



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ELIMINACIÓN DE BACTERIAS EN SUPERFICIES DE ALIMENTOS A PARTIR DE MATERIALES HÍBRIDOS A BASE DE HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES ZnAl y MgAl, CON FÁRMACOS DE ESTREPTOMICINA Y AMOXICILINA

ALUMNO:

I.B.Q. ITAN HOMERO RUIZ HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D. EN C. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ALEJANDRA SANTANA CRUZ

Morelia, Michoacán, octubre del 2021.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi esposa Dariana Benitez por todo el apoyo otorgado durante el transcurso del posgrado, a mi familia por los consejos y el apoyo brindado para obtener mi meta y sueño.

Agradezco al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por servir como intermediario, entre los ciudadanos mexicanos y yo, para poder brindar me el apoyo económico durante la maestría

Agradezco a el D. en C. Roberto Guerra González (director de tesis) asesor del proyecto: “Eliminación de bacterias en superficies de alimentos a partir de materiales híbridos a base de hidróxidos dobles laminares ZnAl y MgAl, con fármacos de estreptomicina y amoxicilina”, por su apoyo y las facilidades dadas.

Agradezco a la M. en C. Alejandra Santana Cruz (codirector) y al D. en C Jorge Flores Moreno pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) campus Azcapotzalco, por su enorme apoyo y sabios concejos para concretar este proyecto de investigación y por la confianza que me fue brindada para recibir parte de su material para realizar este proyecto.

Agradezco a la Dra. Maricela Villicaña, al Dr. Rafael Huirache y al M. en C. Gabriel Martínez Herrera por formar parte de mi comité sinodal y por el tiempo brindado en la revisión de la tesis, así como sus concejos, apoyo y enorme sabiduría.

Agradezco a el D. en C. Guillermo César Mondragón Rodríguez por enseñarme a usar el equipo y permitirme analizar las muestras en el microscopio electrónico de barrido en el Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI), sede Querétaro.

Agradezco a José Alejandro Onchi Reséndiz por permitirnos realizar el análisis de FT-IR-ATR dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán por entregarnos las cepas de *E. coli*, *S. sonnei* y *S. typhi*.



Agradezco a I.B.Q. Miriam Aguilar Pineda y a I.B.Q Misael Bazán y al D. en C. Eliel Rafael Romero García por sus sabios consejos que me fueron brindados y su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Hidróxidos Dobles Laminares (HDL).....	3
2.2 Moléculas biológicamente activas.....	4
2.3 Materiales Híbridos	5
2.4 Bacterias.....	8
2.4.1 Taxonomía de microorganismos.....	8
2.4.2 Bacterias Gram-negativas	8
2.4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	9
2.4.2.2 <i>Salmonella typhi</i>	9
2.4.4.3 <i>Shigella sonnei</i>	10
3. Antecedentes	11
3.1 HDL con distintas MBA	11
3.2 MBA con distintos HDL	11
4. Justificación.....	13
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivos	13
6.1 Objetivo general.....	13
6.2 Objetivos específicos	13
7. Metodología.....	14
7.1 Síntesis de HDL	14
7.1.1 Síntesis por el método de coprecipitación	14
7.1.2 Síntesis por el método de urea	14
7.2 Síntesis de materiales híbridos	15



7.3 Caracterizaciones de los solidos.....	15
7.3.1 Difracción de rayos X.....	15
7.3.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)...	16
7.3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	16
7.4 Evaluación biológica	16
7.4.1 Adquisición de cepas bacterianas	16
7.4.2 Estándar de McFarland.....	16
7.4.3 Referencias de los antibióticos	16
7.5 Evaluación de la actividad antibacterial de los materiales híbridos.....	17
7.5.1 Preparación de muestras microbiológicas	17
7.6 Elaboración del bioplástico	18
7.6.1 Evaluación biológica del bioplástico	18
8. Análisis y discusión de resultados	19
8.1 Síntesis de HDL ZnAl.....	19
8.1.1 ZnAl-NO ₃	19
8.1.2 ZnAl-Cl.....	21
8.2 Síntesis de HDL MgAl.....	23
8.2.1 Síntesis de HDL MgAl-Cl	23
8.3 Moléculas biológicamente activas.....	25
8.3.1 AMX	25
8.3.2 EM	26
8.4 Materiales híbridos de ZnAl	28
8.4.1 (I)-d-ZnAl-NO ₃ -AMX-NaOH.....	28
8.4.2 (I)-ZnAl-NO ₃ -EM-NaOH	31



8.4.3 (I)-ZnAl-Cl-EM-NaOH.....	36
8.4.4 (R)-ZnAl-AMX-KOH	40
8.4.5 (R)-ZnAl-AMX-NaOH	41
8.4.6 (R)-ZnAl-EM-NaOH.....	44
8.5 Material híbrido con MgAl	46
8.5.1 (I)-MgAl-Cl-AMX-KOH.....	46
8.5.2 (I)-MgAl-Cl-EM-NaOH.....	47
8.5.3 (R)MgAl-EMS-NaOH.....	50
8.5.4 (CdR)-MgAl-AMX.....	51
8.6 Resumen de materiales híbridos	52
8.7 Evaluación antibacterial	53
8.7.1 Fármacos en estado puro	53
8.7.2 Curva de inhibición bacteriana.....	54
8.7.2.1 (I)-d-ZnAlNO ₃ -AMX-NaOH contra <i>S. typhi</i>	55
8.7.2.2 (I)-ZnAl-NO ₃ -EM-NaOH contra <i>E. coli</i>	56
8.7.2.3 (I)-ZnAlNO ₃ -AMX-NaOH contra <i>S. sonnei</i>	59
8.7.2.4 (I)-ZnAl-NO ₃ -EM-NaOH contra <i>S. sonnei</i>	60
8.7.2.5 (I)-ZnAlNO ₃ -EM-NaOH contra <i>S. typhi</i>	63
8.7.2.6 (I)-ZnAl-Cl-EM-NaOH contra <i>E. coli</i>	65
8.7.2.7 (R)-ZnAl-EM-NaOH contra <i>E. coli</i>	68
8.7.2.8 MgAl-Cl-EM	72
8.7.3 Elaboración de bioplástico	75
8.7.3.1 Evaluación biológica del biomaterial sobre la Zanahoria.	75
9. Conclusiones.....	77



10. Referencias	78
-----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del hidróxido laminar doble (Benicio L., 2011).	4
Figura 2. Difractograma de ZnAl-NO_3	20
Figura 3. FT-IR-ATR de ZnAl-NO_3	20
Figura 4. Difractograma de ZnAl-Cl	21
Figura 5. Espectro IR de ZnAl-CO_3	22
Figura 6. Difractograma de MgAl_2Cl	23
Figura 7. Espectro FTIR de MgAl-CO_3	24
Figura 8. Espectro FTIR de AMX.....	26
Figura 9. Estructura química de AMX.....	26
Figura 10. Espectro FT-IR-ATR de EM	27
Figura 11. Estructura química de la estreptomicina sulfatada	28
Figura 12. DRX de d-ZANAN.....	30
Figura 13. Micrografía del material híbrido d- ZnAl-AMX-NaOH	31
Figura 14. ZnAlNO_3 -Estreptomicina.....	32
Figura 15. Análisis de DRX del material ZnAlNO_3 -EM.....	33
Figura 16. Espectro FTIR de ZnAlNO_3 con EM-S y sintetizado con NaOH.	34
Figura 17. MEB de ZnAl-NO_3 -EM.....	35
Figura 18. Lamina del material analizada con el Software ImageJ, del material ZnAlNO_3 -EMS.....	36
Figura 19. DRX del material híbrido ZnAlCl-EM-S-NaOH	37
Figura 20. FT-IR-ATR de ZnAl-Cl-EM	38
Figura 21. Microscopia electronica de barrido del mat. Híbrido ZnAlCl-EM	39
Figura 22. Estructura del material dibujada en 3D con el Software ImageJ.	40
Figura 23. Espectro IR de (R)- ZnAl-AMX-KOH	41
Figura 24. Difractograma del material (R)- ZnAl-AMX sintetizado con NaOH.	42
Figura 25. Micrografía del material ZnAl-AMX-NaOH	43



Figura 26. Modelado 3D usando ImageJ, del material R-ZnAl-AMX-NaOH, donde A), es parte de la micrografía mostrada anteriormente y B), es el modelado 3D, las líneas representarían el acomodo de las láminas.....	44
Figura 27. DRX de (R)-ZnAl-EM-NaOH.....	45
Figura 28. Espectro de IR de (R)-ZnAl-EM-NaOH.....	46
Figura 29. Espectro FTIR-(I)-MgAl-AMX-KOH.....	47
Figura 30. DRX de MgAlCl con EM-S.....	48
Figura 31. FTIR de MgAl ₂ Cl-EMS por intercambio iónico.....	49
Figura 32. Difractograma de (R)-MgAl-EM	50
Figura 33. Espectro del material (R)-MgAl-EM-NaOH.....	51
Figura 34. DRX de MgAl-AMX-NaOH.....	52
Figura 35. Cinética de inhibición de <i>E. coli</i> usando (I)-ZnAlNO ₃ -EM	56
Figura 36. Inhibición de <i>E. coli</i> por zona usando ZnAlNO ₃ -EM.....	57
Figura 37. <i>S. typhi</i> en contacto con ZnAl-NO ₃ -AMX después de 24 h parece haber inhibición.	60
Figura 38. Cinética de inhibición de <i>S. sonnei</i> usando ZnAl-NO ₃ -EMS.....	61
Figura 39. Mostrando inhibición en contra de <i>S. typhi</i> , se agregó un ligero filtro para observar mejor los halos de inhibición.	63
Figura 40. Cinética de inhibición usando ZnAlNO ₃ -EM	65
Figura 41. Inhibición solida usando ZnAlCl-EM contra <i>E. coli</i>	66
Figura 42. Cinética de inhibición usando (I)-ZnAlCl-EM con <i>E. coli</i>	68
Figura 43. Cinética de inhibición de ZnAl-EMS por el método de reconstrucción ...	69
Figura 44. Mostrando una colonia amorfa con liberación de pequeñas células en el agar MacConkey. La foto fue tomada a color pero se le puso un filtro de blanco y negro para que se observara mejor dicho fenómeno.	71
Figura 45. Posible apoptosis o necrosis y liberación de líquido celular en el medio junto con miles o millones de células de <i>E. coli</i> , vista en el microscopio invertido a 10x.	72
Figura 46. Cinética de inhibición de <i>E. coli</i> usando MgAlCl- EMS-NaOH.....	73
Figura 47. Estándar de calibración de estreptomycin.....	89



