanzados, dispositivos electrónicos más eficientes y fuentes de energía renovable. Esto subraya la importancia de su estudio adecuado para seguir innovando y mejorando estas tecnologías.

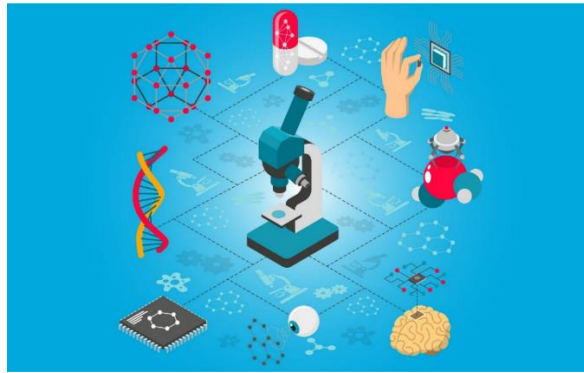


Figura I – 1 Las principales áreas de estudio de la nanotecnología y sus aplicaciones.
Applications of Nanotechnology In Different Sectors - Leverage Edu. 2022.

El diseño a nanoescala de la estructura y la química de los materiales de los electrodos, puede abrir la puerta al desarrollo de una nueva generación de dispositivos que se aproximen al límite teórico del almacenamiento electroquímico. Estos dispositivos podrían suministrar energía eléctrica de manera rápida y eficiente, como en el caso de los supercondensadores (Gogotsi, Y. 2014).

Existe un concepto el cual es, “funcionalización de partículas” el cual se define como la adición química de grupos funcionales solamente en su superficie, donde el fin es una modificación superficial, permitiendo una autoorganización y haciéndolas compatibles. El objetivo es cubrir la superficie de la molécula que posea la funcionalidad adecuada y necesaria para la aplicación diseñada. Para las amplias aplicaciones que se encuentran en las nanopartículas, estas deben funcionalizar para adherirse con entidades biológicas (Subbiah et al., 2010).

Aunque recientemente, existen nanopartículas multifuncionales donde han recibido una gran atención, debido a sus ventajas para aplicaciones. Las nanopartículas multifuncionales tienen propiedades fisicoquímicas individuales y pueden complementar ciertas limitaciones que existen en aplicaciones convencionales que utilizan las nanopartículas individuales (Malik, S., 2023).

Aplicaciones de la nanotecnología han permitido el desarrollo de biosensores altamente sensibles donde pueden detectar niveles bajos de fluidos corporales como en la sangre, facilitando una detección temprana de enfermedades como el cáncer de mama (Wang, Y., 2021).



Se ve reflejado en el gran impacto que se encuentra en el área médica al poder obtener una mejora del contraste de imágenes biomédicas para la detección temprana y diagnóstico de enfermedades al mejorar las tecnologías clínicamente relevantes existentes como las imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada (CT) y la tomografía por emisión de positrones (PET), haciéndolos más sensibles, precisos y específicos (Singh, A. 2022).

1.2 Actividad antibacterial de nanomateriales.

Las bacterias son microorganismos que siempre están presentes en nuestra vida cotidiana. La mayoría no representan un peligro; al contrario, son beneficiosas para las personas y el ecosistema. Las bacterias son esenciales para la preservación de la vida. En los humanos, pueden protegernos de enfermedades al competir con organismos infecciosos que intentan invadir el cuerpo, ayudar a sanar heridas, digerir alimentos, aportar vitaminas y fermentar alimentos saludables. Sin embargo, existe un grupo de bacterias consideradas patógenas (capaces de causar enfermedades). De manera similar, algunos virus y hongos pueden causar daños en humanos, plantas y animales. Por tanto, la nanotecnología busca soluciones para combatir eficientemente los microorganismos patógenos, ya que las bacterias son cada vez más resistentes a los antibióticos.

Algunas variantes genéticas de la bacteria *E. coli* pueden causar enfermedades estomacales, insuficiencia renal e incluso la muerte. Asimismo, las infecciones por *S. aureus* pueden dañar la piel, huesos y causar neumonía, entre otros problemas.

Las nanopartículas metálicas han demostrado ser una alternativa altamente eficiente para controlar estos microorganismos, ya que pueden penetrar las paredes celulares de las bacterias y causar su muerte (Santos et al., 2005).

1.2.1 Nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son altamente valoradas por sus propiedades antimicrobianas. Estas nanopartículas son capaces de combatir una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus. La acción antimicrobiana de las AgNPs se debe principalmente a la liberación de iones de plata, que son tóxicos para los microorganismos.

Estos iones pueden interactuar con las membranas celulares de los patógenos, causando daños estructurales y funcionales que llevan a la muerte celular. Además, los iones de plata pueden penetrar en las células microbianas y alterar procesos vitales como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas.

Como ejemplo, en la figura 1 – 2 se puede observar la estructura de nanopartículas de plata obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Estas nanopartículas presentan una morfología uniforme y un tamaño controlado, lo que las hace ideales para aplicaciones en campos como la biomedicina, la electrónica y la catálisis. El análisis detallado de su estructura permite optimizar sus propiedades y mejorar su rendimiento en diversas aplicaciones tecnológicas (Xu et al., 2020).

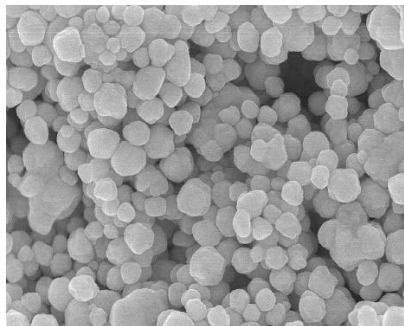


Figura 1 – 2 Nanopartículas de plata, imagen obtenida mediante la técnica SEM.

Silver nanoparticles: Synthesis, medical 2020.

Un estudio reportó que las AgNPs mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, utilizando 15 mL de medio previamente inoculado con una suspensión bacteriana de 10^5 unidades formadoras de colonias (CFU), con perforaciones de 10 mm de diámetro y 100 μ L de la solución de nanopartículas (Del Rocío Coutiño et al., 2017).

En la figura 1 – 3 podemos observar la representación esquemática del efecto antibacterial de las nanopartículas de plata en las membranas, mitocondrias, organelos celulares, el ADN nuclear, así como en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Hurtado et al., 2022).

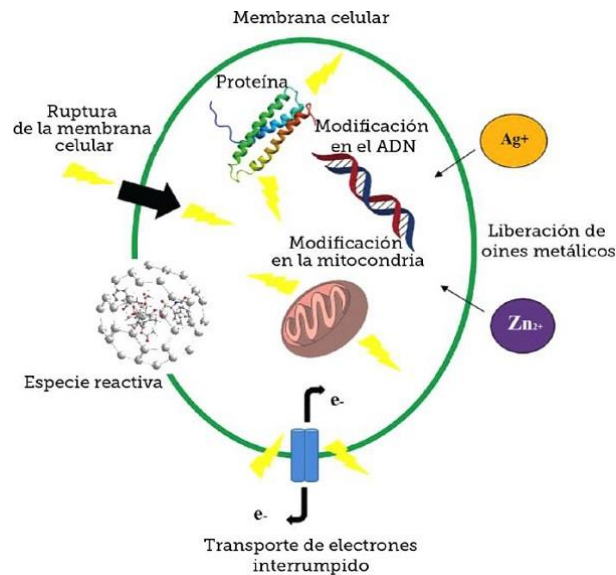


Figura 1 – 3 Efecto antibacterial de nanopartículas de plata en membranas celulares.
"Potencial de la nanotecnología en la agricultura," por R. Lira Saldívar et al., 2018.

En el área del almacenamiento de energía, se ha vuelto crucial para el desarrollo más eficiente en diversas escalas, desde parques solares y eólicos hasta dispositivos electrónicos portátiles que requieren una alta densidad de energía y un ciclo de vida prolongado. Esto impulsa la búsqueda de nuevas soluciones para el almacenamiento de energía eléctrica.

1.2.2 Nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro son conocidas por su facilidad de síntesis, procedimientos de funcionalización sencillos usando moléculas terapéuticas, y su buena biocompatibilidad. Por ello, las nanopartículas de Au se utilizan en estudios inmunoquímicos para la identificación de interacciones de proteínas y como trazador de laboratorio en huellas dactilares para detectar la presencia de ADN en una muestra.

Están teniendo un papel importante para la detección de antibióticos aminoglucósidos como estreptomina, gentamicina y neomicina. Las nanopartículas de oro se utilizan para detectar células madre cancerígenas, siendo así beneficioso para su diagnóstico, así como para la identificación de diferentes clases de bacterias (Hasan, 2015). También se incorporan en recubrimientos para superficies médicas y dispositivos, como catéteres y prótesis, para prevenir infecciones bacterianas¹. Estos recubrimientos pueden inhibir el crecimiento de

bacterias y hongos, reduciendo el riesgo de infecciones nosocomiales. (Hasan, 2015). Seguramente, su característica más atractiva sea la posibilidad de convertirlas en un método de transporte para la penetración de la barrera hematoencefálica (BHE), cuya relevancia se extiende más allá del transporte de fármacos para incluir otras aplicaciones medicinales, como la imagen, la radioterapia de tumores y la terapia fototermal (Sela et al., 2015, & Chan, J. M. 2015).

1.2.3 Nanopartículas de óxido de zinc.

Las nanopartículas de Óxido de Zinc son ampliamente empleadas en aplicaciones odontológicas debido a su versatilidad. Sus propiedades ópticas, magnéticas, morfológicas, eléctricas, catalíticas, mecánicas y fotoquímicas pueden ser modificadas mediante ajustes en su tamaño, dopaje con compuestos complementarios o ajustes en el proceso de síntesis. A medida que el tamaño de las partículas disminuye, sus características deseables se ven mejoradas (Baek et al., 2012).

Las ZnO-NPs pueden generar ROS, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($OH\cdot$), que dañan componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ADN, estas nanopartículas pueden liberar iones de zinc, que interactúan con las biomoléculas dentro de las células bacterianas, interrumpiendo sus funciones vitales ya que pueden adherirse a la superficie de las bacterias, causando daño directo a la membrana celular y alterando su integridad.

Estos mecanismos combinados resultan en la inhibición del crecimiento bacteriano y la muerte de las células microbianas. Por ejemplo, se ha demostrado que las ZnO-NPs son efectivas contra bacterias como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. (Espejo, 2019)

El uso de estos agentes ofrece ventajas significativas, ya que su potencial antimicrobiano resulta altamente eficaz incluso contra cepas resistentes de patógenos microbianos. En la figura I – 4 como ejemplo, se observa la morfología de estas nanopartículas.

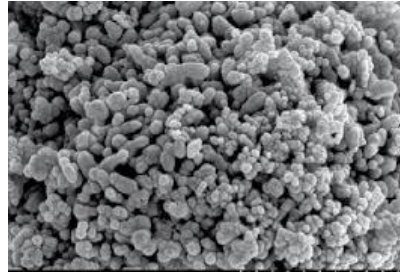


Figura I – 4 Nanopartículas de óxido de zinc, imagen obtenida mediante la técnica SEM.
B., Moreno-Arribas, M.V. 2016.

1.2.4 Aplicación de las nanopartículas en diferentes áreas industriales.

Las nanopartículas se utilizan como una alternativa para enfrentar los desafíos actuales y desarrollar productos que satisfagan las necesidades humanas, al mismo tiempo que protegen el medio ambiente. Por ejemplo, es necesario que las industrias produzcan cada vez más energías limpias. También se requieren estrategias para evitar el desperdicio de alimentos a nivel mundial, mejorar la calidad de las telas, cosméticos, refacciones de automóviles y la calidad del agua, entre otros (Hurtado et al., 2022).

1.2.4.1 Nanopartículas en aplicaciones médicas.

La nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología en el ámbito médico con el objetivo de detectar, prevenir, curar o tratar diversas enfermedades. Gracias a su tamaño, las nanopartículas pueden penetrar los tejidos y viajar por el torrente sanguíneo, llevando fármacos a lugares específicos para tratamientos tumorales. El uso de nanopartículas en medicina podría reducir la mortalidad y aumentar la esperanza de vida en pacientes con enfermedades terminales (Carbajal-De-La-Fuente & Yadón, 2013).

1.2.4.2 Aplicaciones de las nanopartículas en la agroindustria.

Las nanopartículas desempeñan un papel crucial en la producción, industrialización y comercialización de productos agroalimentarios. Las nanopartículas de óxido de cobre y magnetita (Fe_3O_4) se utilizan como fertilizantes para mejorar los cultivos y como una estrategia sostenible frente al crecimiento de la población mundial, la escasez de fuentes de energía y la reducción de la tierra cultivable. Estas nanopartículas facilitan una mejor absorción de nutrientes por parte de las plantas, lo que se traduce en una mayor producción y calidad de las



cosechas. Además, las nanopartículas de óxidos metálicos se emplean en envases alimentarios seguros, activos e inteligentes, con el objetivo de preservar la calidad de los alimentos, aumentar la eficacia antimicrobiana y evitar su deterioro (A. Bahrami, et al., 2019; Nikolic et al., 2021).

Los envases activos e inteligentes, que contienen nanopartículas con actividad antimicrobiana intrínseca, pueden eliminar oxígeno y etileno, bloquear los rayos UV y extender la vida útil del producto. Estas partículas añadidas al material de envasado interactúan directamente con los alimentos, protegiéndolos de bacterias dañinas, hongos y virus, y manteniéndolos frescos durante más tiempo. Según la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), casi 1,300 millones de toneladas de alimentos se desperdician cada año en todo el mundo, desde la producción hasta los hogares de los consumidores. Por tanto, la nanotecnología aplicada en la industria busca minimizar este desperdicio y los daños asociados, como las emisiones de gases de efecto invernadero, la contaminación y el tratamiento de residuos (Haydar et al., 2021; Wang et al., 2019).

1.3 Nanopartículas de óxido de calcio.

El óxido de calcio (CaO), conocido comúnmente como cal viva, tiene una estructura cristalina cúbica, donde cada ion de calcio (Ca^{2+}) está rodeado por seis iones de oxígeno (O^{2-}), formando un arreglo octaédrico. Este compuesto es iónico, lo que significa que no presenta hibridación de orbitales como en los enlaces covalentes. Su composición química en peso es de 71.48% de calcio y 28.51% de oxígeno, con un punto de fusión de 2572°C y un punto de ebullición de 2850°C (Escalante, W. 2021; Juana Robles, 2011).

En cuanto a sus propiedades físicas, el óxido de calcio es un sólido blanco cristalino e inodoro. Tiene una densidad de 3.34 g/cm^3 y un peso molecular de 55.958 g/mol . Además, es termoluminiscente, lo que significa que puede emitir una intensa luz blanca cuando se calienta a altas temperaturas, una propiedad conocida como "luz de calcio".

El óxido de calcio es un material duro y quebradizo, con una alta afinidad por el agua. Reacciona vigorosamente con el agua para formar hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en una reacción exotérmica que libera calor (Connor, 2023).



1.3.1 Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de calcio.

La síntesis de nanopartículas es crucial debido a su impacto en diversas áreas. Permite controlar el tamaño, la forma y la composición de las partículas, influyendo en sus propiedades físicas, químicas y ópticas. Además, adaptar las nanopartículas a aplicaciones específicas es esencial, como en catálisis, electrónica o sensado químico y biológico. La síntesis química es escalable y más rápida, facilitando la fabricación a gran escala y a bajo costo (Salcedo et al., 2018).

1.3.1.1 Reducción química.

Se agrega un agente reductor a la solución. Este agente reduce los iones metálicos, formando núcleos de nanopartículas.

La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radiólisis química difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica se caracteriza por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica presentan ventajas sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se utilizan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza. Además, la reducción fotoquímica y radioquímica permiten la producción de nanopartículas en condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas

Además, que se utilizan agentes estabilizadores como surfactantes o polímeros para evitar la aglomeración de las nanopartículas (Naik, T. et al., 2023).

1.3.1.2 Irradiación con microondas.

La técnica de irradiación con microondas produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logre un control preciso en la morfología, como pasa en la mayoría de las técnicas de “abajo hacia arriba”. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Los solventes polares se calientan y sus componentes moleculares se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones.

Las muestras conductoras y semiconductoras se calientan cuando los iones y los electrones contenidos en ellas forman una corriente eléctrica y la energía se



pierde debido a la resistencia eléctrica del material. En los últimos años, el proceso de calentamiento asistido por microondas se ha utilizado como una alternativa atractiva para la síntesis de materiales a escala nanométrica, dado que es un método rápido, uniforme y efectivo, que permite incrementar las cinéticas de reacción en uno o dos órdenes de magnitud (Shang et al., 2011).

1.3.1.3 Método Sol – Gel.

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda ampliamente utilizado en la ciencia de los materiales. Principalmente se emplea para fabricar nanomateriales, normalmente óxidos metálicos. En este método, se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red, ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos en el proceso sol-gel son los alcóxidos y los cloruros metálicos, que experimentan varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal. Luego, mediante una polimerización lenta, se obtiene un gel.

Los alcóxidos son muy sensibles a la humedad y se descomponen fácilmente en su presencia. Por lo tanto, la hidrólisis para formar el gel se lleva a cabo utilizando alcoholes como solvente común para diferentes líquidos inmiscibles. Un gel polimérico es una red macromolecular infinita hinchada por solvente. Se crea un gel cuando aumenta la concentración de la especie dispersa.

El solvente queda atrapado en la red de partículas, evitando que el líquido se separe, mientras que el líquido previene que el sólido colapse en una masa compacta. La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico conocido como xerogel. Finalmente, este material se deshidrata completamente y se trata térmicamente en un flujo de gas para obtener el material nanoestructurado final (Sarojini, S., & Jayaram, et al., 2021).

Las dispersiones de nanopartículas son termodinámicamente metaestables debido a su alta área superficial, lo que contribuye positivamente a la entalpía libre del sistema. Si las energías de activación no son lo suficientemente altas, se produce una evolución de la dispersión de nanopartículas, lo que aumenta su tamaño por un proceso de maduración de Ostwald (Ostwald ripening). Por lo tanto,



las nanopartículas altamente dispersas están estabilizadas solo cinéticamente y no pueden producirse en condiciones que superen un cierto umbral.

Un método común para estabilizar las nanopartículas es depositarlas en un soporte, generalmente un óxido metálico, para evitar su sinterización, recristalización y agregación. Estos materiales nanoestructurados soportados son útiles en áreas como la catálisis, aplicaciones ópticas y médicas (Kaptay, G. 2022).

1.3.1.4 Síntesis verde.

Utilizando extractos de plantas como hoja de papaya y té verde como agentes reductores. Es una alternativa ecológica y sostenible. Los extractos de plantas ayudan a producir nanopartículas de CaO de manera más amigable con el medio ambiente.

Una ventaja importante de la síntesis de estas nanopartículas es la abundancia de calcio en la naturaleza, su bajo costo y su facilidad de producción, junto con su nanoestructura, que las hace aptas para diversas aplicaciones (Zanella, R. 2014; Henao et al., 2016).

A pesar de las limitaciones comunes de muchos métodos, como el uso de disolventes orgánicos, altas temperaturas, largos tiempos de proceso y equipos complicados, las nanopartículas de CaO mejoran las propiedades bactericidas al generar iones superóxido que reaccionan con grupos carbonilos de péptidos en las paredes celulares bacterianas, lo que conduce a su destrucción (Makhluf et al., 2005).

1.3.2 Aplicaciones de nanopartículas de óxido de calcio

El óxido de calcio tiene diferentes capacidades como las de reaccionar con silicatos u otros materiales para formar soluciones en procesos industriales, neutraliza ciertos óxidos ácidos. Igualmente se utiliza como agente de administración de fármacos y agentes quimioterapéuticos. Los efectos sobre el tamaño, la forma, la uniformidad y las propiedades de las nanopartículas dependen en gran medida de la temperatura y la naturaleza de los disolventes (Roy et al., 2013).

El óxido de calcio desempeña un papel fundamental en diversas industrias, siendo indispensable para numerosas aplicaciones en distintos campos. Las



nanopartículas de CaO son generalmente consideradas seguras y no tóxicas para humanos y animales, lo que las hace adecuadas para aplicaciones en medicina y cuidado personal. En la metalurgia, por ejemplo, se emplea principalmente en la purificación de metales, mientras que en la industria petrolera es esencial en la producción de una pasta que detecta la presencia de agua en dispositivos de almacenamiento de combustible. En la agricultura, contribuye significativamente al desarrollo de fertilizantes, lo que incrementa tanto la productividad como la calidad de los cultivos. Las nanopartículas de CaO pueden generar ROS, que son altamente reactivas y pueden dañar las membranas celulares bacterianas, proteínas y ADN, llevando a la muerte de las bacterias. El CaO es altamente alcalino y puede aumentar el pH del entorno, creando condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano.

Es relevante destacar que obtener nanopartículas de cualquier material, ya sea mediante síntesis o no, requiere precauciones especiales durante el proceso. Existe el riesgo de contaminación ambiental de la muestra, lo que podría afectar los resultados obtenidos. Por lo tanto, es crucial implementar medidas rigurosas para garantizar la pureza y la precisión de los resultados en la síntesis de nanopartículas (Poole & Owens, 2022).

También tienen un respaldo en sus características ya que en la investigación biomédica logran ser no tóxicos para humanos y animales, lo cual resulta de gran relevancia para su debida investigación, ya que tiene una amplia aplicación en reparación de tejidos dentales y en el cuidado dental generalmente (Sarojini, S., Jayaram, S. 2021).

1.4. Microdilución en caldo para la determinación inhibitoria de crecimiento en microorganismos.

Existen diversas técnicas para la evaluación adecuada y oportuna contra organismos patógenos, como hongos, bacterias y/o virus. Sin embargo, una técnica ampliamente utilizada es la microdilución en caldo a pesar de los instrumentos específicos que se requiere. Pero efectiva para realizar la siembra del organismo y mediante el correcto cultivo en un lapso de 24 horas se obtenga el crecimiento de este.



Las técnicas de dilución en caldo o agar se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano, así como determinar si un agente es antibacterial, se deben realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Por ejemplo: dilución en agar, Kirby-Bauer, Macrodilución en Caldo, E-test, etc.

Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones.

Luego cada uno de los tubos o n-placas se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se determina la MIC del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Herrera et al., 2017).

El resultado final depende de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles laboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

La técnica de microdilución en caldo es un método utilizado para evaluar la sensibilidad de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos.

Y para obtener un resultado más preciso, el ensayo por triplicado en esta técnica es esencial para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados. Al realizar tres mediciones independientes, se puede calcular un promedio que proporciona un valor más confiable de la MIC del antimicrobiano probado. Además, esta práctica ayuda a identificar posibles anomalías o desviaciones, mejorando el control de calidad y la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Para el método de preparación:

- 1.- Primero se preparan tubos de caldo que contienen diferentes concentraciones del agente antimicrobiano a probar.
- 2.- Se inocula una cantidad fija de microorganismos en cada tubo.
- 3.- Los tubos se incuban durante diferentes intervalos de tiempo (generalmente 0, 4, 8, 10, 12 y 24 horas).
- 4.- Luego, se siembra una muestra de cada tubo en una placa de agar.



Al contar el número de colonias en cada placa y multiplicarlo por la dilución ensayada, se determina el número de células supervivientes.

La MIC es la menor cantidad de antibiótico que inhibe por completo el crecimiento bacteriano en un tubo o pocillo. El punto final se determina visualmente por la ausencia de turbidez en el caldo. Alternativamente, para una lectura y registro más precisos de los resultados del método de microdilución, se puede emplear un lector de dispositivos capaz de diferenciar entre presencia y ausencia de crecimiento bacteriano (March-Rosselló, 2017).

Para establecer el punto final de crecimiento, se debe comparar cada tubo o pocillo con el control de crecimiento. Un ensayo es válido si el control muestra un botón de crecimiento mayor a 2 mm de diámetro o una turbidez clara.

Al evaluar la sensibilidad a la trimetoprima y las sulfonamidas, puede notarse un crecimiento leve debido a sustancias antagonistas en el medio. En estos casos, el punto final se define como la concentración que produce una reducción del crecimiento superior al 80% en comparación con el control de crecimiento (Carlos Malbrán, 2012).

Si en una prueba de microdilución resulta un pocillo con resultados inconsistentes, se debe considerar la MIC más alta. Si se observan múltiples pocillos inconsistentes con un fármaco, no se debe reportar ese resultado.

En el caso de los bacilos Gram negativos, las MICs obtenidas por el micrométodo suelen ser iguales o una dilución menor que las obtenidas por el macrométodo (Carlos Malbrán, 2012).

La microdilución en caldo permite evaluar cómo los microorganismos responden a los agentes antimicrobianos en un entorno líquido. La técnica de microdilución en caldo es uno de los métodos más utilizados para evaluar la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. Sin embargo, existen otros métodos que también se emplean con este propósito, algunos de ellos se muestran en comparación a la microdilución en caldo en la tabla I - 1 y se mencionan a continuación:

- Difusión en agar (método de Kirby-Bauer): En este método, se impregna un disco de papel con el agente antimicrobiano y se coloca sobre una placa de agar



inoculada con el microorganismo. La zona de inhibición alrededor del disco se mide y se compara con estándares para determinar la sensibilidad.

- E-test: Similar al método de difusión en agar, pero utiliza tiras impregnadas con gradientes de concentración del agente antimicrobiano. La concentración mínima inhibitoria se lee en la tira.

- Dilución en agar (método de macrodilución): Se preparan tubos de agar con diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. Se inoculan con el microorganismo y se observa el crecimiento. La MIC es la concentración más baja que inhibe el crecimiento.

- Dilución en agar (método de microdilución): Similar al método de microdilución en caldo, pero se realiza en placas de agar. Se evalúa el crecimiento o la inhibición en diferentes concentraciones (Alcaide et al., 2017).