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. HDL ZnAl y MgAl con diferentes moléculas biológicamente activas	11
Tabla 2. Diferentes métodos de síntesis para la elaboración de HDL	12
Tabla 3. Análisis estructural de los HDL's ZnAlNO ₃ y ZnAlCl	23
Tabla 4. Análisis estructural de MgAl-Cl.	24
Tabla 5. Parámetros cristalográficos de d-ZnAlNO ₃	30
Tabla 6. Parámetros cristalográficos de ZnAl-NO ₃ -EM	33
Tabla 7. Análisis elemental del material híbrido ZnAlNO ₃ -EMS	35
Tabla 8. Parámetros cristalográficos de del material híbrido ZnAl-Cl-EM-NaOH	37
Tabla 9. Análisis elemental del material híbrido ZnAlCl-EM.....	39
Tabla 10. Parámetros cristalográficos del material ZnAl sintetizado por el método de reconstrucción y NaOH.	43
Tabla 11. EDS de (R)-ZnAl-AMX	44
Tabla 12. Parámetros cristalográficos de MgAl ₂ Cl-EM-S con NaOH.	48
Tabla 13. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de Amoxicilina con distintas bacterias.....	54
Tabla 14. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas con Estreptomicina.	54
Tabla 15. Tabla de cinética de la inhibición de <i>S. typhi</i>	55
Tabla 16. Triplicado de cinética de inhibición de <i>E. coli</i> usando ZnAl-NO ₃ -EM en AMC	58
Tabla 17. Comparativa de enfrentamiento con distintas cantidades usando ZnAl-NO ₃ -AMX con NaOH.....	59
Tabla 18. Cinética de inhibición usando ZnAlNO ₃ -EMS-NaOH con distintas cantidades.....	62
Tabla 19. Cinética de inhibición de <i>S. typhi</i> usando ZnAl-NO ₃ con EM	64
Tabla 20. Triplicado de cinética de inhibición usando ZnAl-Cl-EM	67
Tabla 21. Triplicado de cinética de (R)-ZnAl-EM-NaOH	70
Tabla 22. Comparativa de la cinética de inhibición de <i>E. coli</i> usando MgAl ₂ Cl-EMS	74
Tabla 23. Comparativa del bioplástico en la superficie de la zanahoria.....	76



RESUMEN

En este trabajo se estudió la preparación de distintos materiales híbridos orgánico/inorgánico y su evaluación como bactericidas de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhi*. Los materiales híbridos son la asociación de un hidróxido doble laminar inorgánico (HDL), con moléculas orgánicas con actividad antibacterial, hospedadas en los sólidos. Se estudió diferentes materiales híbridos a partir de HDL (MgAl y ZnAl) conteniendo especies orgánicas provenientes de diferentes moléculas biológicamente activas que inhibieron el crecimiento de bacterias Gram negativas. La intercalación de los distintos aniones se llevó a cabo por reconstrucción de los HDL. Las caracterizaciones de los materiales se llevaron a cabo por difracción de rayos X (DRX), espectroscopias de IR por transformada de Fourier (FT-IR-ATR) y microscopia electrónica de barrido (MEB). La evaluación de la actividad antibacterial de estos materiales se fue en cultivos de cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei* usando agar MacConkey.

Palabras clave: material híbrido, estreptomicina, amoxicilina, HDL, gram negativa.



ABSTRACT

In this work, the preparation of different organic/inorganic hybrid materials and their evaluation as bactericides of *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhi* was studied. The hybrid materials are the association of an inorganic layered double hydroxide (LDH) with organic molecules with antibacterial activity, hosted in solids. Different hybrid materials were studied from LDH (MgAl and ZnAl) containing organic species from different biologically active molecules that inhibited the growth of Gram-negative bacteria. The intercalation of the different anions was carried out by reconstruction of the LDH. Characterizations of the materials were carried out by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform IR spectroscopy (FT-IR-ATR), and scanning electron microscopy (SEM). The evaluation of the antibacterial activity of these materials was performed on cultures of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei* strains using MacConkey agar.



1. Introducción

En la actualidad existe una demanda muy activa para lograr avances en la liberación controlada de moléculas biológicas o químicas y que son sensibles al ambiente, la mayoría de los nuevos fármacos que están siendo desarrollados y comercializados por las compañías farmacéuticas son de carácter molecular ([Curr Opin., 2005](#)). La inmovilización de moléculas con actividad biológica dentro de matrices inorgánicas laminares biocompatibles (aquellos materiales que se forman para conseguir la combinación de propiedades ([Donald R. Askeland., 2007](#))) permite su aislamiento del ambiente mejorando a la vez su estabilidad y almacenamiento a largo plazo de esta forma, la estabilización de moléculas activas en materiales inorgánicos biocompatibles constituye una ruta interesante para la preparación de materiales híbridos que posean tanto las ventajas de las propiedades del material inorgánico receptor como las del material orgánico huésped, en un mismo material. Aparte del problema del almacenamiento y estabilidad de las especies activas se puede encontrar uno más ligado al proceso de liberación de las mismas. Un sistema de liberación ineficiente puede resultar en altas concentraciones del fármaco causando posibles efectos secundarios en el lugar donde se pretenda actuar. Este problema puede encontrar solución si se diseñan nuevos sistemas de administración y liberación controlada de los principios activos. Estos sistemas deberán proporcionar perfiles cinéticos en los cuales la concentración de la molécula permanezca en los niveles de concentración adecuados y durante un periodo de tiempo adecuado ([Morales-Irigoyen et al., 2015](#)).

La descomposición de los alimentos naturales provenientes de las bacterias que se generan en el recubrimiento de los alimentos, es un tema de gran interés debido a dos puntos importantes: la primera, la vida útil de los alimentos disminuye y por lo tanto las pérdidas económicas son muy elevadas, y la segunda, existe el riesgo de una contaminación en serie con las personas que lo consumen. Una forma de combatir estas problemáticas es el uso de fertilizantes, sin embargo, el uso inadecuado llevaría consigo, por un lado, garantizar la vida útil de manera que sería fácil de consumir, pero, por otro lado, traería consigo la contaminación en sus consumidores. Actualmente



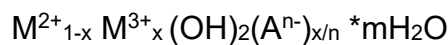
existen pocas formas de combatir tal problemática, una de ellas sería el uso de materiales híbridos biocompatibles que contengan poca cantidad de antibacterianos (pero que garantice la eliminación total de las bacterias presentes), y que permitan a la vez que su uso sea prolongado y eficiente para evitar pérdidas económicas e infecciones en los consumidores: en pocas palabras un material que pueda liberar y controlar su actividad en el sitio adecuado.



2. Marco Teórico

2.1 Hidróxidos Dobles Laminares (HDL)

Los hidróxidos dobles laminares son materiales tipo hidrotalcita, que pertenecen a una gran clase de arcillas aniónicas, debido a sus interesantes características como lo son: 1) gran área superficial 2) la habilidad de formar mezclas homogéneas de óxidos con tamaño pequeño y estables a tratamientos térmicos y 3) efecto memoria del material, es decir que permite la reconstrucción bajo las mismas condiciones de síntesis de la estructura original, cuando es sometido a un tratamiento térmico y puesto en soluciones acuosas que contenga diferentes aniones ([S. Miyata., 1978](#)). Los HDL se pueden sintetizar como fase cristalográfica pura bajo condiciones controladas a temperatura ambiente. Este tipo de materiales son considerados actualmente como materiales nanoestructurados. Su fórmula general:



donde M^{2+} y M^{3+} son los cationes divalentes y trivalentes respectivamente (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Al^{+3} y Fe^{+3}), cada uno posee una estructura octaédrica rodeado por 6 iones OH^- como se aprecia en la Figura 1, m representa el contenido de agua, n^- representa la carga del anión y x representa el grado sustitución del metal divalente. Los metales en esta estructura tienen coordinación con los grupos OH^- , en la que las láminas están cargadas positivamente debido al grado de sustitución del metal divalente por el trivalente ([Sharma et al., 2011](#); [Seftel et al., 2013](#))

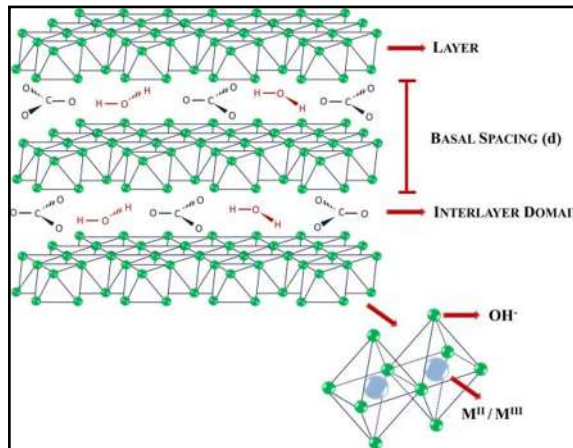


Figura 1. Estructura del hidróxido laminar doble (Benicio L., 2011).

2.2 Moléculas biológicamente activas

Las moléculas biológicamente activas o fármacos como comúnmente son denominados, son una serie de compuestos químicos que ayudan a cualquier organismo vivo a curar o sanar alguna enfermedad causada por microorganismos o macroorganismos. Actualmente se emplean diversos fármacos para el tratamiento contra bacterias Gram negativas (G-) como *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei* como lo es la amoxicilina, estreptomicina, cloxacilina, azitromicina, ácido nalidixico, pipemidico, por mencionar algunos. La acción farmacológica se ve afectada por la cantidad de fármaco que alcanza el receptor y el grado de atracción (afinidad) entre el fármaco y su receptor en la superficie celular. Una vez fijados a su receptor, la capacidad de los fármacos varía en cuanto a producir un efecto (actividad intrínseca). La afinidad de un fármaco y la actividad intrínseca están determinadas por su estructura química.

La amoxicilina es un fármaco derivado de la penicilina, posee un anillo β -lactámico, que inhibe la biosíntesis de peptidoglucanos para la formación de la pared celular al unirse al sustrato peptídico de la transpeptidasa, no obstante, la bacteria puede producir enzimas denominadas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico, volviendo inútil al fármaco (Biología Celular y Molecular Karp, 2019). Los que activan los receptores (agonistas) deben tener ambas propiedades: gran afinidad y actividad



intrínseca. Deben fijarse eficazmente a sus receptores, y el fármaco, una vez unido a su receptor (complejo fármaco-receptor), debe ser capaz de producir un efecto en la zona diana. Por el contrario, los fármacos que bloquean los receptores (antagonistas) deben fijarse a estos de forma eficaz, pero tener escasa o ninguna actividad intrínseca, ya que su función es la de impedir la interacción de un agonista con sus receptores ([MSD consultado 1 de octubre 2020](#)).

En el caso de la estreptomicina, es un aminoglúcido que tiene como objetivo la traslación en los ribosomas bacterianos, es decir, evitar la producción de proteínas integrales y estructurales de la bacteria dañando la subunidad 30s, inhibiendo la función principal del mRNA en el proceso ([Luzzatto et al., 1968](#)) En años recientes, estos fármacos han sido desactivados por los diferentes mecanismos de resistencia, como lo son las fosforilaciones, acetilaciones y nucleotidaciones.

2.3 Materiales Híbridos

En los últimos años la síntesis de nuevos materiales ha recibido una atención considerable; en particular los nanocompuestos. Los portadores de ADN, de péptidos y proteínas; en general se trata normalmente de productos bioactivos. Dentro de los nanocompuestos de interés pueden considerarse a los coloides, geles, copolímeros, medios porosos inorgánicos entre los que destacan los materiales laminares de la familia de las arcillas. De estos últimos existe en gran variedad y pueden ofrecer características fisicoquímicas bien definidas como el área superficial específica, la porosidad y, tanto el ordenamiento laminar, como el espacio interlaminar. Gracias a este último, estos materiales tienen la capacidad de actuar como matrices inorgánicas receptoras de moléculas orgánicas de interés biológico y dar lugar a la formación de interesantes materiales híbridos, en ocasiones de orden nanométrico ([Bernardo, M. P. et al., 2018](#)). Dentro de la variedad de matrices inorgánicas biocompatibles podemos encontrar a los hidróxidos dobles laminares (HDL) comúnmente llamados materiales tipo hidrotalcita, que son materiales baratos, fáciles de sintetizar y poseen una textura nano-organizada. Estos han sido estudiados principalmente en cuestiones biomédicas porque ofrecen una lenta y adecuada liberación ([Jung et al., 2010](#)).



En la literatura existen distintos métodos mediante los cuales se puede llevar a cabo la intercalación de distintos aniones en la región interlaminar.

El primer método se basa en la propiedad de efecto memoria, el cual está basado en un proceso de destrucción/reconstrucción de la estructura laminar del HDL provocado por un tratamiento térmico durante el cual ocurren los siguientes procesos: a temperaturas menores a 150 °C se observa una pérdida de moléculas de agua adsorbidas físicamente sin que exista modificación de la estructura laminar. Entre 300 y 500 °C tiene lugar la deshidroxilación de las láminas de hidróxido y la pérdida de los aniones interlaminares. Esto último trae consigo el colapso del arreglo laminar, provocando la aparición de una solución sólida de Mg (Al)O llamada óxido mixto si la temperatura no excede los 600 °C. Si este óxido mixto se pone en contacto con una solución que contenga aniones, éste recobrará su estructura laminar original y en la región interlaminar residirán los aniones contenidos en la solución, reportado por diferentes investigadores Choy y Peng ([Choy et al., 2007](#); [Peng et al., 2018](#)).

El segundo método reportado por S. Miyata ([S. Miyata., 1983](#)). El intercambio iónico, es el método más común para modificar los aniones interlaminares en las estructuras de los HDL, con aniones interlaminares diferentes al presente en la sal utilizada en la síntesis. Las reacciones de intercambio iónico son sencillas y consisten en poner en contacto al HDL en una solución concentrada del nuevo anión. Para hacer más exitoso el proceso, es necesario que el anión a intercalar en la región interlaminar presente una mayor afinidad (en términos de cargas electrostáticas) hacia las láminas metálicas que a los aniones de las sales metálicas precursores, ya que generan competencia y son fuente de contaminación si se incorporan a la región interlaminar disminuyendo considerablemente la capacidad de albergar nuevos aniones. Miyata reporta una escala de afinidad de los aniones monovalentes: $\text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ y para aniones divalentes: $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$. Por esta razón, es común utilizar cloruros y nitratos, ya que presentan poca atracción hacia las láminas y facilitan el intercambio, especialmente de moléculas o iones orgánicos. Ambas técnicas (coprecipitación e intercambio iónico) son muy sencillas y presentan gran eficiencia en la incorporación de



especies interlaminares. La capacidad de intercambio iónico es afectada por las especies iónicas en la interfase, la carga laminar y el radio catiónico. Sin embargo, no se ha encontrado dependencia en la composición de las especies iónicas, cristalinidad, morfología o tamaño de partícula sobre esta propiedad. Un problema común en la síntesis de HDL por cualquier método, es la contaminación con el ion carbonato, aun cuando no se utilicen sales metálicas conteniendo dicho anión. Este ion proviene de la disolución del CO_2 gaseoso encontrado naturalmente en la atmósfera, el cual se oxida y produce CO_3^{2-} . El carbonato genera una gran competencia con los demás aniones o moléculas en la región interlaminar, por ello es común la utilización de agua descarbonatada, así como la realización de las síntesis con la menor exposición al ambiente, llegando a ser útiles los sistemas cerrados con atmósferas inertes.

El tercer método es por coprecipitación a baja saturación. Los HDL son preparados por coprecipitación mediante adición de pH variado o constante dependiendo si es de alta o baja saturación. Consiste en precipitar 2 cationes metálicos en presencia de aniones. Se presenta en tres pasos:

1. Mezclado los cationes con la base alcalina.
2. Sucede una nucleación homogénea (por sobresaturación)
3. “Plantar una semilla” de un cristal para hacer crecer el HDL.

No obstante, visto desde un punto macroscópico es imposible distinguir estos pasos individuales, especialmente a baja sobresaturación. Como consecuencias los HDL pueden tener defectos pues varía el tamaño de partícula y su distribución puede ser no uniforme. El pH se controla añadiendo lentamente a la disolución, que contiene cationes de M^{2+} y M^{3+} una segunda solución es añadida, la cual contiene una sustancia básica (KOH , NaOH , NaHCO_3), la cual es necesaria para mantener el pH constante y posteriormente se adiciona una tercera con los aniones que actuarán en la zona interlaminar. El método más usado es el de coprecipitación a baja sobresaturación. Las condiciones normales son las siguientes pH 7 a 10, entre temperaturas 333 K y 353 K, baja concentración de los reactivos y velocidad lenta de adición de las dos disoluciones (Miyata S., 1983).



2.4 Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas, que a diferencia de las células eucariotas, no poseen núcleo definido, solo poseen un cromosoma formado por ADN (ácido desoxirribonucleico) circular en doble helicoide, sin proteínas asociadas, carecen de organelos complejos como lo son el aparato de Golgi y mitocondrias.

Las partes que componen principalmente a las bacterias G- son: pared celular compuesta por una membrana externa, periplasma y membrana interna y en el caso de G+, es una gruesa capa de peptidoglucano.

2.4.1 Taxonomía de microorganismos

La taxonomía de los microorganismos comprende tres dominios denominados:

- Bacteria, son procariotas unicelulares cuya pared posee entre 10 % Peptidoglucano (PG) hasta un 90 % de PG.
- Archea, son procariotas unicelulares cuya pared está compuesta de pseudopeptidoglucano, glucoproteínas y polisacáridos.
- Eukarya, son procariotas unicelulares cuya pared celular está compuesta de carbohidratos simples o complejos (Celulosa, Quitina, etc.).

Diversas bacterias poseen una morfología esférica u ovoide (cocos), una de forma cilíndrica (bacilos) y algunas otras presentan formas espirales (esperilos). Las células de las bacterias se unen en grupos tras la división celular y forman cadenas largas, como *Streptococos*, las que forman pequeños racimos similares al de las uvas se denominan, *Staphylococcus*. Por otra parte, algunas bacterias pueden presentar formas cilíndricas, como los bacilos gruesos, bacilos finos, bacilos cortos y bacilos largos.

2.4.2 Bacterias Gram-negativas

La distinción de las bacterias se basa en la reacción a la tinción de Gram, aquellas cuyo PG sea menor del 10 y 20 % son G-, debido a que la reacción química del colorante no se fija sobre la pared celular. Caso contrario en las Gram (+) donde el porcentaje de PG es más alto (aproximadamente un 90% de PG) (Lucana Nina y Huanca Reyna, 2014). La membrana citoplasmática es estructuralmente débil y confiere poca



protección frente a la lisis osmótica, sin embargo, su función principal es la permeabilidad selectiva. La composición de la membrana es una estructura citoplasmática compuesta de una bicapa lipídica, que de manera natural se encuentran en solución acuosa. Los ácidos grasos se colocan en orientación hacia el interior, unos frente a otros formando un ambiente hidrófobo.

2.4.2.1 *Escherichia coli*

Es una bacteria proveniente de la familia de las *enterobacteriaceae*, del género *Escherichia*. Es un bacilo G-. *E. coli* puede causar algunas enfermedades en los humanos entre las que destacan la diarrea y la disentería ya que suele colonizar el gastro intestino humano, siendo los niños los más afectados, así mismo posee una clasificación de seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y por último *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) todas causantes de diarrea ([Cortes-Ortiz et al., 2002](#)) poseen un tamaño de entre 5 a 10 nm con una estructura tubular. Diversos estudios demuestran que las concentraciones de los antibióticos liberadas en ambientes acuáticos fomentan la resistencia bacteriana. En México han ido en incremento las resistencias a los antibióticos ([Ponce de León, S. et al., 2018](#)).

2.4.2.2 *Salmonella typhi*

Estas enterobacterias son Gram (-), es decir que no retienen el color de cristal violeta al hacer una tinción Gram, porque el alcohol-cetona destruye los fosfolípidos de su capa externa, también su tamaño es menor que las Gram (+). Alrededor de 3-5 nm en contraste con 15-20 nm respectivamente ([Ramírez-Gama et al., 2015](#)). *S. typhi* es una bacteria que se encuentran presente en algunos medios nutritivos, principalmente provenientes de las aguas de riego, así mismo es responsable de enfermedades sistémicas graves como la fiebre tifoidea. Estas bacterias pueden eliminarse por distintos antibacteriales cuyas eficiencias dependen de sus propiedades fisicoquímicas como las describe Chopra ([Chopra., 2007](#)). Distintas bacterias G-, pueden estar



presenten en el recubrimiento de los alimentos naturales debido a la contaminación del aire y agua, que se encuentran presentes en el crecimiento de éstas.