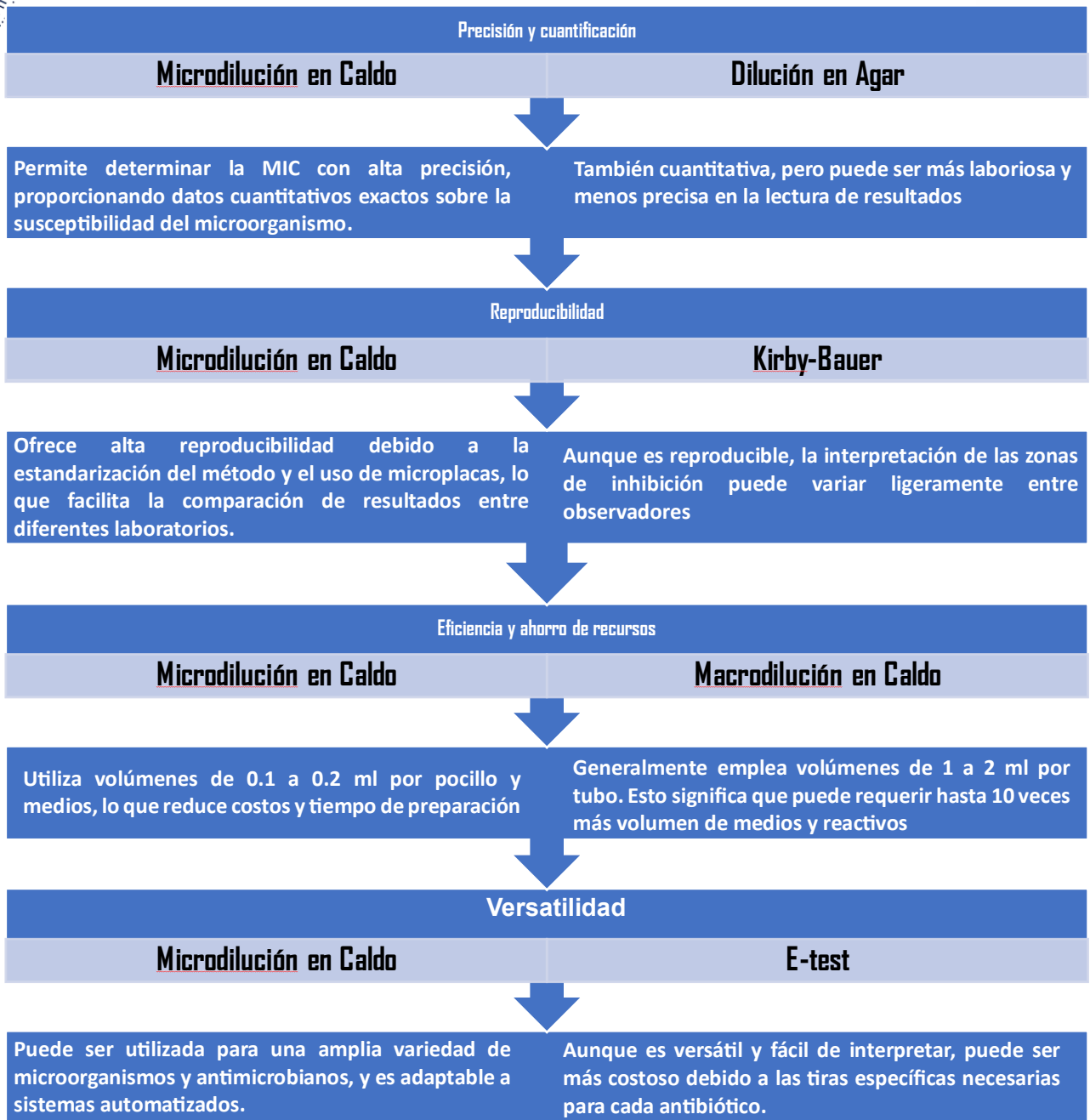


Tabla I – 1 Comparativa de la microdilución en caldo vs otras técnicas biológicas para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos.



CAPITULO II. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe la preparación de los materiales, el uso de reactivos y los equipos empleados. Además, se detallan las técnicas de caracterización utilizadas y la técnica de microdilución en caldo para determinar la MIC de las nanopartículas de CaO frente a las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

2.1 Materiales.

- Nitrato de Calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 99.5% de pureza (Marca Fermont)
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 98% de pureza (Marca Macron)
- Agua destilada (Marca Chemika)
- Etanol al 99 % de pureza (Marca Hyzel)
- Agar Triptona – Soja (TSA)
- Caldo Triptona – Soja (TSB)
- Agar Luria-Bertani (LB)
- Caldo Luria-Bertani
- Resazurina

2.2 Bacterias.

- *Staphylococcus*: *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* BA977(+)
- *Escherichia coli*: *E. coli* ATCC 8739EA y *E. coli* 25922.

2.3 Síntesis de óxido de calcio

El procedimiento comenzó utilizando precursores de CaO, como el nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y el hidróxido de sodio (NaOH). Se pesaron 2.95 gramos de nitrato de calcio y se mezclaron con 50 mililitros de agua destilada. Posteriormente, se pesaron 1.4 gramos de hidróxido de sodio y se mezclaron con otros 50 mililitros de agua destilada. La solución de nitrato de calcio se colocó en una parrilla a 50°C, ajustando la agitación a 7 rpm. Después de 2 minutos, se apagó la temperatura de la parrilla, manteniendo la agitación constante. Luego, se añadió la solución de hidróxido de sodio para obtener un volumen total de 100 mililitros, y se dejó reposar la mezcla durante 15 minutos.



Transcurrido este tiempo, se realizó el filtrado por vacío a una presión de 200 mmHg, añadiendo 100 mililitros de agua destilada en cuatro ocasiones, totalizando 400 mililitros de agua destilada añadida. Antes de finalizar el proceso de filtrado, se agregaron 25 mililitros de etanol para asegurar la completa cobertura del tamaño de poro en el papel filtro, evitando que quedara húmedo o contuviera partículas disueltas, minimizando cualquier riesgo de contaminación. Posteriormente, para secar la muestra, se transfirió al horno precalentado a 60°C y se mantuvo durante una hora y media.

Una vez seca, la muestra se colocó en una mufla Barnstead modelo Thermolyne 6000, programada con una curva de calentamiento de 5°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 650°C, manteniéndola a esta temperatura durante una hora y media para completar el proceso de calcinación.

Los equipos utilizados durante el procedimiento fueron: sistema para filtración a vacío, parrilla de calentamiento CIMAREC, agitador magnético, mufla Barnstead modelo 6000, campana de flujo laminar VICHY modelo CFL 103, cajas Petri, placas de Elisa, y micropipetas de 100 a 1000 microlitros y de 20 a 100 microlitros, marca Science Med.

2.4 Evaluación antibacterial.

En cuanto al procedimiento para la evaluación de las nanopartículas en bacterias, se siguió un método preestablecido de microdilución en caldo con ligeras modificaciones para aplicarlo en las bacterias. Se pesaron 100 miligramos de nanopartículas de CaO en una balanza de precisión para preparar la solución stock. Dentro de una campana de flujo laminar marca VICHY modelo CFL103, se colocaron las cajas Petri con medio de cultivo PDA previamente hecho como el que se observa en la figura II - 1 el cual se utilizó para toda esta prueba, para sembrar las bacterias correspondientes, manteniendo condiciones de esterilidad utilizando una lámpara de alcohol y asas para la siembra.

Se tomó una caja Petri de cada bacteria y se resembró en una nueva caja con medio de cultivo triptona y soja (TSA) y Luria Bertani (LB), dejándolas incubar a 37°C durante 24 horas para obtener un cultivo de células viables. Luego, se preparó un medio líquido para el pre-inóculo el cual es una pequeña cantidad de

microorganismos que se cultivan en un medio líquido antes de ser transferidos a un medio de cultivo principal. Este paso se realiza para asegurar que las bacterias estén en una fase de crecimiento activo y uniforme, lo que facilita su posterior crecimiento y estudio en el medio principal, esto se realizó con 3 horas de incubación para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis y determinar el volumen necesario para inocular 500,000 células, basado en la densidad óptica (OD) con ayuda de la “Calculadora de concentración de cultivo celular de *E. coli* de OD 600” de Agilent.

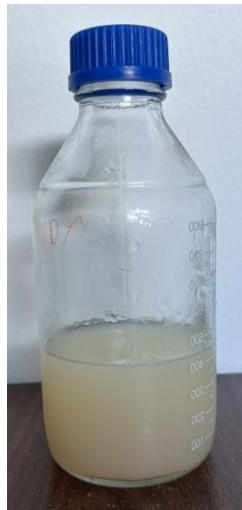


Figura II - 1 PDA (Potato Dextrose Agar) es el un medio de cultivo que se utiliza para cultivar hongos y levaduras, y para identificarlos.

El análisis ultravioleta visible (UV-Vis) se utilizó para determinar principalmente la MIC de las nanopartículas frente a un microorganismo específico en este caso las bacterias a utilizar *S. aureus* y *E. coli*.

Este método permitió medir la absorbancia a una longitud de onda específica, donde se estimó la concentración de bacterias en la muestra. Esto es esencial para asegurar que se está trabajando con una cantidad adecuada de microorganismos para las pruebas de sensibilidad y en la figura II – 2 se observan algunas muestras analizadas en el espectrómetro.

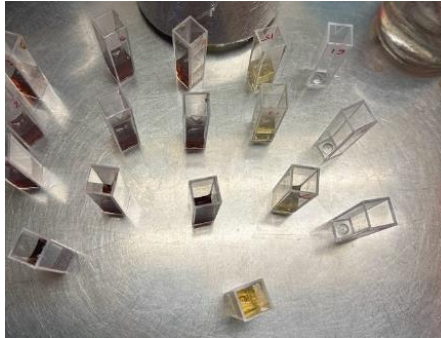


Figura II – 2 Muestras de las concentraciones para su análisis en el espectrómetro UV/VIS.

Se prepararon placas de elisa de 96 pozos para la técnica de microdilución en caldo con el siguiente orden: medio de cultivo, microorganismo, nanopartículas y resazurina. Y se realizaron cálculos para conocer la concentración de las microdiluciones utilizando la formula $C_1V_1 = C_2V_2$. Las placas se incubaron nuevamente durante 24 horas a 37°C para permitir la interacción entre los microorganismos con las nanopartículas y la resazurina indicó si el agente activo tenía actividad inhibitoria contra las bacterias así se observó que, se mantiene el color azul en el pozo.

La ecuación de dilución es fundamental ya que permite ajustar las concentraciones de reactivos para obtener resultados precisos y reproducibles. En este caso, la dilución de las nanopartículas de CaO es crucial para evaluar su actividad inhibitoria y su efecto en la coloración debido a la resazurina, un indicador de viabilidad celular

Utilizando la fórmula de dilución:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Para calcular la cantidad de concentración necesaria de nanopartículas de CaO en cada pozo de las placas Elisa.

Siguiendo la ecuación y despejando C_2 , las variables para la primera operación son:

$$C_1 = 100 \frac{\mu g}{\mu l}$$

$$V_1 = 2 \mu l$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 300 \mu l$$



$$\frac{C_1 V_1}{V_2} = C_2$$

Donde C_1 es la solución stock de las nanopartículas, V_1 es el volumen que incrementa de 2 en 2 y V_2 es el volumen total que hay en el pozo.

Tomando en cuenta dichas variables y la ecuación de dilución, en la tabla II-2 se puede observar la cantidad de solución stock agregada en cada pozo V_1 , la concentración resultante C_2 y las observaciones relacionadas con la actividad inhibitoria de las nanopartículas de CaO y el cambio de coloración debido a la resazurina.

OPERACIONES	CONCENTRACIÓN EN POZO
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 2 \mu l}{300 \mu l}$	$0.66 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 4 \mu l}{300 \mu l}$	$1.33 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 6 \mu l}{300 \mu l}$	$2.00 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 8 \mu l}{300 \mu l}$	$2.66 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 10 \mu l}{300 \mu l}$	$3.33 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 12 \mu l}{300 \mu l}$	$4.00 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 14 \mu l}{300 \mu l}$	$4.66 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 16 \mu l}{300 \mu l}$	$5.33 \frac{\mu g}{\mu l}$

$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 18 \mu l}{300 \mu l}$	$6.00 \frac{\mu g}{\mu l}$
$\frac{100 \frac{\mu g}{\mu l} * 20 \mu l}{300 \mu l}$	$6.66 \frac{\mu g}{\mu l}$

Tabla II – 2 . Cálculo de concentraciones para conocer la cantidad de nanopartículas a utilizar en cada pozo para la cinética microbiana.