2.4.4.3 *Shigella sonnei*

Shigella spp. es una bacteria G- en forma de bacilos inmóviles, perteneciente a la familia *enterobacteriaceae*, es anaerobia facultativa, pero no presenta esporulación y fermenta glucosa sin producción de gas. Dentro del género *Shigella*, hay 4 tipos, *S. Sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae* siendo *S. sonnei* la más común en Estados Unidos y México ([American Academy of Pediatrics., 2012](#)). Son bacterias altamente resistentes a antibióticos de amplio espectro debido a que constantemente mutan provocando una liberación descontrolada de enzimas modificadores de antibióticos, debido a la permeabilidad celular que posee ([Taneja, N. y Mewara, A. 2016](#)) Por otra parte se ha encontrado de que las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) ha ido en aumento debido a la pérdida de la porina (una proteína estructural que permite el paso de moléculas de mayor tamaño), lo que ocasiona que se requieran mayor cantidad de fármaco a utilizar ([Ranjbar R. y Frahani, A. 2019](#)).



3. Antecedentes

3.1 HDL con distintas MBA

En los últimos años se han sintetizado distintos materiales híbridos a base de hidróxidos dobles laminares que han mostrado estabilidad y liberación controlada de distintas moléculas biológicamente activas. A continuación en la Tabla 1. HDL ZnAl y MgAl con diferentes moléculas biológicamente activas, se muestran algunos trabajos realizados en los últimos años

Tabla 1. HDL ZnAl y MgAl con diferentes moléculas biológicamente activas

Hidróxido Doble Laminar	Molécula biológicamente activa	Año / Referencia
ZnAl	Ácido cinámico	2019 / Intercalations and characterization of zinc/aluminium layered double hydroxide-cinnamic acid (Nurain et al., 2019).
ZnAl	Cefadroxil	2018 / Controlled release of organic–inorganic nanohybrid: Cefadroxil intercalated Zn–Al-Layered double hydroxide (Khan S.B et al., 2018).
ZnAl	Ácido DL-mandélico	2018 / DL-mandelic acid intercalated Zn-Al layered double hydroxide: A novel antimicrobial layered material (Tang L. P et al., 2018).
MgAl	Ibuprofeno	2017 / Structure and analgesic properties of layered double hydroxides intercalated with low amounts of ibuprofen (Sousa R., et al 2017).
MgAl	Metronidazol	2017 / Adsorption performance of magnesium/aluminum layered double hydroxide nanoparticles for metronidazole from aqueous solution (Sepehr, M. N., et al 2017).

3.2 MBA con distintos HDL

Así mismo en la Tabla 2. Diferentes métodos de síntesis para la elaboración de HDL, se observan las diferencias en síntesis HDL, donde ([Jianquianj et al., 2013](#)) propuso el método de síntesis de urea mostrando los efectos de los aniones CO_3 y NO_3 ,



por otra parte (Yasei et al., 2019) confirma que la presencia de grupos NO_3 dentro de la región interlaminar permite ingresar una mayor cantidad de fármaco previamente desprotonado, para lo cual es necesario un agente alcalino como lo es el NaOH .

Tabla 2. Diferentes métodos de síntesis para la elaboración de HDL

MBA	HDL	Método de síntesis	Conclusiones y referencia
-	ZnAl-CO_3	Hidrolisis de urea	El material es mucho más homogéneo que el método de síntesis por coprecipitación. La relación molar para preparar HDL de forma óptima $\text{Zn/Al} = 2$ (Jianquianj L Song J; et. al 2013).
Simvastatina	ZnAl-NO_3 - (CO_3)	Coprecipitación e intercalación iónica	El HDL- NO_3 revelo que es posible admitir una mayor cantidad de fármaco que usando un anión CO_3 , ya que muestra tener un enlace más fuerte. La síntesis por intercambio iónico es más efectiva para la intercalación de fármacos y su liberación (Yasaei M, Khakbiz M, Ghasemi E. 2019).
Etanol 10%; Ácido Acético 3%; Aceite vegetal	HDL-p-hidroxibenzoato	Coprecipitación	Todos los HDL mostraron ser eficientes al formar una barrera de O_2 ; Resistencia térmica de 330°C y para el HDL-silicato de 405°C dura solo 10 días activo (Gorrsai G. y Sorrentino A. 2019).
Ibuprofeno	Pectina-quitosano MgAl	Coprecipitación	Estable al liberar la MBA dentro del organismo al estar sometido en liquido gastrointestinal puesto que los pH varían (Vijayamma R., et al 2020).
Carboxilato pleurítico	Pectina/HDL-Silicato 4% glicerol	Coprecipitación	Las películas conteniendo de 5% a 23.5% de HDL pueden reducir considerablemente el O_2 (aumentan barrera de O_2). Solamente dura activo 2 semanas (Gorrsai G. y Sorrentino A. 2020).



4. Justificación

En la actualidad existen varias problemáticas causadas por la contaminación de agua y aire, de tal forma que trabajar en combatir éstas es de gran interés. Una problemática específica es la contaminación que tienen los alimentos por distintas bacterias, las cuales puede ser combatidas por materiales novedosos que contemplen la administración y liberación controlada de moléculas biológicamente activas o fármacos, sin causar efectos secundarios. Por esta razón, es necesario trabajar en el estudio y aplicación de materiales que puedan subsanar tal problemática.

5. Hipótesis

El uso de materiales híbridos a base de HDL (MgAl y ZnAl) y moléculas biológicamente activas (amoxicilina y estreptomicina), permitirán combatir la problemática específica de la contaminación superficial que tienen las zanahorias, por distintas bacterias como *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Sintetizar materiales híbridos biocompatibles a partir de hidróxidos dobles laminares de ZnAl y MgAl con distintas moléculas con actividad antibacterial

6.2 Objetivos específicos

- Sintetizar los hidróxidos dobles laminares MgAl y ZnAl, de relación molar $M^{2+}/M^{+3} = 2$, por el método de coprecipitación de sales metálicas a baja sobresaturación y método de urea respectivamente.
- Sintetizar materiales híbridos a base de los óxidos de ZnAl y MgAl con distintas moléculas biológicamente activas.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los HDL y materiales híbridos mediante difracción de rayos-X, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, análisis termogravimétrico y microscopía electrónica de barrido.
- Caracterizar la interacción vehículo-bacteria en los materiales híbridos.



- Evaluar la concentración mínima bactericida y mínima inhibitoria de *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*.
- Sintetizar bioplásticos para la incorporación de los materiales híbridos (Biomateriales)
- Evaluar la inhibición bacteriana con los biomateriales en recubrimientos de la zanahoria.

7. Metodología

7.1 Síntesis de HDL

7.1.1 Síntesis por el método de coprecipitación

El hidróxido doble laminar de MgAl fue sintetizado por el método de coprecipitación a baja sobresaturación de sales metálicas reportado en la literatura ([Miyata S., 1975](#)). De manera general, una solución de las sales metálicas (nitratos de Mg y Al) con la relación molar deseada y otra conteniendo la base KOH que realiza la precipitación, se agregan simultáneamente en a un matraz que contiene agua desionizada. Las velocidades de adición se regulan durante toda la adición de manera a mantener el pH constante. Con el propósito de homogeneizar los tamaños de cristal y permitir su crecimiento, al final de la adición el precipitado obtenido se añeja manteniéndolo en agitación vigorosa a 80 °C durante 18 h.

7.1.2 Síntesis por el método de urea

Los sólidos de ZnAl serán sintetizados por el método de urea ([Constantino, U et al., 1998](#)). Los cationes Zn^{2+} y Al^{3+} precipitan en forma de HDL gracias a la hidrólisis de urea a 90 °C a partir de una solución de nitratos de Zn y Al durante 10 h. Para evitar la intercalación del CO_3^{2-} que proviene de la hidrólisis de la urea se introduce un exceso de NH_4NO_3 que proporciona iones NO_3^- en la solución.

Posteriormente los sólidos de MgAl y ZnAl serán puestos en tratamiento térmico a 500 °C con flujo de nitrógeno en una rampa de calentamiento de 5 °/min por 5 h para obtener los óxidos mixtos ([Santana Cruz et al., 2014](#)).



7.2 Síntesis de materiales híbridos

Para generar los materiales híbridos se tomarán 0.546 g del óxido mixto obtenido en el apartado anterior, se pondrá en 25 mL de una solución previamente burbujeada con argón, que contendrá 4.8 mmol de las moléculas biológicamente activas (serán distintos fármacos que ataquen bacterias G-), en un pH de 9 y 10, ajustado con solución de NaOH 0.1 M para estreptomicina y con amoxicilina. Una vez alcanzado el pH objetivo, se adicionarán 0.546 g de HDL y se continua con la purga durante 20 min más monitoreando el pH. Después de los 20 min, se retira el potenciómetro y se continua con purga de gas Ar por 30 min más, una vez finalizado el tiempo, se sellan completamente las 3 boquillas, dejando un globo conectado mediante una jeringa y una aguja fina para evitar cualquier tipo de contaminación ambiental (fugas) que pudiese tener el sistema. La suspensión se dejará en agitación por 7 días a 1150 RPM.

Para extraer el sólido, este se separará de la solución por centrifugación a 4000 RPM por 15 min, procediendo a tomar el sobrenadante y realizar una serie de 4 lavados usando 4-6 mL de H₂O des-desc. Al finalizar el ultimo lavado se procede a transferir el material a placas Petri de vidrio, dejando secar por 24 a 48 h y 45 a 50 °C. y se lavará con H₂O desionizada de 4 a 6 veces, para finalmente secarlo a 45 °C durante 48 h ([Lima E et al., 2013](#)). Para el método de reconstrucción por efecto memoria, se utilizaron 0.3276 g siguiendo el mismo procedimiento de síntesis.

7.3 Caracterizaciones de los solidos

7.3.1 Difracción de rayos X

Los patrones de difracción fueron obtenidos mediante la técnica de polvos en un difractómetro D8 Advance fabricado por Bruker, para la obtener los patrones de difracción, el equipo está acoplado a un tubo de cobre para la generación de los rayos X de 1.5418 Å, operando a 45 kV y 40 mA. El barrido será de 3.5 a 60 °, con el incremento a 0.02, el tiempo de integración es de 0.6 s/paso, el tiempo total de barrido por muestra es de 28.5 min.



7.3.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los grupos funcionales así como las vibraciones y estiramientos entre moléculas fueron obtenidos mediante la técnica de FT-IR-ATR usando un espectrómetro Nicolet iS10 con un intervalo espectral de $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ a temperatura ambiente, mediante la técnica de ATR con una resolución de 2 cm^{-1} , usando el cristal de diamante, con un barrido de fondo de 32, ganancia de muestra de 1.0 y velocidad del espejo de 0.4747.

7.3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las micrografías fueron obtenidas del microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM 7200F acoplado con una sonda de análisis elemental. Proporcionará imágenes de alta resolución (micrografías) de los materiales, haciendo incidir un haz de electrones secundarios con un voltaje de 2.0 kV a 5 kV.

7.4 Evaluación biológica

7.4.1 Adquisición de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas serán adquiridas del Laboratorio Estatal de Salud Pública localizado en Morelia, Michoacán. Las cuáles serán: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* CDC 99 y *Shigella sonnei* ATCC 9290.

7.4.2 Estándar de McFarland

Primero se procedió a sacar un estándar de concentraciones de bacterias en UFC, denominado como estándar de McFarland, el cual de acuerdo a la norma de CLSI se calcula usando una longitud de onda de 625 nm a una absorbancia de entre 0.8 y 0.125 nm. Usando como blanco solución salina estéril al 0.85%. El estándar (Std.) se prepara mezclando 0.5 mL 1% de BaCl_2 y 9.95 mL 1% H_2SO_4 , que es equivalente a 0.5 MF o 1×10^8 UFC ([M100 Performance Estándar for Antimicrobial Suceptibility Testing, 2018](#)).

7.4.3 Referencias de los antibióticos

Para poder determinar la CMI, es necesario usar una microplaca de 24 pocillos y con un volumen de 3 mL, se procederá a poner 1 mL de CST en cada uno de los pozos exceptuando el pocillo Núm. 1, a continuación, se adicionan 2 mL de antibiótico en el pozo N° 1 y se transfiere 1 mL del pozo N° 1 al N° 2 y del N° 2 al N° 3 y así



sucesivamente, usando la micropipeta para mezclar hasta 5 veces, una vez completada la dilución, se adiciona 1 mL de Std. MF 0.5 diluido 1:100 con CST.

Para determinar la CMB, usando la micropipeta, se tomará 1 mL de 0.5 Std. MF de bacteria (1×10^8 UFC/mL), y se diluyera en 9 mL de caldo soya tripticaseína (CST) para obtener una solución 1:10, después, se tomará 1 mL de la solución 1:10 y se transferirá a un segundo tubo con 9 mL de CST para obtener una dilución 1:100 (1×10^6 UFC/mL). Con ayuda de hisopos estériles, se introducirán dentro del tubo 1:100 y se procederá a realizar un estriado sobre placas con Agar Mueller Hinton, de arriba hacia abajo y rotando cada 45° hasta 3 o 4 veces. Después se procederá a introducir los sensidiscos previamente cargados con 30 μ L de antibiótico diluido, usando pinzas estériles y acomodándolas a una distancia de 7 cm entre discos, posteriormente, serán incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1$ por 18-24 h ([Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed, 2018](#)).

7.5 Evaluación de la actividad antibacterial de los materiales híbridos

7.5.1 Preparación de muestras microbiológicas

En un matraz Erlenmeyer se preparará 500 mL de agar MacConkey y se esterilizará a 121°C por 15 min. Se verterá el agar en placas Petri, se dejará enfriar y sembrará la cepa *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei* en forma de extensión por toda la placa usando hisopos estériles, así mismo se adicionarán concentraciones conocidas de material y posteriormente se incubará a 37°C por 72 h. Como control, una placa se inoculará con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final, a una temperatura de incubación de 37°C por 24 h en atmosfera aeróbica.

Se determinará el crecimiento de las bacterias en presencia de los materiales híbridos. Para ello, se valorará la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB (Concentración Mínima Bactericida) promedio. Se enfrentará un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Se inoculará 1 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*S. typhi*, *E. coli* o *S. typhi*), en 9 mL de caldo de soya tripticaseína al 4 % contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregará una cantidad de material biocida (0.005, 0.01, 0.015 g) a cada tubo



incubándose a 37 °C con agitación a 100 rpm. Se tomarán muestras a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 120 y 180 min). Las muestras tomadas se sembrarán en cajas Petri con 20 mL de agar MacConkey por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculará con cultivo sin material bactericida, a la par de los tiempos previamente mencionados. Las placas serán incubadas invertidas a 37 °C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizará el conteo de colonias ([Santana-Cruz et al., 2014](#)).

7.6 Elaboración del bioplástico

Para poder adaptar los materiales híbridos en la zanahoria, es necesario sintetizar un bioplástico que se adapte a las necesidades, esto quiere decir, que sea fácil de elaborar y que sea adherible a cualquier superficie, por ello se utilizó la metodología de Alvarez Cortes para dicha síntesis, para la cual se pesan las siguientes cantidades de los reactivos 0.01 g de alginato de sodio, 0.05 g de agar-agar, 0.07 g de alcohol polivinílico, 0.07 g de goma arábica y se depositan en un vaso de precipitados conteniendo 98 mL de H₂O destilada, posteriormente se somete a calentamiento manteniéndolo a 95 °C y en constante agitación a 1150 RPM por 30 min. Una vez finalizado este tiempo se pasa la solución usando un medio filtrante de gasa estéril y un embudo de cristal, para recibir la solución en un tubo conteniendo 0.15 g de HDL o material híbrido, enseguida se vierte la solución en un recipiente y se somete al proceso de secado a 45 °C por 24 h, para evitar confusiones se rotulo está mezcla como B-HDL conteniendo al material y para los materiales híbridos, B-HDL-EM y B-HDL-AMX de estreptomicina y amoxicilina respectivamente ([Álvarez Cortes et al., 2020](#)).

7.6.1 Evaluación biológica del bioplástico

Se preparará un alimento que contenga el B-HDL como control negativo y de forma similar unos tres alimentos que sean infectados cada uno con las bacterias con 0.5 Std MF de *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*. Así mismo tres alimentos que tengan el recubrimiento de B-HDL-EM y tres alimentos que tengan el recubrimiento B-HDL-AMX a se controlará el crecimiento de dichas bacterias ([Gorrasí, G. y Sorrentino A. 2020](#)), y se sembraran en placas con agar XLD y en placas con AMC.



8. Análisis y discusión de resultados

8.1 Síntesis de HDL ZnAl

Los distintos materiales de ZnAl ($\text{Zn/Al} = 2$), se sintetizaron por el método de urea

8.1.1 ZnAl-NO₃

En la Figura 2. Difractograma de ZnAl-NO₃, se muestra el difractograma del material, al momento de compararlo con un patrón de la hidrotalcita, se observa que las fases corresponden al de un HDL puro, observando en primera instancia que la posición 9.85° corresponde al plano (003), que corresponde a la distancia interplanar, siendo d_{003} de 8.972 Å mientras que sus armónicos 19.83° y 34.25° , corresponden a los planos (006) y (009). Así mismo en 11.29° se encuentra un pico característico del ZnCO₃ que menciona la literatura es por la intercalación de varios grupos CO₂ que al reaccionar con el agua de la solución, se forman en CO₃ y que ocupan espacio interlamilar al acoplarse con metales de Zn en caso de exceso, este fenómeno surge a partir de una relación molar de 2 (Mana et al., 2019; Jianqiang et al., 2014).

En la Figura 3. FT-IR-ATR de ZnAl-NO₃, mostrando primeramente a $3444,4\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a los -OH coordinados del material, así mismo correspondería a las vibraciones de H₂O que se encuentra intercalada dentro del material. Por otra parte en 1384 cm^{-1} se encuentra la presencia del grupo NO₃, por otra parte, las vibraciones que se encuentran debajo de la región de 1000 cm^{-1} corresponden a los estiramientos de M-O y O-M-O (Djebbi, A.M., Elabed, Z. et al., 2016)

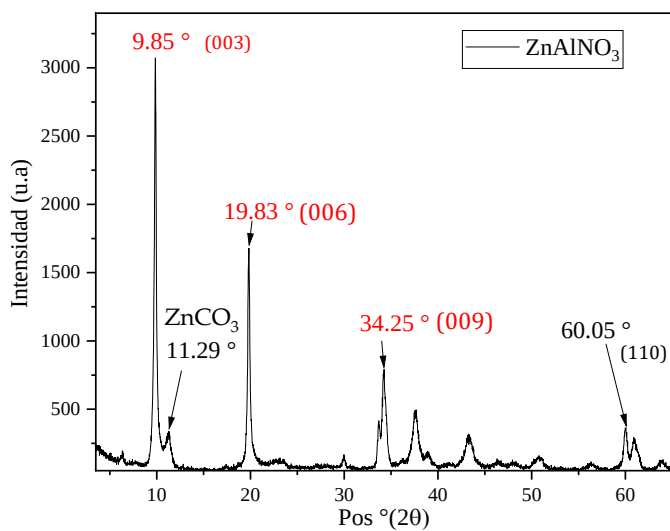


Figura 2. Difractograma de ZnAl-NO_3

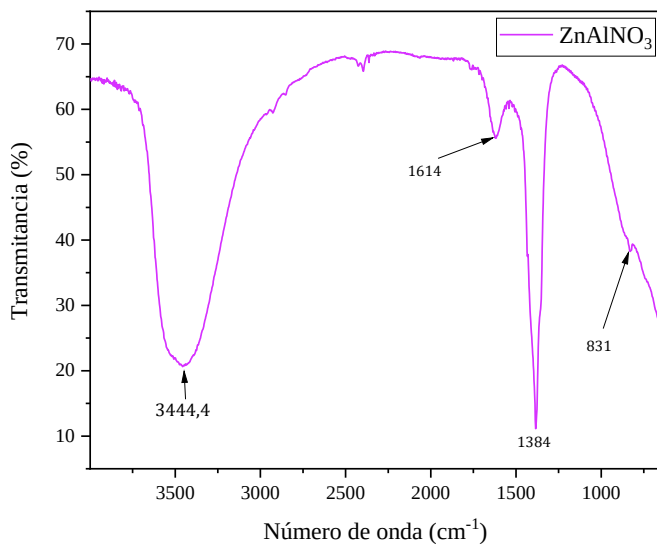


Figura 3. FT-IR-ATR de ZnAl-NO_3

8.1.2 ZnAl-Cl

El material ZnAlCl surge a partir de ZnAlCO_3 (el mismo método de síntesis que el de ZnAlNO_3 con la diferencia de usar Na_2CO_3 en exceso en vez del nitrato de amonio), al momento de ponerlo en solución de NaCl 0.1 M a razón de 1 g de HDL por cada 50 mL, titulándolo con HCl 0.1 M manteniéndolo en un pH estable de 5, para su etapa final, fue centrifugado a 4000 RPM a temperatura ambiente y se secó a 120°C en un lapso de 12 h en una estufa de convección. El difractograma se muestra en la Figura 4. Difractograma de ZnAl-Cl. en el se observa que se obtuvo un material completamente puro, sin interferencias que corresponde a la formación similar de las hidrotalcitas porque el ion Cl posee una simetría compatible dentro de la región interlaminar (Bouali, A.M., Iuviuk, M. et al., 2020) así mismo, la posición 11.31° corresponde al plano (003), mientras que 22.79° y 34.43° sus respectivos armónicos, para d_{003} 7.81.