2.5 Técnicas de Caracterización.

- Para el análisis de DRX se utilizó un difractómetro marca BRUKER modelo 8D Discover con radiación CuK α 1 y detector ojo de lince. Se analizó en un rango de 5-70° con tamaño de paso 0.02° y velocidad de escaneo de 0.4 segundos por paso.
- Para el análisis EDS, se utilizó un microscopio marca JEOL modelo JSM-6610LV con filamento de Tungsteno. Se analizó en alto vacío y un potencial de 20 kV. Las muestras se montaron sobre cinta de carbono y se recubrió con oro en un tiempo de escaneo de 60 seg y amplificación x500.
- Para el análisis de FTIR, se usó un espectrofotómetro marca BRUKER modelo VERTEX 70, operando en el infrarrojo medio (4000 a 400 cm^{-1}) y se usó el accesorio ATR.
- Para el análisis AFM se utilizó un microscopio de marca JEOL modelo JSPM-5200 en modo contacto y punta tipo cantiléver, el tiempo de escaneo fue de 333 μs y área de 1x1 μm . La muestra se montó en una oblea de silicio monocristalino con orientación en la dirección 100.
- Para el análisis UV/VIS, se utilizó un espectrofotómetro de la marca KALSTEIN modelo YR01857 el cual se programó en basic mode, con una absorbancia de (-) 0.011 en un rango de longitud de onda de 630 nanómetros.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de las nanopartículas de óxido de calcio.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante la síntesis por el método de precipitación, como se muestra en la figura III - 1, para la obtención de nanopartículas de CaO.



Figura III - 1 Método de síntesis utilizado para la obtención de las nanopartículas de CaO.

La síntesis de nanopartículas de CaO mediante el método de precipitación, se llevó a cabo utilizando nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e hidróxido de sodio (NaOH) como reactivos principales. Este método permitió obtener nanopartículas en un tiempo aproximado de 36 horas. Durante el proceso, se observaron dificultades relacionadas con la naturaleza higroscópica del CaO, que reacciona fácilmente con la humedad del ambiente. Para mitigar este problema, se minimizó el tiempo entre cada paso del proceso, evitando así la formación de carbonato de calcio (CaCO_3) debido a la exposición al CO_2 del ambiente.

Las nanopartículas de CaO al ser altamente reactivas en presencia de agua como lo fue en diferentes intentos de su obtención en este trabajo forman rápidamente hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Esta propiedad puede ser aprovechada en aplicaciones donde se requiere una rápida neutralización de ácidos.

La manipulación de las condiciones de síntesis permite controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas, lo que es crucial para adaptar sus propiedades a aplicaciones específicas.

Los resultados en la figura III - 2 a) antes de introducirlo a la mufla y b) después de introducirlo, pesando 3.7 gramos y dado los resultados obtenidos indican que las nanopartículas de CaO en futuras investigaciones deberán centrarse en mejorar los métodos de almacenamiento y manipulación para maximizar la estabilidad y funcionalidad de estas nanopartículas.

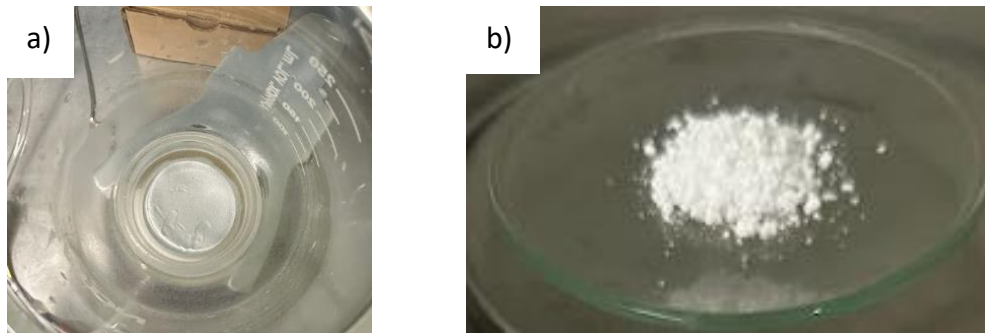


Figura III – 2 Obtención de nanopartículas de CaO a) antes de calcinarlas y b) después de introducir las a la mufla.

Para conocer la eficiencia de nuestra síntesis por el método de precipitación, nos basamos en (Habte et al., 2019) para realizar los cálculos, donde obtuvieron nanopartículas de CaO a partir de CaCO_3 teniendo un rendimiento de 100% con 3.91 gramos de nanopartículas obtenidas, lo cual esta información se utilizó como rendimiento teórico.

A partir de ello, con los gramos que se obtuvieron en este trabajo (3.72 gramos) siendo el rendimiento real, se realizaron los cálculos del rendimiento porcentual.

$$\text{Rendimiento porcentual} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teorico}} \times 100$$

El cual sustituyendo nos da:

$$\text{Rendimiento porcentual} = \frac{3.72}{3.91} \times 100 = 95.14\%$$

Obteniendo así un resultado de eficiencia de las nanopartículas de 95.14%, con lo cual confirmó un buen manejo en el proceso de síntesis.



3.2 Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

La caracterización de rayos X (DRX) se utilizó para identificar las fases cristalinas, además del análisis cuantitativo y cualitativo de las fases presentes proporcionando información detallada sobre la composición y estructura de las nanopartículas de CaO.

Se realizaron 3 procesos de calcinación a las temperaturas 650, 700 y 800°C. Los difractogramas de las muestras proporcionaron información acerca de los cambios de fase entre una y otra donde permitieron observar cómo las fases cristalinas evolucionan con la temperatura, lo cual es crucial para aplicaciones que requieren estabilidad térmica, teniendo en cuenta que estos cambios pueden influir significativamente en las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas.

La muestra utilizada para el presente trabajo fue únicamente la tratada a 650°C, debido a que difractogramas mostraron que esta temperatura es óptima para la formación de CaO, una fase cristalina crucial para las aplicaciones deseadas, en otros estudios, también utilizaron DRX para caracterizar nanopartículas de CaO. Encontraron que la temperatura de calcinación influye significativamente en la pureza y la estructura cristalina del CaO, así como han demostrado que la calcinación a temperaturas superiores a 700°C puede resultar en la formación de fases secundarias como $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$ debido a la reactividad del CaO con la humedad y el CO_2 del ambiente (Balazsi et al. 2007; Ibon A. et al 2014).

A esta temperatura de 650°C, se observó una evolución favorable de las fases cristalinas, lo cual es esencial para garantizar la estabilidad térmica de las nanopartículas. Esta estabilidad es particularmente importante para aplicaciones como la evaluación antibacteriana, donde las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas deben mantenerse constantes bajo condiciones de uso.

Los difractogramas de las nanopartículas sintetizadas tratadas a 800, 700 y 650 °C, durante 1.5 horas, con una tasa de calentamiento de 5°C por minuto aplicando la misma programación para todas, se presentaron compuestos de $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$ y CaO, donde dependiendo la temperatura del tratamiento térmico, fue como se presentaron los diferentes picos, así como se muestra en figura III - 3

a), b), c). El patrón de difracción de rayos X confirmó la formación de CaO para las 3 diferentes temperaturas.

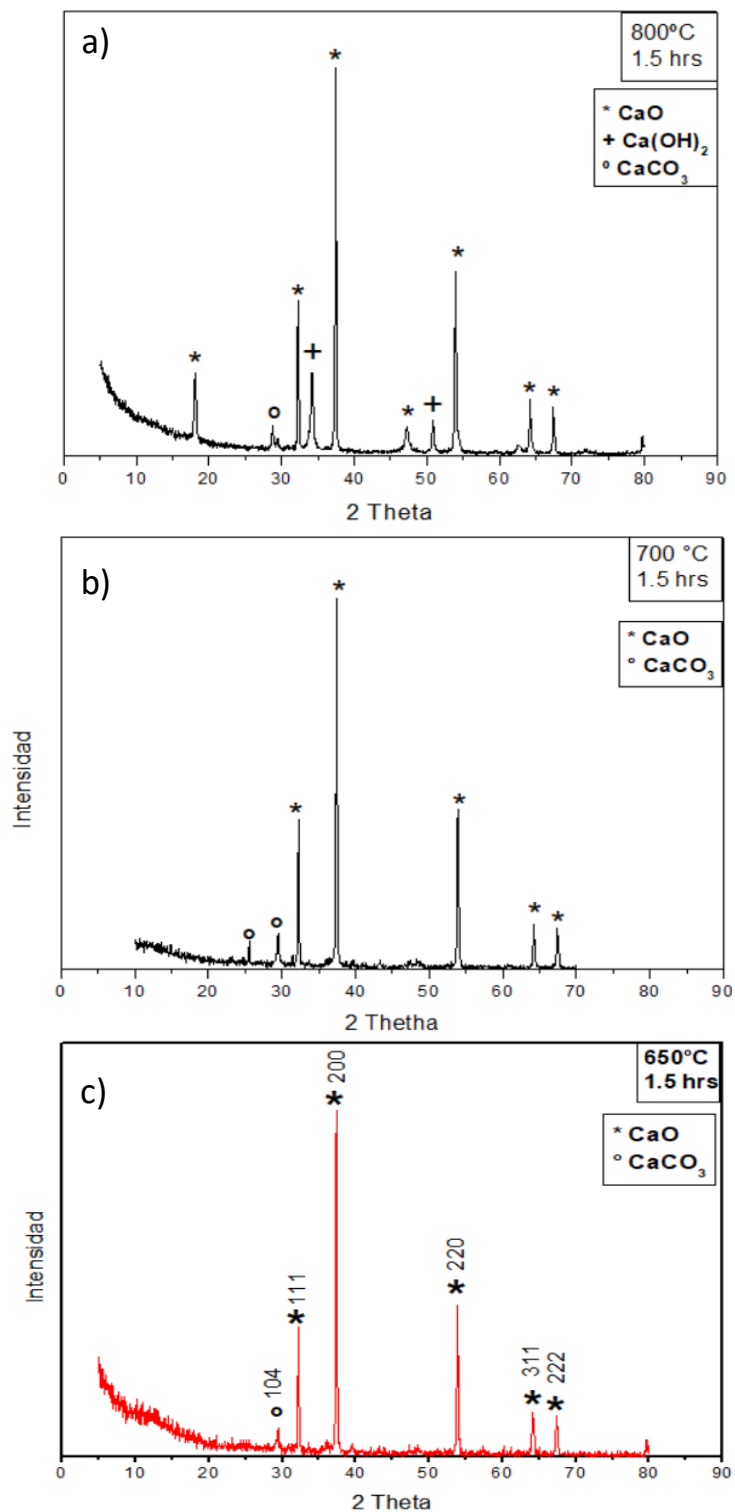
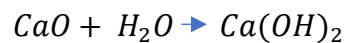


Figura III – 3 Difractogramas DRX de nanopartículas de CaO sintetizadas a a) 800, b) 700 y c) 650 °C respectivamente, por un tiempo de 1.5 horas a una tasa de calentamiento de 5°C por minuto.

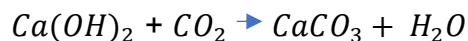


Para las muestras tratadas a 800 y 700°C, el difractograma presentó picos de difracción correspondientes no solo al óxido de calcio, sino también al carbonato de calcio e inclusive en a) presentó picos que corresponden al hidróxido de sodio. Como se ha mencionado anteriormente, al realizar síntesis por precipitación, es crucial tener cuidado con las condiciones del proceso.

Dado que el óxido de calcio es higroscópico, todo el procedimiento debe realizarse rápidamente y con el equipo adecuado. La presencia de la mezcla se puede justificar por el hecho de que las muestras a) y b) son lo suficientemente reactivas y, al entrar en contacto con el H₂O de la atmósfera, se favorece su crecimiento, así como se observa en la siguiente reacción:



Lo cual genera hidróxido de calcio sobre la superficie del CaO que se obtiene, al igual que el hidróxido puede reaccionar con el CO₂ del medio ambiente como se muestra en la siguiente reacción:



Donde se observa cómo se produce carbonato de calcio, tal como se observa en los difractogramas.

Las nanopartículas de CaO se miden a lo largo del ángulo de difracción 2θ. La presencia de señales muy intensas y múltiples indican que el producto está cristalizado, estos picos de difracción visibles en la figura III - 3 c), en la posición 2θ = 32.1°, 37.5°, 54.2°, 64.7°, y 67.5, que corresponderían a los índices de Miller (111), (200), (220) y (311) del CaO con estructura cúbica simple (JCPDS-82-1691) La proporción de las fases obtenidas de acuerdo a un análisis semicuantitativo fue CaO 91% y CaCO₃ 9% en peso, siendo favorable como resultado de obtención de CaO. (Balazsi et al., 2007)

En la figura III - 3 en a) y b) se observan picos en la posición 2θ = 18.2°, 29.1°, 34°, 50.7 y 57.7° pertenecientes a Calcita. La existencia de estos picos de fase impura de CaCO₃ puede deberse a la presencia de humedad contenida en las nanopartículas sintetizadas ya que es el resultado de una exposición al medio ambiente.



3.3 Caracterización por espectroscopía de energía dispersiva (EDS).

Se utilizó la técnica de espectroscopía de dispersión de energía (EDS) para el análisis elemental de las nanopartículas y conocer los elementos presentes. Esta técnica es fundamental para determinar la composición química de las muestras a nivel microscópico, proporcionando información precisa sobre los elementos y su distribución.

En el análisis de nanopartículas de óxido de calcio (CaO) mediante EDS, se obtuvieron los siguientes valores de porcentaje en peso: **Carbono (C) 10.32%**, **Calcio (Ca) 52.84%** y **Oxígeno (O) 36.83%**, sumando un total de 100%.

La figura III - 4 a) muestra la superficie morfológica de las nanopartículas, donde se observa que están estrechamente empaquetadas en disposiciones porosas. Las nanopartículas se presentan desarrolladas y dispersas, con dimensiones no uniformes. Además, la distribución de las partículas indica una homogeneidad significativa, lo cual es crucial para aplicaciones que requieren una distribución uniforme de los materiales.

El espectro EDS en la figura III - 4 b) de las nanopartículas de CaO indica que los elementos Ca y O están presentes en la muestra, con un porcentaje en peso de 52.84% y 36.83% respectivamente. Esta relación es consistente con la composición esperada para el óxido de calcio, aunque la presencia de carbono al 10.32% sugiere una posible contaminación o adsorción de CO_2 .

También se observan los picos prominentes del calcio, aunque existe un ligero exceso de oxígeno en la muestra en comparación con el calcio. Este exceso de oxígeno podría deberse a la presencia de pequeñas cantidades de compuestos oxigenados adicionales o a la adsorción de oxígeno en la superficie de las nanopartículas.

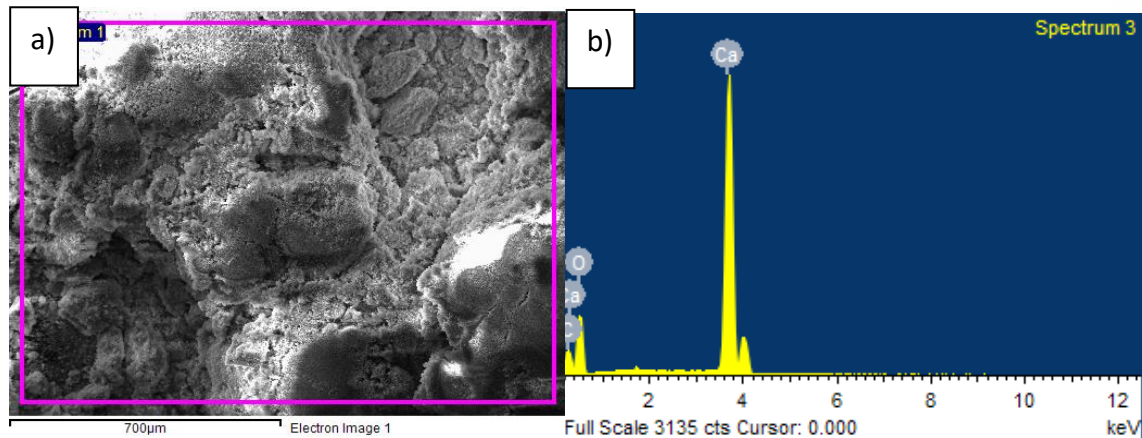


Figura III – 4 a) Micrografía de nanopartículas de CaO a una escala de 700 nm y b) su respectivo espectro.

Teóricamente, el óxido de calcio tiene una relación 1:1 entre Ca y O, lo que implicaría que, en un compuesto puro, las proporciones deberían ser cercanas al 50% para ambos elementos. Sin embargo, en la práctica, las proporciones pueden variar debido a la presencia de impurezas y la adsorción de gases del ambiente.

En el análisis, el calcio tiene un porcentaje en peso mayor que el oxígeno, lo cual es consistente con la formación de CaO, pero la presencia de carbono y otros factores pueden alterar esta relación. A pesar de la relación atómica ligeramente más alta para el oxígeno, las nanopartículas de CaO tienen una alta relación superficie-volumen lo que aumenta su interacción con bacterias.

Esta alta superficie permite una mayor liberación de especies reactivas de oxígeno, que son tóxicas para las bacterias.

En estudios similares, se ha observado que la síntesis de nanopartículas de óxido de calcio a partir de carbonatos de calcio puede resultar en la presencia de carbono residual. Por ejemplo, un estudio sobre la síntesis de nanopartículas de CaO a partir de subproductos alimentarios ricos en carbonato de calcio reportó la presencia de carbono debido a la descomposición incompleta de los precursores orgánicos (Ramírez et al., 2019).

Otro estudio sobre la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y alúmina también encontró que la presencia de carbono puede ser un desafío significativo en la obtención de materiales de alta pureza (Esquivias, a. 2018).

3.4 Caracterización por microscopía de fuerza atómica (AFM)

La AFM utiliza una sonda (Cantilever) extremadamente afilada que se desplaza sobre la superficie de la muestra. Las interacciones entre la punta de la sonda y la superficie de la muestra generan fuerzas que se registran para crear una imagen topográfica de alta resolución. Esto es crucial para estudiar nanopartículas, ya que permite visualizar su morfología y tamaño con gran precisión.

Las imágenes realizadas con AFM sobre la superficie de las nanopartículas de CaO indicaron detalles sobre la topografía, como la rugosidad, la forma e incluso el tamaño de las características. Estas propiedades son importantes para aplicaciones en las que se requiere una alta durabilidad y resistencia al desgaste.

La figura III - 5 obtenida por AFM, muestra una topografía tridimensional de una superficie con nanopartículas de CaO.

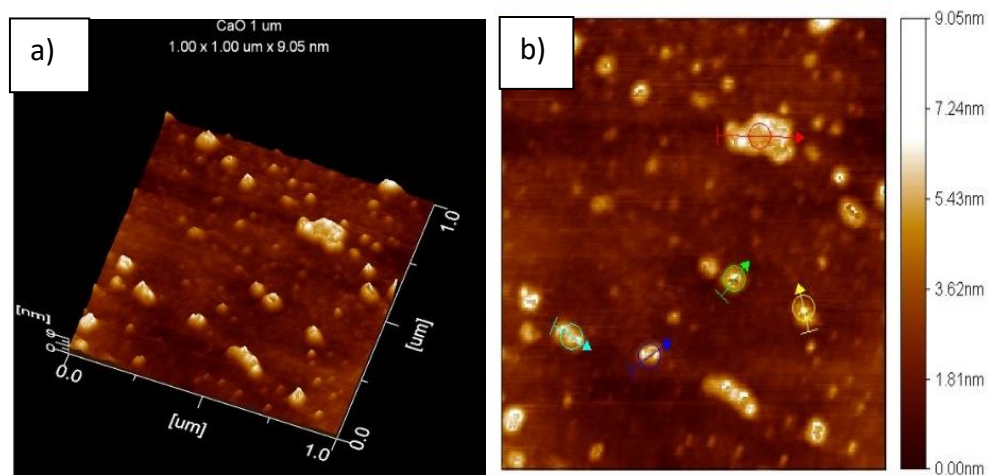


Figura III – 5 Topografía de nanopartículas de CaO obtenida mediante microscopía de fuerza atómica, donde a) se muestra la medida del área escaneada y b) se muestran 5 nanopartículas.

El área escaneada es de 1.00 x 1.00 micrómetros, con una escala de altura de hasta 9.05 nanómetros. Las áreas más altas y bajas se pueden identificar fácilmente por los cambios de color.

La uniformidad en la altura de estas partículas sugiere un proceso de síntesis controlado, lo cual es crucial para aplicaciones donde la consistencia en el tamaño de las partículas es importante. Esta heterogeneidad puede influir en las propiedades físicas y químicas del material, como la reactividad y la estabilidad.

Existen parámetros medibles a partir de la imagen obtenida en la figura 3.5 los cuales se muestran en la tabla III - 1.

Color	Ra [nm]	Rq [nm]	Rz [nm]
Rojo	1.35	1.63	5.42
Verde	1.37	1.53	4.6
Morado	1.59	1.82	6.64
Azul	1.47	1.83	6.46
Amarillo	1.8	1.83	6.09

Tabla III – 1. Medidas de las nanopartículas visualizadas en AFM.

Los parámetros de rugosidad que se muestran en la tabla III - 1 como Ra, Rq y Rz proporcionan información cuantitativa sobre la textura de la superficie:

- Ra (Rugosidad media): Es el promedio de las desviaciones absolutas de la altura respecto a la línea media. En la figura 3.5 b) Ra es 0.705 nm, lo que indica una superficie relativamente lisa.
- Rq (Rugosidad cuadrática media): Es la raíz cuadrada de la media de las desviaciones al cuadrado de la altura respecto a la línea media. En la figura 3.5 Rq b) es 1.03 nm.
- Rz (Rugosidad máxima): Es la diferencia entre el pico más alto y el valle más profundo en la superficie. En la figura 3.5 b) Rz es 9.05 nm

Las medidas de Ra y Rq son relativamente cercanas entre las nanopartículas, lo que sugiere que todas tienen una textura similar, pero la variabilidad en Rz indica que algunas nanopartículas tienen características de superficie más complejas.

Longitud [nm]
173
101
121
108
105

Tabla III – 2 Longitud de las nanopartículas marcadas en la figura 3.5 b)

Las longitudes mostradas en la tabla III – 2 de las nanopartículas más grandes equivalen a 223 nm, 101 nm, 121 nm, 108 nm, y 105 nm respectivamente estas medidas están en la escala de nanómetros (nm), algunas de ellas están justo en el

límite superior. Si bien esto es mayor que 100 nm, en el contexto de nanopartículas, el enfoque suele estar en la escala de las características superficiales.

Para determinar las longitudes de las nanopartículas menos apreciables, a partir de gráfico III - 3, se empleó la aplicación ImageJ para medir aquellas partículas más pequeñas donde también se realizó un histograma para observar el número de nanopartículas que hay entre un rango menor a 100 nm, obteniendo un promedio de 68-78 nm.

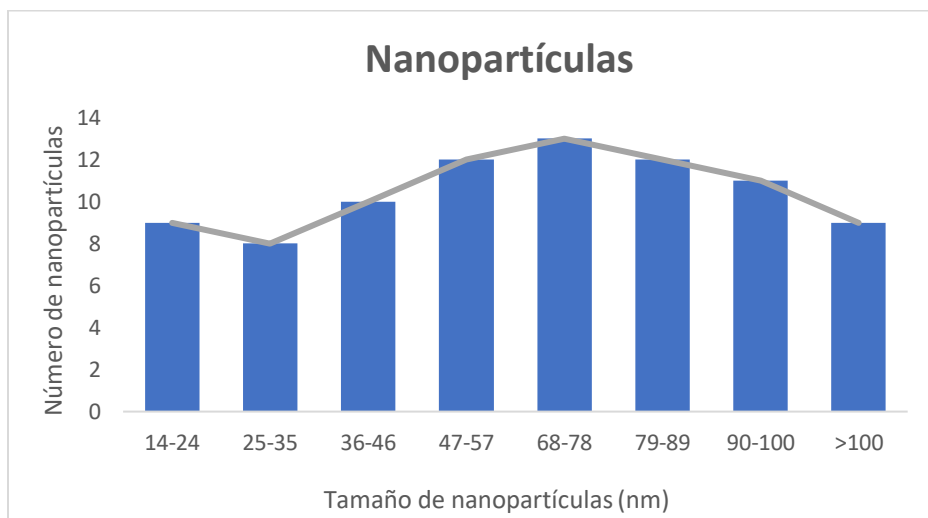


Gráfico III - 3. Longitud de todas las nanopartículas apreciables en la figura III-5

Estos resultados indican que solo algunas nanopartículas exceden el límite superior de la escala de 1 a 100 nanómetros. Por lo tanto, podemos concluir que el rango obtenido es altamente aceptable para el proceso de síntesis de nanopartículas de CaO.

En un estudio, se sintetizaron nanopartículas esféricas de oro mediante quitosano y se evaluaron sus propiedades utilizando AFM. Este estudio mostró que las nanopartículas tenían una morfología esférica y una distribución de tamaño uniforme, similar a las observaciones realizadas en las nanopartículas de CaO. La rugosidad media (Ra) y la rugosidad cuadrática media (Rq) también fueron parámetros clave en la caracterización de la superficie, proporcionando información sobre la textura y la estabilidad de las nanopartículas.



Los estudios comparativos muestran que las nanopartículas de CaO, oro tienen características similares en términos de morfología y rugosidad cuando se analizan mediante AFM. La uniformidad en el tamaño y la superficie lisa son características comunes donde la consistencia en las propiedades de las nanopartículas puede influir en su comportamiento y eficacia (Martinez, 2021).

Otro estudio sobre la síntesis de nanopartículas de ZnO/CaO dopadas con urea también utilizó AFM para evaluar la morfología y el tamaño de las nanopartículas. Los resultados mostraron que las nanopartículas tenían una distribución de tamaño uniforme y una superficie lisa, lo cual es consistente con los hallazgos en las nanopartículas de CaO (Valencia, 2020).

3.5 Caracterización por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para analizar las nanopartículas de CaO sintetizadas, proporcionando información crucial sobre los grupos funcionales presentes.