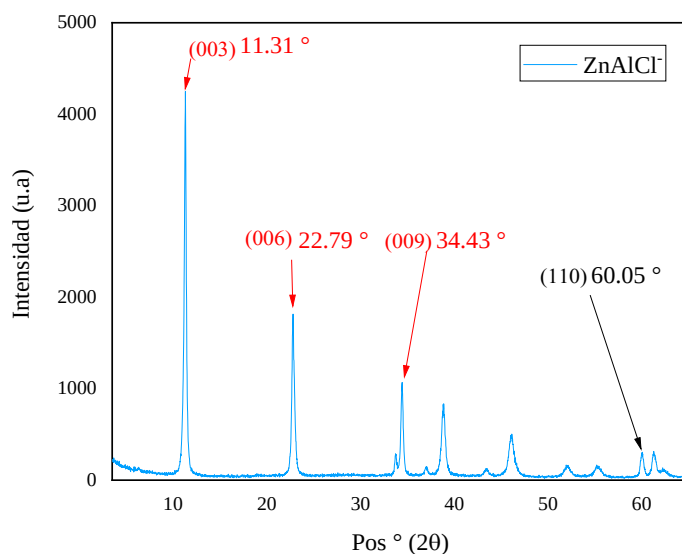


Figura 4. Difractograma de ZnAl-Cl.

Por motivos de claridad, en la Figura 5, no se muestra el espectro de ZnAl-Cl, sin embargo la intensidad de 1365 cm^{-1} corresponde al CO_3 , que de acuerdo con la literatura, reporta que el pico es asimétrico al del Cl^- , la intensidad fue netamente menor,

por lo que se concluye que se intercaló satisfactoriamente el Cl^- dentro de la región interlaminar (Mosangi, D.L Moyo, S. et al., 2016).

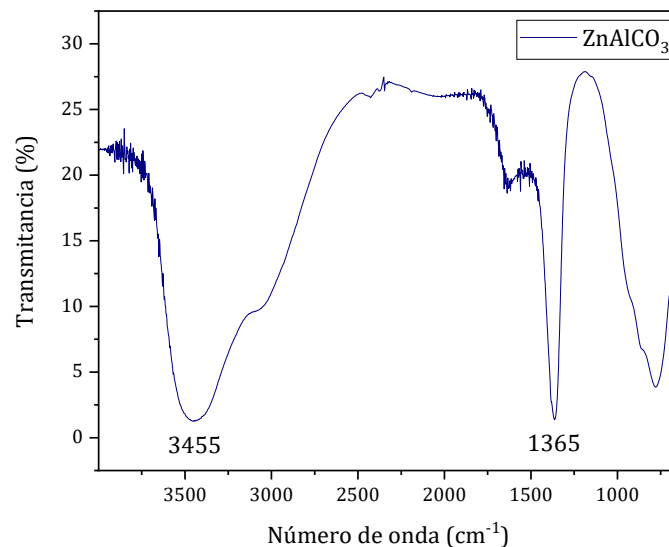


Figura 5. Espectro IR de ZnAl-CO_3 .

Como pertenecen a un sistema romboédrico, los parámetros de red característicos son a que corresponde a la distancia entre catión y catión de las láminas de Zn y Al y c , que resulta ser la distancia interplanar donde $a = 2d_{110}$, que revela en este caso que ambos materiales están coordinados de la forma que se esperaría de los HDL y $c = 3d_{003}$ revela el espacio interlaminar que existe dentro del material, qué acuerdo con S. Miyata y V. Constantino, corresponden a la tendencia de las distancias interlaminares reportadas, por lo tanto, $d_{(003)\text{NO}_3^-} > d_{(003)\text{Cl}^-}$ (S. Miyata, 1983; V. Constantino y T. Piannavaia, 1995). Por otra parte (Bouali, Anissa C.luzviuk et al., 2020) menciona que es notorio que ZnAl-NO_3 y ZnAl-Cl tengan un parámetro de red c menor, debido a que los grupos nitrato se encuentran más desordenados entre las láminas positivas. Por lo que en teoría, fue más permisible la incorporación de fármaco dentro de ZnAl-NO_3 como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis estructural de los HDL's ZnAlNO_3 y ZnAlCl

Material	2θ (°)	d_{110} (Å)	Parámetro de red a (Å)	2θ (°)	d_{003} (Å)	Parámetro de red c (Å)
ZnAlNO_3	60.05	1.5394	3.078	9.85	8.927	26.781
ZnAlCl	60.05	1.5394	3.078	11.31	7.817	23.451

8.2 Síntesis de HDL MgAl

8.2.1 Síntesis de HDL MgAl-Cl

En la Figura 6. Difractograma de MgAl_2Cl . se muestra el DRX, donde la posición $11,35^\circ$ corresponde al plano (003), así mismo, $22,95^\circ$ y $34,53^\circ$ son los planos (006) y (009) respectivamente, y el ángulo de $60,65^\circ$ representa al plano (110).

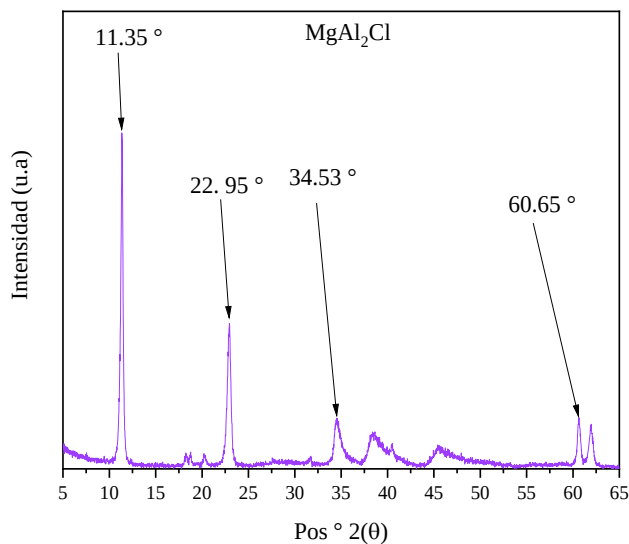


Figura 6. Difractograma de MgAl_2Cl .

El análisis estructural, muestra que los parámetros de red son muy parecidos al de ZnAlCl , por lo que se puede concluir que también está intercalado el ion Cl^- dentro de la región interlaminar, así mismo el plano (110) también revela que sigue el mismo arreglo entre los átomos de Mg y Al, sin embargo se tuvo un espacio interlaminar más chico que con ZnAlCl .

Tabla 4. Análisis estructural de MgAl-Cl.

Material	2 θ (°)	d ₁₁₀ (Å)	Parámetro de red a (Å)	2 θ (°)	d ₀₀₃ (Å)	Parámetro de red c (Å)
MgAl-Cl	60.65	1.5256	3.0512	11.35	7.789	23.367

Al igual que el espectro de ZnAl-CO₃, el espectro de infrarrojo de MgAl-CO₃, se observa a los -OH del material situados en 3455 cm⁻¹ mientras que los carbonatos se encuentran en 1373 cm⁻¹, producto de las interacciones de estiramiento entre C-O, al haber comprobado que MgAl-Cl posee poca intensidad en dicho pico, se llegó al resultado de que el ion Cl⁻ fue intercalado, por otra parte debajo de 1000 cm⁻¹ también están las interacciones metal-oxígeno que corresponden a los seis grupos O-H coordinados. Así mismo como reporto (Wei M. et al., 2004) se muestran las vibraciones oxígeno metal (O-M) y oxígeno-metal-oxígeno (O-M-O).

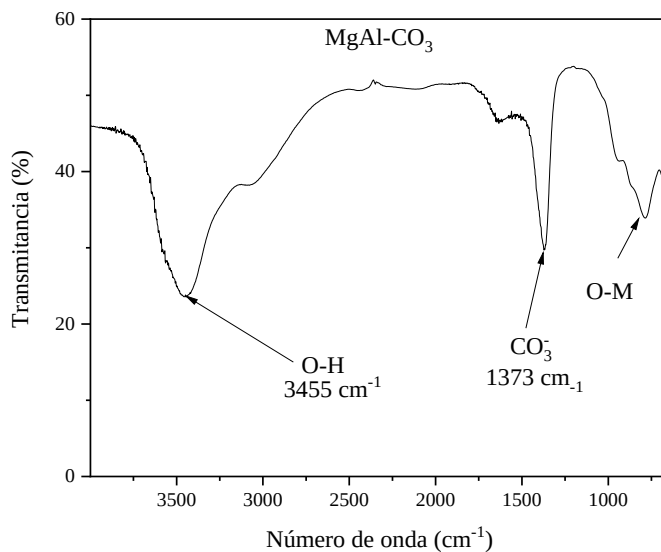


Figura 7. Espectro FTIR de MgAl-CO₃.



8.3 Moléculas biológicamente activas

Las moléculas que se seleccionaron para ser probadas en contra de la bacteria *E. coli*, fue la estreptomicina, que ataca a nivel genético en la subunidad 30s del ribosoma, para *S. sonnei* y *S. typhi* fue la amoxicilina que ataca la síntesis de peptidoglucanos de la pared celular, fármacos de bajo espectro para dichas bacterias gram negativas, sin embargo los resultados mostrados a continuación revelaron que la estreptomicina funcionó mejor para las tres bacterias que la amoxicilina.