Los resultados de FTIR confirman la síntesis exitosa de nanopartículas de CaO con una pureza aceptable y una mínima contaminación por carbonato. Esta técnica ha demostrado ser una herramienta eficaz para la caracterización de las nanopartículas, proporcionando información detallada sobre los grupos funcionales presentes y la composición superficial del material.

En la figura III - 6 las nanopartículas de CaO mostraron picos en 1444.42 cm^{-1} , el cual este pico se atribuye al enlace C–O. Este tipo de vibración es generalmente una vibración de tensión. En 863.95 cm^{-1} que también está relacionado al enlace C–O, corresponde a una vibración de flexión, lo cual en ambos picos indica la carbonatación de las nanopartículas de CaO y la banda fuerte en 505 cm^{-1} se identifica como una vibración de tensión del enlace Ca–O en las nanopartículas de CaO.

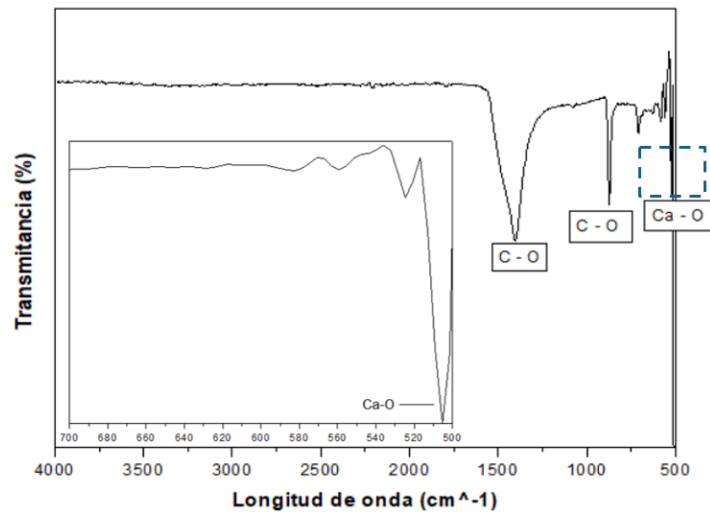


Figura III – 6 Espectro FTIR de las nanopartículas obtenidas y sus respectivos enlaces.

El tamaño de las nanopartículas influye en las posiciones y las intensidades de las bandas en el espectro FTIR. Las nanopartículas más pequeñas tienden a mostrar un ensanchamiento de las bandas debido a efectos de confinamiento cuántico. Este fenómeno se observa en las bandas de estiramiento Ca-O, que pueden desplazarse ligeramente hacia frecuencias más altas a medida que disminuye el tamaño de las partículas (Liu et al., 2010).

Las nanopartículas de CaO pueden interactuar con diversos compuestos, y estas interacciones se reflejan en el espectro FTIR. Por ejemplo, si las nanopartículas están funcionalizadas con ácidos grasos, se observarán bandas adicionales en el rango de 2800 - 3000 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos C-H. Estas bandas confirman la modificación superficial de las nanopartículas, lo cual es esencial para aplicaciones específicas como la catálisis o la biomedicina (Mirghiasi et al., 2013).

3.6 Efecto antibacterial de las nanopartículas de CaO en *S. aureus* y *E. coli*.

Las actividades antibacterianas de las nanopartículas de CaO fueron evaluadas en diferentes concentraciones contra varias cepas bacterianas. Los resultados indican que la MIC varía según la cepa bacteriana y la longitud de onda utilizada fue de 630 nm como se muestra en la figura III – 7.



Figura III – 7 Rango de lectura utilizado para la espectroscopia Uv/Vis.

La espectroscopia Uv/Vis sirvió para ver cuanta luz refractaba con la cantidad de muestra, es decir que cantidad de luz pasó a través de la muestra lo cual en este caso se indicó mediante cálculos la concentración de bacterias presentes en la muestra para ambas cepas teniendo 0.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 4.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 4.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 5.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Observar el cambio de coloración en el proceso de inhibición es crucial, y por ende utilizar la resazurina como la mostrada en la figura III - 8 facilito este proceso el cambio de coloración es muy importante.

La resazurina experimenta un cambio de color notable cuando se utiliza para detectar la actividad bacteriana. Inicialmente, la resazurina es de color azul y no fluorescente. Cuando las bacterias viables están presentes y metabólicamente activas, reducen la resazurina a resorufina, que es de color rosa y altamente fluorescente.



Figura III - 8 Resazurina utilizada para las pruebas de indicación bacteriológica de las nanopartículas y sus propiedades de inhibición.

Las nanopartículas de CaO ejercen su actividad antibacteriana principalmente a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

en su superficie. Estas ROS pueden dañar componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ADN, lo que lleva a la muerte bacteriana. La alta relación superficie-volumen de las nanopartículas de CaO también facilita una mayor interacción con las bacterias, potenciando su efecto antibacteriano. En la figura III - 9 muestra la bacteria *S. aureus* que se utilizó para la prueba de microdilución.



Figura III – 9 Placas de TSA con la bacteria *S. aureus*.

Las nanopartículas de CaO muestran una actividad antibacteriana efectiva contra las cepas de *S. aureus* evaluadas, con una variabilidad en la MIC que destaca la importancia de considerar las características específicas de cada cepa al desarrollar tratamientos antibacterianos y el cambio característico de color de la resazurina debido a la reducción de células viables como se muestra en la figura III – 10.

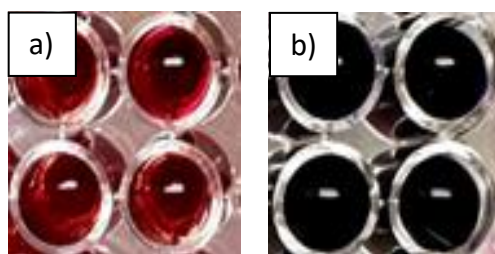


Figura III – 10 Imagen visual de a) el control de viabilidad donde las bacterias están vivas y b) el control de inhibición de estas

Para *S. aureus* ATCC 25923, la MIC fue de 6.00 mg/ml, como se observa en la figura III – 11 lo que sugiere que esta cepa requiere una mayor concentración de nanopartículas de CaO para inhibir su crecimiento. En contraste, *S. aureus* ATCC BAA977 (+) mostró una MIC de 5.33 mg/ml, indicando que esta cepa es más

susceptible a las nanopartículas de CaO, ya que se necesita una menor concentración para lograr la inhibición total.

Este cambio de color de azul a rosa es indicativo de la presencia de células viables y activas. La intensidad del color rosa o la fluorescencia generada es proporcional al número de bacterias vivas en la muestra. Este método es muy útil en ensayos de viabilidad bacteriana y en la evaluación de la eficacia de agentes antimicrobianos.

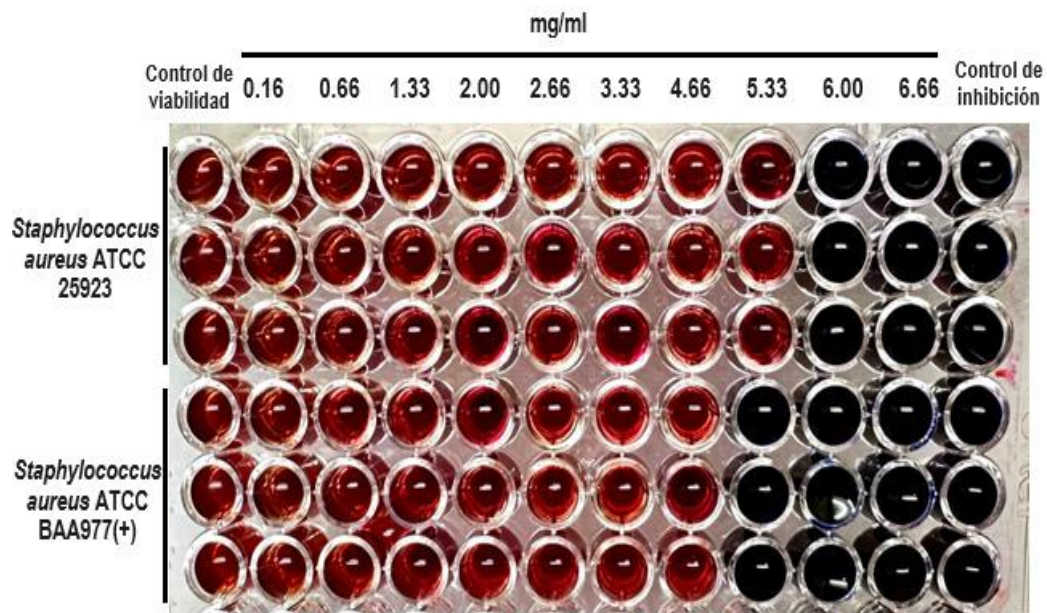


Figura III – 11 Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de óxido de calcio frente a las bacterias *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC BAA977(+).

Los resultados que se muestran son significativos porque demuestran que, aunque ambas cepas de *S. aureus* son sensibles a las nanopartículas de CaO, hay diferencias en la concentración necesaria para inhibir su crecimiento. Esto podría deberse a variaciones en la resistencia intrínseca de cada cepa al agente antibacteriano.

Realizar un ensayo por triplicado como lo permite esta técnica, hace que se pueda obtener resultados más fiables y precisos, reduciendo la variabilidad y los errores experimentales, y proporcionar una base estadística sólida para el análisis de datos. Esto es crucial para asegurar la validez y reproducibilidad del experimento.

Además, la superficie y el tamaño de las nanopartículas de CaO también juegan un papel crucial en su actividad antibacteriana. Nanopartículas con una mayor área superficial tienden a ser más efectivas, ya que proporcionan más sitios activos para interactuar con las bacterias. La funcionalización de la superficie de las nanopartículas, como la adición de recubrimientos específicos, puede mejorar aún más su eficacia al facilitar una mejor adhesión a las células bacterianas.

Un estudio evaluó la actividad antimicrobiana de nanopartículas de CaO sobre *S.aureus* y *E.coli* mediante el método de microdilución en caldo, los resultados mostraron que las nanopartículas de CaO eran efectivas contra ambas cepas bacterianas, con MIC similares a las observadas en este trabajo. Y también se destacó la importancia de la generación de ROS en la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de CaO (P. Ramirez et al., 2020)

En la figura III – 12 se muestra el medio de cultivo que se utilizó para mantener cepas bacterianas en este caso de *E.coli*.

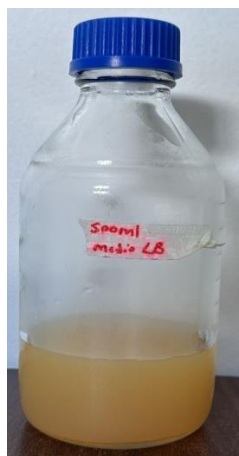


Figura III – 12 Medio de cultivo Luria Bertani (LB), utilizado para cultivar y mantener cepas principalmente de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Tanto en la bacteria *S. aureus* como en *E. coli*, es evidentemente el mecanismo de las propiedades antibacterianas de las nanopartículas donde el rango de inhibición depende de la concentración utilizada, donde también factores como el tamaño de las nanopartículas y el hecho de que las nanopartículas de CaO tienen el potencial de producir especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, estas



especies pueden provocar estrés oxidativo, que en última instancia provoca la muerte de las células bacterianas.

En la figura III – 13 Se probaron dos cepas diferentes de la misma bacteria que igualmente son consideradas como agentes benignos para el cuerpo humano, *E. coli* ATCC 8739EA donde el control de inhibición es a partir de 5.33 mg/ml y para la *E. coli* ATCC 25922 la MIC es de 3.33 mg/ml dando como resultado que se inhibe su crecimiento con totalidad.

Otro estudio sobre la biosíntesis de nanopartículas de plata (NPs-Ag) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* evaluó la actividad antibacteriana mediante ensayos de microdilución en caldo. Las nanopartículas de Ag mostraron actividad contra bacterias Gram positivas y negativas, con MIC de 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ y concentración mínima bactericida (CMB) de 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$. Aunque las nanopartículas Ag mostraron una gran eficacia a concentraciones bajas, ambos estudios subrayan la importancia de las nanopartículas como agentes antimicrobianos efectivos (Rosales, 2008).

Aunque se utilicen las mismas cepas bacterianas, las diferencias en la susceptibilidad pueden deberse a variaciones en la resistencia intrínseca de las cepas. Las cepas pueden desarrollar mecanismos de resistencia específicos que afectan su respuesta a las nanopartículas de CaO. Además, las diferencias en la preparación y el manejo de las cepas bacterianas entre estudios pueden influir en los resultados.