8.3.1 AMX

Para identificar que la AMX se encuentre dentro del material, se procedió a análisis de FT-IR-ATR, en su estado puro (Figura 8. Espectro FTIR de AMX., que cuyas señales clave están denotadas en los números de onda $1320\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (de color violeta) y $1440\text{ -- }1390\text{ cm}^{-1}$ (no mostrado) correspondiendo a la torsión y estiramiento del ácido carboxílico de la amoxicilina. Por otra parte el grupo amino, está en la región $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ (color azul), la cual es muy característica y que corresponde a la torsión presente en aminas primarias y secundarias. Para la identificación del R-Fenol, la región que corresponde está ubicada en 3610 cm^{-1} así mismo también se puede verificar dicha afirmación del estiramiento C-H correspondiente a un benceno en posición orto en la región 3100 cm^{-1} (color naranja) el estiramiento característico de los O-H está ubicada en 3529 cm^{-1} (color rosa). Debajo de los 3000 cm^{-1} se ubican los estiramientos de C-H, -CH₂- y -CH₃ (negro). Los ácidos carboxílicos y cetonas están ubicadas en las regiones de $1765\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ (gris) que corresponden al estiramiento del carbonilo, y en $1420\text{ -- }1200\text{ cm}^{-1}$ se ubica la torsión y estiramiento del carboxilo (no mostrado). La señal del azufre (color café) se encuentra en 2400 cm^{-1} . Una banda muy característica de la amoxicilina es los metilos gemelos ubicados en 1380 cm^{-1} (color verde fuerte) que corresponde al doblete, por último en $1445\text{ a }1425\text{ cm}^{-1}$ (color magenta) se ubican dobles enlaces de grupos aromáticos. La intensidad disminuye aún más cuando el -CH₂ está entre múltiples enlaces dobles.

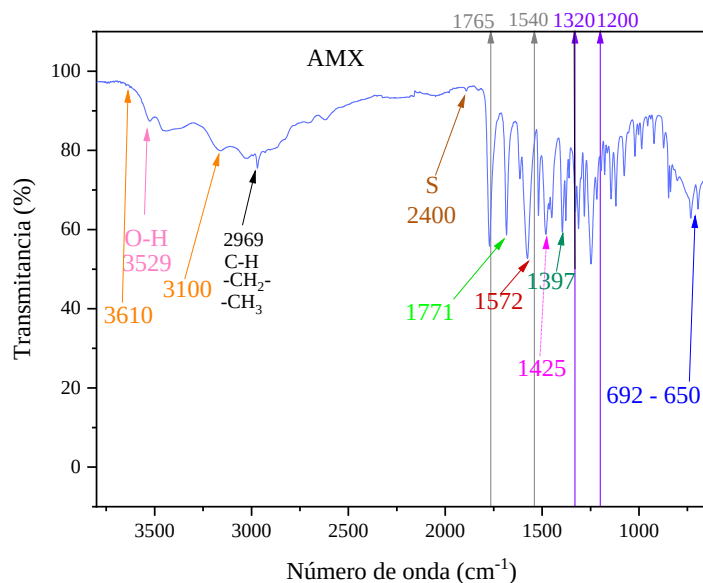


Figura 8. Espectro FTIR de AMX.

Todos los grupos descritos anteriormente se encuentran en la Figura 9. Estructura química de AMX.

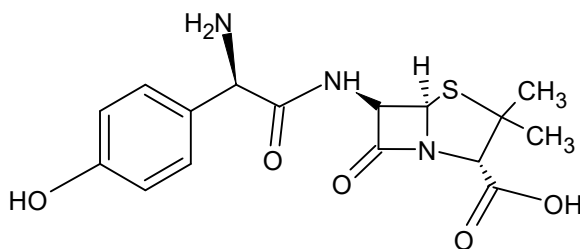


Figura 9. Estructura química de AMX

8.3.2 EM

Las bandas características (Figura 10. Espectro FT-IR-ATR de EM) de la EM son los estiramientos y elongaciones de los grupos amino de la estreptomicina ubicados en la región de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Mientras que en la región de la huella dactilar, hay estiramientos C-C, C-O y particularmente C-N. En la región entre $730\text{ y }710\text{ cm}^{-1}$ se pueden observar señales que corresponden a $n \geq 4$ cadenas de $-(\text{CH}_2)_n$, los espectros de sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales como las aminas y los ácidos



muestran una serie de bandas regulares en $1350 - 1180 \text{ cm}^{-1}$. Así mismo en 1030 cm^{-1} la intensa señal es por parte del estiramiento de $\text{S}=\text{O}$ que pertenece a la molécula de ácido sulfúrico. Por otra parte, en $1740 - 1645 \text{ cm}^{-1}$ se puede observar una señal intensa de estiramiento, característica del grupo carbonilo. Las bandas correspondientes a $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ (debido a su forma ancha) indican la existencia de puentes de hidrogeno del tipo polimérico. Por otra parte en la región de $3200 - 3650 \text{ cm}^{-1}$ hay presencia de aminas (NH_2), así mismo, en la región $1690-1640 \text{ cm}^{-1}$ existe estiramiento $\text{C}=\text{N}$, las aminas primarias y secundarias son muy características de la estreptomycin y éstas están presentes en la región $980 - 650 \text{ cm}^{-1}$ debido a la torsión presente en las aminas, mientras que en la región de 1075 cm^{-1} hay presencia de estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}-\text{H}$. Es posible que por la presencia de H_2SO_4 , las señales reales de la estreptomycin están solapadas, lo que provoque que se encuentren más débiles, en 3326 cm^{-1} , podría corresponder al estiramiento de $\text{N}-\text{H}$.

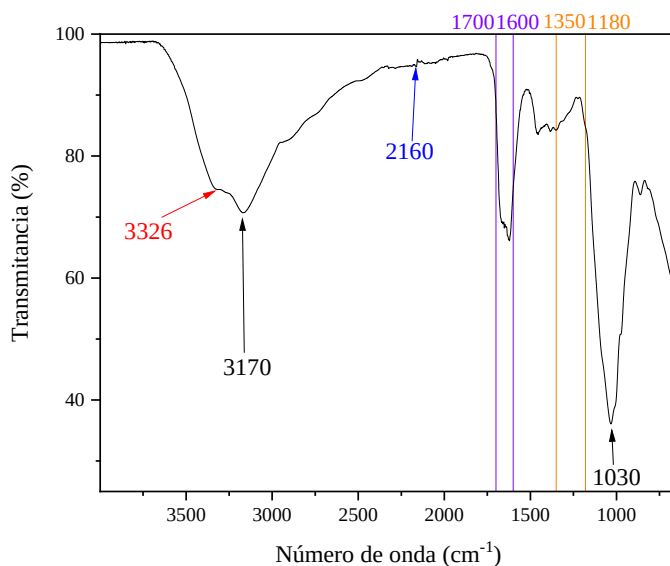


Figura 10. Espectro FT-IR-ATR de EM

Nuevamente los grupos descritos aparecen en la Figura 11. Estructura química de la estreptomycin sulfatada.

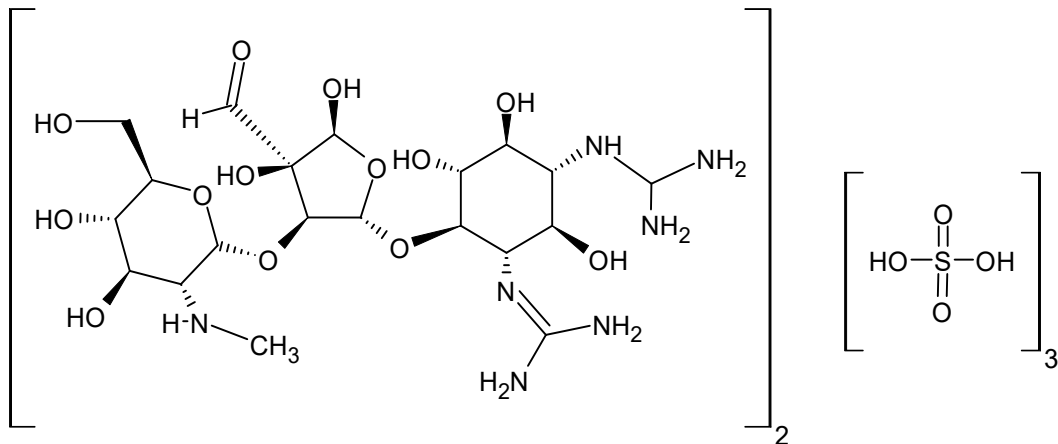


Figura 11. Estructura química de la estreptomicina sulfatada

8.4 Materiales híbridos de ZnAl

Para poder entender la nomenclatura de los próximos resultados se planteó la siguiente nomenclatura donde el método de síntesis fue por:

- (I): Intercambio iónico
- (R): Reconstrucción por efecto memoria
- (CdR): Calcinación y Reconstrucción por efecto memoria

8.4.1 (I)-d-ZnAl-NO₃-AMX-NaOH

En dicho fue sintetizado por el método de intercambio iónico usando el doble de cantidad de HDL, AMX y NaOH, para evitar confusiones con los demás materiales, fue etiquetado como (I)-d-ZANAN.

Se procedió entonces a utilizar un envase de vidrio de marca Duran® Schott de 500 mL adaptando tapones de goma, en el que se colocó 9.6 mM de AMX y se ajustó el pH usando 200 mL de NaOH 0.1 M, con un pH de 10.38. Se dejó en constante agitación por 30 min monitoreando el pH, hasta que se estabilizó en 10.20 una vez pasado el tiempo, por lo que se procedió a sellar usando un tapón con únicamente el sistema de gas argón, sin embargo. Así se dejó por los 6 días restantes. Al final del séptimo día, se midió el pH antes de ser centrifugado y se observó que el pH había



descendido a 8.38. Posteriormente se centrifugo a 4000 RPM por 15 min, y se lavó 5 veces usando agua libre de CO₂ y desionizada.