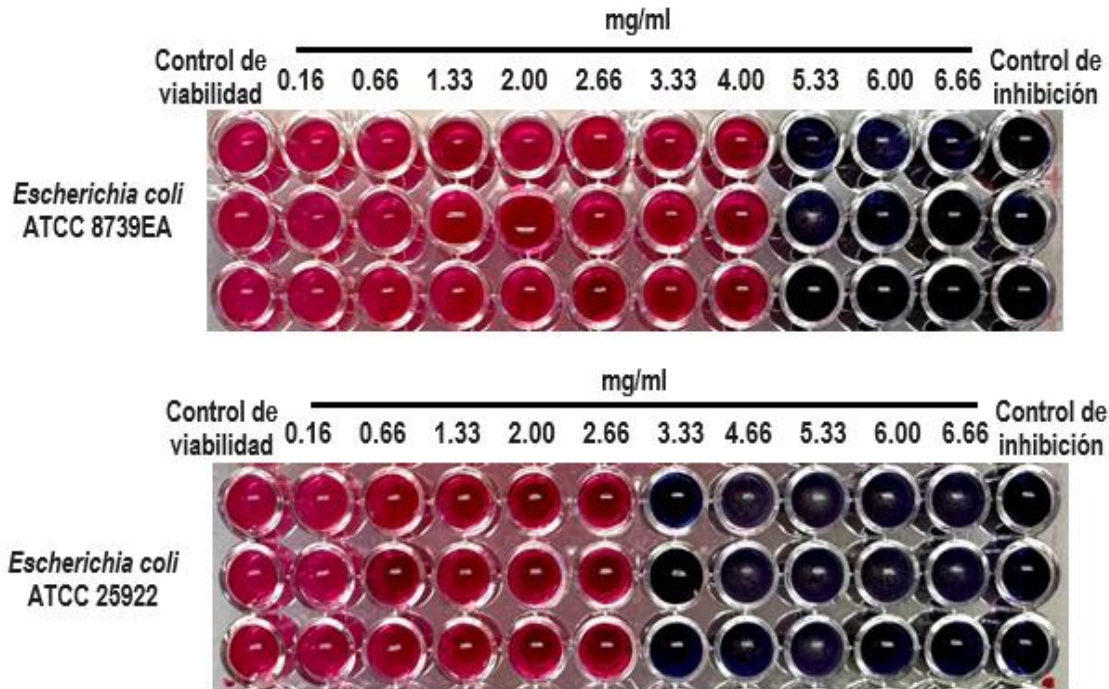


Figura III – 13 Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para las cepas *E. coli* ATCC 8739EA y *E. coli* ATCC 25922.

Se observan los resultados de las concentraciones de inhibición en este caso de las nanopartículas de CaO contra la *E. coli*, dando resultados no muy similares entre una cepa y otra, ya que se puede observar la cantidad de concentración necesaria para inhibir una cepa con otra. Aunque lo interesante aquí y lo cual sugiere un resultado favorecedor de las nanopartículas es que, la cantidad necesaria para inhibir estas bacterias se reduce bastante en comparación con otros artículos de investigación.

Los resultados del trabajo presente son consistentes con los hallazgos de otros estudios que utilizaron el método de microdilución en caldo para evaluar la actividad antimicrobiana de nanopartículas. La generación de ROS y la alta relación superficie-volumen son factores clave que contribuyen a la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas de CaO.

Estudios previos como en “Antibacterial activity and in vitro cytotoxicity studies of Ag-doped CaO nanoparticles”, “Synthesis and structural characterization of Ag doped CaO for reduction of 2-Nitrophenol”, han demostrado que las nanopartículas de CaO tienen una actividad antimicrobiana significativa contra



diversas bacterias. Por ejemplo, se ha reportado que las nanopartículas de CaO dopadas con plata (Ag) muestran una actividad antimicrobiana mejorada debido a la sinergia entre el CaO y la Ag. Además, la modificación de la superficie de las nanopartículas de CaO puede aumentar su eficacia antibacteriana (López-Badillo et al., 2020 & Nivetha et al., 2024).

3.7 Eficacia antibacterial de las nanopartículas de óxido de calcio vs otros agentes bacterianos.

Existen diversos artículos donde se han probado las nanopartículas CaO contra otras bacterias para comprobar su propiedad antibacteriana para inhibir su crecimiento, dependiendo la cepa es como el porcentaje de concentración para inhibirla puede variar.

- Antimicrobial Activity of CaO Nanoparticles (Roy et al., 2013):
Las nanopartículas de CaO se obtuvieron por el método de irradiación por microondas, donde mostraron una amplia actividad antibacteriana contra la *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus epidermis* (MTCC 435) donde el rango de la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue entre 2 – 8 Mm para todas las cepas probadas.

Las nanopartículas de CaO fueron efectivas contra bacterias gramnegativas y grampositivas, así como contra levaduras patógenas, de igual forma estas nanopartículas generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las membranas celulares de los microorganismos, que los lleva a eliminarlos.

También se menciona que estas nanopartículas demuestran ser estables y duraderas en condiciones de almacenamiento normales, manteniendo su actividad antimicrobiana y aunque relativamente son baratas de producir y no son tóxicas, lo que las hace adecuadas para aplicaciones antimicrobianas.



- Structural, Optical and Antibacterial Response of CaO Nanoparticles Synthesized via Direct Precipitation Technique (Kumar et al., 2021).

Se obtuvieron nanopartículas de CaO mediante precipitación directa y mostraron zonas de inhibición contra cepas bacterianas gramnegativas (*Escherichia coli* y *Vibrio Cholerae*), las concentraciones oscilaron en 5,10,15,20 y 25 mg/ml. Mostrando efectividad antibacteriana en ambas, donde el grado de la zona de inhibición es mayor contra la cepa *E.coli* (28 ± 0.15 mm) en comparación con *V. Cholerae* (25 ± 0.10 mm) entre las concentraciones de nanopartículas.

- Antibacterial and Antibiofilm Activity of Ficus carica-Mediated Calcium Oxide (CaONPs) Phyto-Nanoparticles

Para obtener los resultados del potencial antibacteriano que tienen las nanopartículas de CaO, se pusieron a prueba frente a diversas bacterias (*P. aeruginosa*, *S. Aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *E. coli*) en donde se observaron zonas de inhibición de 28 ± 0.10 , 23 ± 0.3 , 18 ± 0.9 , 13 ± 1.6 y 11 ± 0.5 mg/ml demostrando que las nanopartículas inhiben considerablemente la formación de biofilm, proporcionando y confirmando su importante actividad antibacteriana. Utilizando agua desionizada como control negativo, mientras que utilizan ciprofloxacina como control positivo. Y la cantidad de nanopartículas de CaO utilizadas durante el análisis antibacteriano fue el mismo para todas las cepas bacterianas. La estabilidad de las nanopartículas se atribuye también a la presencia de compuestos bioactivos de *Ficus carica* que actúan como agentes estabilizantes. Lo que demuestra que la combinación de diferentes agentes puede ayudar a superar la resistencia bacteriana y proporcionar un tratamiento más efectivo y mejor aún las nanopartículas de CaO mediadas por ficus carica son relativamente baratas de producir debido al uso de una estrategia de química verde que emplea



extractos de plantas como agentes reductores y estabilizantes. Este método no solo es económico, sino también ecológico, ya que evita el uso de productos químicos tóxicos.

- Biosynthesis and Characterization of Calcium Oxide Nanoparticles from *Citrullus colocynthis* Fruit Extracts; Their Biocompatibility and Bioactivities (Mazher et al., 2023)

La actividad antimicrobiana probada en este artículo se evaluó junto con extractos de frutos de *C. colocynthis*, mostrando una actividad antimicrobiana muy efectiva contra tres microbios, donde la zona de inhibición se midió contra varios patógenos cutáneos, para *M. luteus* fue (25.6 ± 1.1), el cual fue ligeramente mayor que la estreptomycin (24.8 ± 1.6) con un índice de actividad de 1.03. Esta MIC de las nanopartículas de CaO se determinó mediante ensayos de dilución en caldo. Indicando que la MIC de las nanopartículas es baja, lo que sugiere una alta eficacia antibacteriana en concentraciones mínimas, mostrando un amplio espectro de acción, siendo efectivas contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.

La adsorción de fitoquímicos se puede atribuir a los iones de calcio que se reducen a nanopartículas de CaO e interfieren en los procesos celulares bacterianos.

Su estabilidad igualmente se mostró alta en diversas condiciones ambientales y mantuvieron su actividad antibacteriana durante periodos prolongados.

La sinergia con otros agentes antibacterianos se observó, mediante la combinación de las nanopartículas de CaO y otros agentes como por ejemplo con extractos de *Citrullus colocynthis* el cual mejoró la eficacia antibacteriana en comparación con el uso individual de cada agente.

Asimismo, en esta síntesis de nanopartículas utilizando extractos de *Citrullus colocynthis* es un método ecológico y de bajo



costo. La aplicabilidad de estas nanopartículas se extiende a diversas áreas debido a su eficacia y biocompatibilidad.

En estos artículos a pesar de la viabilidad tanto de la síntesis utilizada, como del procedimiento y resultados de inhibición, presentan algunas desventajas tanto a corto como a largo plazo.

En el estudio de Mazher et al. (2023) sobre la biosíntesis y caracterización de nanopartículas de CaO a partir de extractos de *Citrullus colocynthis*, se identifican varias desventajas. A corto plazo, la síntesis verde utilizando extractos de frutas puede presentar variabilidad en la calidad y tamaño de las nanopartículas debido a las diferencias en la composición química de los extractos. A largo plazo, la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas biológicamente puede ser un problema, ya que los componentes orgánicos pueden degradarse con el tiempo.

En cuanto al estudio sobre la actividad antibacteriana y antibiofilm de las nanopartículas de CaO mediadas por *Ficus carica*, se observan desventajas similares. A corto plazo, la síntesis utilizando extractos de *Ficus carica* puede ser costosa y requerir un control preciso de las condiciones de reacción para obtener nanopartículas uniformes. A largo plazo, la eficacia antibacteriana puede disminuir debido a la posible aglomeración de las nanopartículas y la degradación de los componentes orgánicos.

El estudio de Kumar et al. (2021) sobre la respuesta estructural, óptica y antibacteriana de las nanopartículas de CaO sintetizadas mediante la técnica de precipitación directa también presenta desafíos. A corto plazo, esta técnica puede producir nanopartículas con una distribución de tamaño amplia, lo que puede afectar su eficacia antibacteriana. A largo plazo, la estabilidad de las nanopartículas puede verse comprometida debido a la posible aglomeración y cambios en las propiedades superficiales con el tiempo.

Y en el estudio de Roy et al. (2013) sobre la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de CaO sintetizadas mediante irradiación de microondas destaca algunas desventajas. A corto plazo, esta síntesis puede requerir equipos especializados y condiciones de reacción precisas. A largo plazo, la eficacia



antimicrobiana puede disminuir debido a la posible formación de aglomerados y la degradación de las nanopartículas.

En el presente trabajo se ha enfocado en utilizar técnicas que ayuden a controlar tanto el tamaño de las nanopartículas como la síntesis por precipitación, además que es un procedimiento simple y económico, ya que no requiere equipos sofisticados ni condiciones extremas de reacción, lo cual lo hace accesible para muchos laboratorios y adecuado para la producción a gran escala, también permite un buen control sobre el tamaño y la morfología de las nanopartículas mediante la manipulación de parámetros como la concentración de reactivos y la temperatura.

Esta técnica de precipitación es conocida por su alta reproducibilidad, lo que significa que se pueden obtener nanopartículas con características consistentes en diferentes lotes de producción. Puede ser utilizada para sintetizar una amplia variedad de nanopartículas, incluyendo óxidos metálicos como el CaO, lo que la hace muy versátil. Esto es crucial para aplicaciones donde el tamaño de las nanopartículas influye en sus propiedades.

En comparación con los métodos de síntesis verde y otras técnicas mencionadas anteriormente, la síntesis por precipitación ofrece una mayor simplicidad y control sobre el tamaño de las nanopartículas, lo que puede mejorar su eficacia antibacteriana.



CAPITULO IV. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados de este trabajo de investigación, se concluye con lo siguiente:

1. Las nanopartículas obtenidas presentan una morfología controlada y una distribución homogénea, características confirmadas por análisis como DRX, EDS, y AFM. Estas propiedades son cruciales para aplicaciones específicas, incluidas las antimicrobianas.
2. El método de precipitación utilizado para sintetizar nanopartículas de óxido de calcio (CaO) mostró una alta eficiencia, con un rendimiento del 95.14%. Esto indica un control adecuado del proceso y un manejo preciso de los reactivos.
3. La calcinación a 650 °C resultó en nanopartículas con una composición cristalina mayor de CaO, reduciendo la formación de fases secundarias como CaCO_3 . Esta temperatura es óptima para asegurar la pureza mayor de CaO hasta un 91% en peso.
4. El análisis por EDS mostró la presencia mayormente de Ca y O en una proporción atómica de 1:1. Además la presencia de C es debido a la reactividad que presenta en CaO con el CO_2 del ambiente.
5. Los resultados obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) fueron muy útiles para observar la morfología de las nanopartículas mostrando uniformidad en la altura y confirmaron su alta calidad al ser sintetizadas y se obtuvo una rugosidad media (Ra) de 0.705 nm, una rugosidad cuadrática media (Rq) aceptable de 1.03 nm y una rugosidad máxima (Rz) de 9.05 nm. El análisis a partir de la micrografía por el software imageJ permitió determinara un intervalo en el tamaño promedio de partícula de 68-78 nm.
6. En el cultivo de las bacterias durante 24 hrs. A 37°C en un horno resulto con un crecimiento adecuado para continuar sin ningún problema con el resembrado de las bacterias en cajas petri de 96 pozos.
7. El ensayo realizado por triplicado, como se observa en los resultados de microdilución en caldo, demostró una alta reproducibilidad en las tres



pruebas realizadas para las diferentes cepas en *S. aureus* y *E. coli*, obteniendo tres confirmaciones consistentes en los tres ensayos.

8. Las nanopartículas de CaO demostraron una actividad antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) fueron menores en comparación con otros estudios realizados donde la MIC era de 28 ± 0.10 , 23 ± 0.3 , 18 ± 0.9 , 13 ± 1.6 y 11 ± 0.5 mg/ml, contra agentes como: *P. aeruginosa*, *S. Aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *E. coli*, indicando una alta eficiencia de 95.14% en nuestro proceso realizado.
9. La coloración observada tras las pruebas de la MIC indica un control efectivo de las bacterias, para *S. aureus* ATCC 25923 fue de 6.00 mg/ml y para ATCC BAA977+ fue de 5.33 y para *E. coli* ATCC 8739EA, ATCC 25922 fue de 4.00 y 2.66 mg/ml respectivamente.
10. El proceso completo, desde la síntesis de las nanopartículas hasta la obtención de resultados sobre su actividad antibacteriana, tomó aproximadamente 72 horas por lo que el método de síntesis por precipitación y la microdilución en caldo, son una alternativa a la obtención y evaluación de nanopartículas de CaO, para aplicaciones a micro y gran escala por su alta reproducibilidad.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Álvarez-Láinez, M. L., Martínez-Tejada, H. V., & Isaza, F. J. (2020). Nanotecnología: Fundamentos y aplicaciones. Universidad de Antioquia.
- [2] Poole, C. P., & Owens, F. J. (2022). Introducción a la nanotecnología. Reverte.
- [3] Munawaroh, F., Muharrami, L. K., Triwikantoro, T., & Arifin, Z. (2019). Synthesis and characterization of precipitated CaCO_3 from ankerite prepared by bubbling method. *kne engineering*, 1(2), 98.
- [4] R-Joya, M., Raba, A. M., & Barba-Ortega, J. J. (s. f.). (2016) Synthesis of calcium oxide by means of two different chemical processes.
- [5] Escalante, W. (2021) Óxido de Calcio: Propiedades y aplicaciones. Vital del Ecuador.
- [6] Márquez, D., David H, M., Prado Míguez S., Francisco S., Marcos P. López (2021) Las nanopartículas y sus aplicaciones biomédicas. Universidad de herradura.
- [7] Calcium oxide nanoparticles - nanografi. (s. f.). <https://nanografi.com/nanoparticles/single-metal-oxide-nanoparticles/calcium-oxide-nanoparticles/>
- [8] Biradar, S., Ravichandran, P., Gopikrishnan, R., Goornavar, V., Hall, J., Ramesh, V., Baluchamy, S., Jeffers, R. B., & Ramesh, G. T. (2011). Calcium carbonate nanoparticles: Synthesis, characterization and biocompatibility. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11(8), 6868-6874.
- [9] Makhluf, S., Dror, R., Nitzan, Y., Abramovich, Y., Jelinek, R., & Gedanken, A. (2005). Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MGO and its use as a bactericide. *Advanced functional materials*, 15(10), 1708-1715.
- [10] Sarojini, S., & Jayaram, S. (2021). An impact of antibacterial efficacy of metal oxide nanoparticles: a promise for future. En Springer eBooks (pp. 393-406).
- [11] Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J., & Guillén, R. (2016). Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces



of children with gastroenteritis at the Institute for Social welfare central hospital in 2012. *Pediatría (Asunción. Impresa)*, 43(1), 13-17.

[12] Li, X., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20), 8996-9031.

[13] Trinh, D. N., Nguyễn, T. T. B., & Nguyễn, T. H. (2015). Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology*, 6(4), 045011.

[14] Baek, M., Chung, H., Jin, Y., Lee, J., Kim, T. H., Oh, J., Lee, W., Paek, S., Lee, J. K., Jeong, J., Choy, J., & Choi, S. (2012). Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 3081.

[15] Singh, A., & Amiji, M. M. (2022). Application of nanotechnology in medical diagnosis and imaging. *Current opinion in biotechnology*, 74, 241-246.

[16] Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Emerging applications of nanotechnology in healthcare and medicine. *Molecules*, 28(18), 6624.

[17] Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 39(11), 1348-365.

[18] Gogotsi, Y. (2014). What can nanos do for energy storage. *ACS Nano*, 8(6), 5369-5371.

[19] Chadha, S., & Kale, S. P. (2015). Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in applied microbiology*, 61(3), 238-244.

[20] Naik, T. S. K., Singh, S., Narasimhappa, P., Varshney, R., Singh, J., Khan, N. A., Zahmatkesh, S., Ramamurthy, P. C., Shehata, N., Kiran, G. S., & Sunil, K. (2023). Green and sustainable synthesis of CaO nanoparticles: Its solicitation as a sensor material and electrochemical detection of urea. *Scientific reports*, 13(1).

[21] Henao, C. P. B., Montes, V. H., & Sierra, R. B. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 35(4), 387-402.



[22] Roy, A., & Bhattacharya, J. (2011). Microwave-assisted synthesis and characterization of cao nanoparticles. *International journal of nanoscience*, 10(03), 413-418.

[23] Zanella, R. (2014). Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. *Mundo nano*, 5(1).

[24] Reyes-Blas, H. (2021). Uso de biomateriales funcionalizados con moléculas bioactivas en la ingeniería biomédica.

[25] Krishnamurthy, S., Vaiyapuri, R., Zhang, L., & Chan, J. M. (2015). Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomaterials science*, 3(7), 923-936.

[26] Sela, H., Cohen, H., Elia, P., Zach, R., Karpas, Z., & Zeiri, Y. (2015). Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal of nanobiotechnology*, 13(1).

[27] Haydar, M. S., Ghosh, S., & Mandal, P. (2021). Application of iron oxide nanoparticles as micronutrient fertilizer in mulberry propagation. *Journal of plant growth regulation*, 41(4), 1726-1746.

[28] Wang, Y., Lin, Y., Xu, Y., Yin, Y., Guo, H., & Du, W. (2019). Divergence in response of lettuce (var. ramosa Hort.) to copper oxide nanoparticles/microparticles as potential agricultural fertilizer. *Environmental Pollutants And Bioavailability*, 31(1), 80-84.

[29] A. Bahrami, R. Delshadi, S. M. Jafari, and L. Williams, "Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry," *Trends food sci. technol.*, vol. 94, pp. 20-31, Dec. 2019,

[30] Nikolic, M. V., Vasiljevic, Z., Auger, S., & Vidic, J. (2021). Metal oxide nanoparticles for safe active and intelligent food packaging. *Trends in food science & technology*, 116, 655-668.

[31] Shang, L., Dong, S., & Nienhaus, G. U. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano today*, 6(4), 401-418.



[32] Khine, E. E., Koncz-Horvath, D., Kristaly, F., Ferenczi, T., Karacs, G., Baumli, P., & Kaptay, G. (2022). Synthesis and characterization of calcium oxide nanoparticles for CO₂ capture. *Journal of nanoparticle Research*, 24(7).

[33] Carlos Malbrán. (2012) METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCION. *MIC Testing*, 32(2).

[34] Herrera, M. T., Artunduaga, J. J., Ortiz, C. C., & Torres, R. G. (2017). Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomédica*, 37(1), 11.

[35] March-Rosselló, G. A. (2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English Ed)*, 35(3), 182-188.

[36] Roy, A., Gauri, S. S., Bhattacharya, M., & Bhattacharya, J. (2013). Antimicrobial activity of cao nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(9), 1570-1578.

[37] Kumar, S., Sharma, V., Pradhan, J. K., Sharma, S. K., Singh, P., & Sharma, J. K. (2021). Structural, optical and antibacterial response of cao nanoparticles synthesized via direct precipitation technique. *nano biomedicine and engineering*, 13(2).

[38] Khan, A. U., Hussain, T., Abdullah, N., Khan, M. A., Almostafa, M. M., Younis, N. S., & Yahya, G. (2023). Antibacterial and antibiofilm activity of ficus carica-mediated calcium oxide (CaONPs) phyto-nanoparticles. *Molecules*, 28(14), 5553.

[39] Alcaide, F., Esteban, J., González-Martin, J., & Palacios, J. (2017). Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English Ed)*, 35(8), 527-533.

[40] Mazher, M., Ishtiaq, M., Hamid, B., Haq, S. M., Mazhar, A., Bashir, F., Mazhar, M., Mahmoud, E. A., Casini, R., Alataway, A., Dewidar, A. Z., & Elansary, H. O. (2023). Biosynthesis and characterization of calcium oxide nanoparticles from *Citrullus colocynthis* fruit extracts; Their biocompatibility and bioactivities. *Materials*, 16(7), 2768.



[41] Del Rocío Coutiño, E. M., Lagunes, L. Á., & Helguera, O. A. (2017). Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Educación bioquímica (REB)*, 36(2), 39-54.

[42] Hurtado, R. B., Cortez-Valadez, M., & Acosta, M. F. (2022b). Aplicaciones tecnológicas de las nanopartículas en la medicina e industria. *Epistemus*, 16(33).

[43] Carbajal-De-La-Fuente, A. L., & Yadón, Z. E. (2013). A scientometric evaluation of the chagas disease implementation research programme of the paho and tdr. *plos neglected tropical diseases*, 7(11), e2445.

[44] Salcedo, C. G. L., Jiménez, E. E. G., Portela, C. y. A., & Ariza, J. G. (2018). Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. *Medicina y seguridad del trabajo*, 64(251), 109-118.

[45] Oporto Velasco, L. A. (2016). Optimización del MTT como método de cuantificación de la proliferación celular de esplenocitos murinos. Tesis de especialidad.

[46] López-Badillo, C., Hernández-González, M., Hernández-Centeno, F., Olivas-Armendáriz, I., Rodríguez-González, C., Múzquiz-Ramos, E., López-Cuevas, J., & La Peña, H. L. (2020). Antibacterial activity and in vitro cytotoxicity studies of Ag-doped CaO nanoparticles. *Materials Letters*, 283, 128741.

[47] A., Nivetha, Rakesh S.S. (2024). Synthesis and structural characterization of Ag doped CaO for reduction of 2-Nitrophenol. *Asian research Association*, 115-119.

[48] Liu, T., Zhu, Y., Zhang, X., Zhang, T., Zhang, T., & Li, X. (2010). Synthesis and characterization of calcium hydroxide nanoparticles by hydrogen plasma-metal reaction method. *Materials Letters*, 64(23), 2575-2577.

[49] Mirghiasi, Z., Bakhtiari, F., Darezereshki, E., & Esmailzadeh, E. (2013). Preparation and characterization of CaO nanoparticles from Ca(OH)₂ by direct thermal decomposition method. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 20(1), 113-117.

[50] Victoria L., Juana R. (2011) *Química General*. Material de enseñanza. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. Hibridación de orbitales Atómicos | *Química General*, s. f.



[51] Connor, N. (2023, 18 septiembre). Óxido de calcio | Fórmula, propiedades y aplicación.

[52] Ramirez, P. A. Z., Mendez, C. M. S., Espinoza, F. A. S., Luman, C. J. O., & De Santiago de Chile, U. (2019, 9 septiembre). WO2021046661A1 - Nano partículas de óxido de calcio y nanocomposito polimérico que las comprende, método de obtención a partir de subproductos/descartes alimentarios sólidos naturales ricos en carbonato de calcio y método de preparación de nanocomposito polimérico, y uso como antimicrobiano en películas para envasado de alimentos o recubrimientos de distintas superficies.

[53] Esquivias, a. (2018). Síntesis, caracterización y depósito de nanopartículas de hidróxido de calcio sobre un apósito bactericida, Tesis de maestría, universidad autónoma de nuevo león.

[54] Valencia, G. (s. f.) 2020. Obtención de nanopartículas de zno/cao dopados con urea para su uso como nanofertilizantes. Red regional de semilleros de investigación, xlll.

[55] Martinez, A. (2021). Síntesis de nanopartículas esféricas de oro mediante quitosano de tres pesos moleculares para la evaluación de su estabilidad temporal Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

[56] Ramirez, P., & Silva, C. (2020). Nano partículas de óxido de calcio y nanocomposito polimérico que las comprende, método de obtención a partir de subproductos/descartes alimentarios sólidos naturales ricos en carbonato de calcio y método de preparación de nanocomposito polimérico, y uso como antimicrobiano en películas para envasado de alimentos o recubrimientos de distintas superficies. *Ompi*.

[57] Rosales, C. (2008). Efecto de la dispersion de nanopartículas de plata en una matriz polimerica sobre sus características fisicomecanicas y antimicrobianas especialización en química aplicada, centro de investigación en química aplicada.