El análisis de DRX se observa en la Figura 12. DRX de d-ZANAN, pese a tener buena intercalación de la AMX dentro del material, el aire atmosférico afectó considerablemente al material, pues los iones de carbonato ingresaron a la galería del material y ocuparon espacio, lo que debilitó la posibilidad de haber intercalado una mayor cantidad de antibiótico dentro del material, la posición de 11,50 ° pertenece a los carbonatos en (003) con sus respectivos armónicos. Por otra parte el material tiene un tamaño de cristal de 70 nm y posee una altura de galería de 7.781 Å, que indica que en los planos (003) en la posición 7.06 °, (006) en 2θ de 15.06 ° y (009) en el ángulo 21.18 °, (que están marcados con rojo) si está intercalada la AMX, de acuerdo con Wang, los arreglos en las posiciones x, y, z de la molécula de AMX son 0.74 x 0.43 x 0.94 nm respectivamente ([Wang et al., 2009](#)), por otra parte Rebitski obtuvo una altura de galería 0.79 nm mientras que la muestra obtenida posee una altura de 0.71 nm. Otra forma de poder comprobar si la molécula se intercaló es observando la diferencia entre HDL₍₀₀₃₎ y d_{HDL-AMX(003)} donde el espacio basal original de 0.00892 nm ha incrementado su tamaño a 0.0127 nm ([Rebitski, P.E et al., 2019](#))

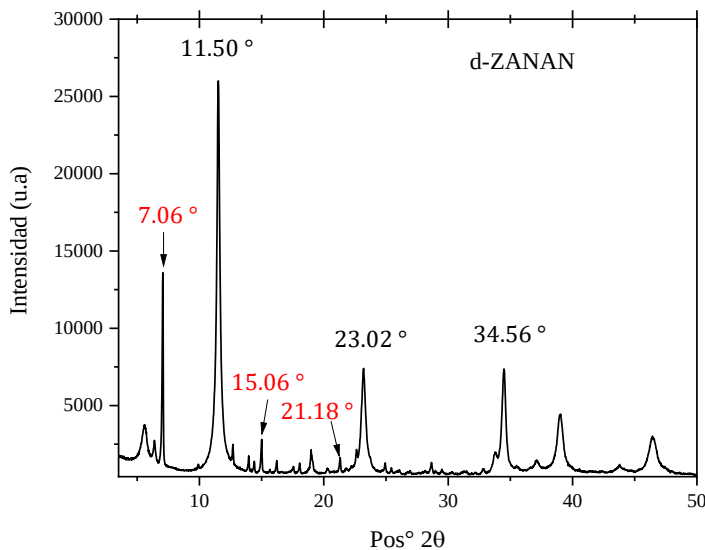


Figura 12. DRX de d-ZANAN

Obteniendo así, la Tabla 5 que comprende el tamaño de cristal y los diferentes parámetros de red (a y c), para poder calcular b y obtener la orientación molecular dentro de las láminas.

Tabla 5. Parámetros cristalográficos de d-ZnAlNO₃.

Pos ° (2θ)	Tamaño de cristal (Å)	Tamaño de cristal (nm)	$d_{(110)}$ (Å)	Parámetro de red a (Å)	$d_{(003)}$ (Å)	Parámetro de red c (Å)	Altura de galería (Å)
7.06	904	90.4	-	-	12.510	37.53	7.71
15.06	911	91.1	-	-	-	-	-
21.18	918	91.8	-	-	-	-	-
60	-	-	1.539	3.078	-	-	-

Donde calculando b , dio resultado de 37.49 Å, dicho valor sirve para obtener la orientación de la molécula, que fue de 4.69°.

En la Figura 13. Micrografía del material híbrido d-ZnAl-AMX-NaOH, se muestra la micrografía de d-ZANAN que revela la formación de hojuelas homogéneas en forma hexagonal reportadas en la literatura (Liu, J et al., 2014)

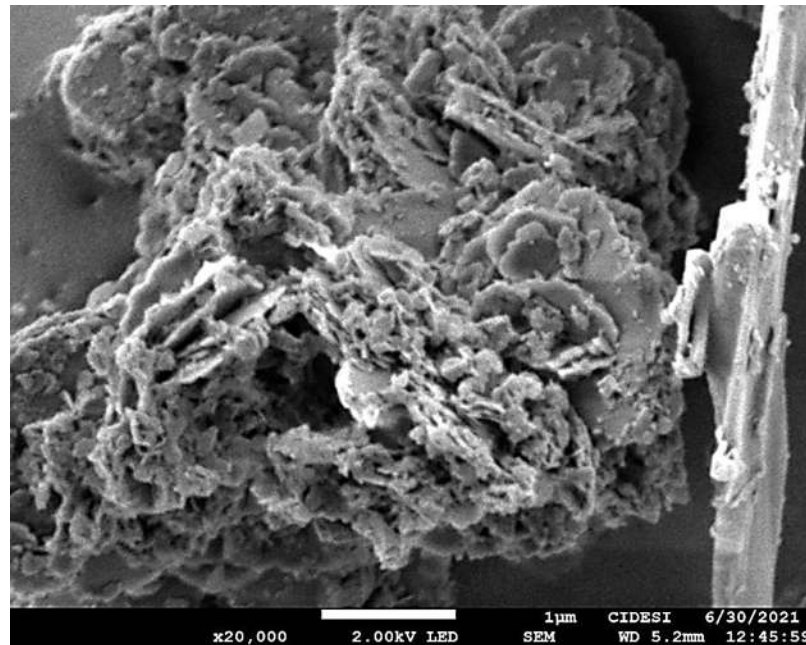


Figura 13. Micrografía del material híbrido d-ZnAl-AMX-NaOH

8.4.2 (I)-ZnAl-NO₃-EM-NaOH

Dicho material híbrido fue sintetizado por el método de intercambio iónico, utilizando un matraz de 3 bocas con capacidad de 125 mL, usando tapones de goma y un sistema de control de atmosfera con gas Ar, fue mantenido usando un agitador magnético en forma de barra a 1250 RPM durante 7 días (Figura 14. ZnAlNO₃-Estreptomicina.). Al finalizar dicho tiempo, se midió el pH el cual tenía un valor de 8.76 y se procedió a realizar de entre 4 a 6 lavados usando agua libre de CO₂

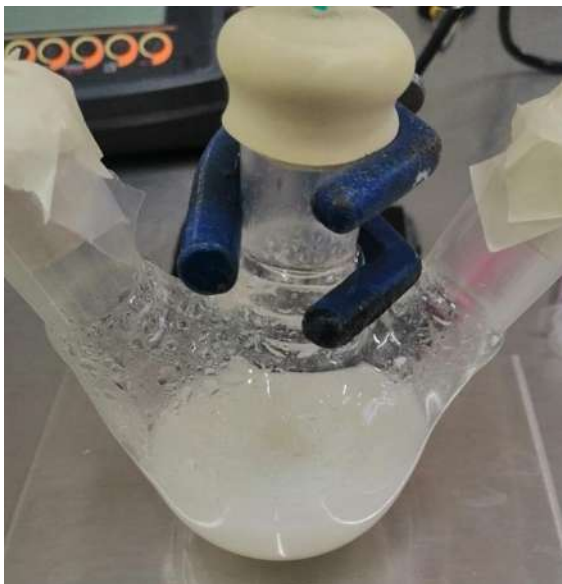


Figura 14. ZnAlNO₃-Estreptomicina.

Posteriormente, el material híbrido fue secado a 45 °C por 24 h.

El material fue caracterizado mediante DRX, como se observa en la Figura 15. Análisis de DRX del material ZnAlNO₃-EM, las posiciones 6,42 °, 12,40 ° y 19,41 ° representan los planos (003), (006) y (009) característicos de estos materiales, indicando de que efectivamente está intercalada la molécula dentro de la región interlaminar, sin embargo aún existe una fuerte presencia del grupo NO₃ que se encuentra también en la región interlaminar y que no fue desplazado por la MBA. Así mismo también en la posición 11.48 ° se encuentra una parte importante de Zn-CO₃ como se observó en el HDL de ZnAl-NO₃

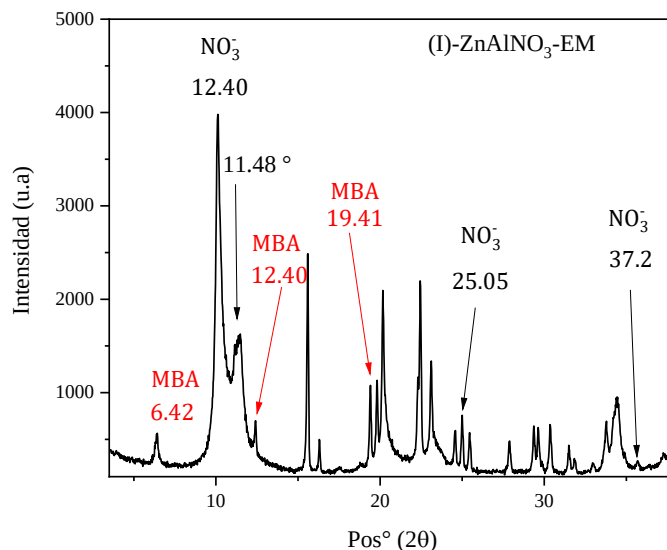


Figura 15. Análisis de DRX del material ZnAlNO₃-EM

Nuevamente, calculando b , dio un resultado de 6.302 Å, a partir de los datos de la Tabla 6, los resultados obtenidos muestran que la altura de la galería de la molécula es mayor a la de AMX, que por lo que se concluye que la estreptomicina si ocupa el espacio interlaminar en adición a grupos nitrato y carbonato, en dicho caso la orientación de la molécula fue de 26 °.

Tabla 6. Parámetros cristalográficos de ZnAl-NO₃-EM

Pos° (2θ)	Tamaño de cristal (Å) (Promedio)	Tamaño de cristal (nm) (Promedio)	$d_{(110)}$ (Å)	Parámetro de red a (Å)	$d_{(003)}$ (Å)	Parámetro de red c (Å)	Altura de galería (Å)
6.42	75.2	75.2	-	-	13.75	41.25	8.95
60	-	-	1.539	3.078	-	-	-

El análisis de FT-IR-ATR muestra que efectivamente la molécula está intercalada dentro del material como se observa en la Figura 16. Espectro FTIR de ZnAlNO₃ con EM-S y sintetizado con NaOH., y que en la región entre 730 y 710 cm⁻¹ se pueden observar señales que corresponden a $n \geq 4$ cadenas de $-(CH_2)_n-$, los espectros de solidos con

cadenas largas y grupos polares terminales como las aminas y los ácidos muestran una serie de bandas regulares entre 1350 a 1180 cm^{-1} . Por otra parte, en 1740 a 1645 cm^{-1} se puede observar una señal intensa de estiramiento, característica del grupo carbonilo. Por otra parte en la región de 3200 - 3650 cm^{-1} hay presencia de aminas (NH_2) muy características de la estreptomicina, así mismo, en la región 1690 - 1640 cm^{-1} existe estiramiento de $\text{C}=\text{N}$, las aminas primarias y secundarias en la región 900 - 650 cm^{-1} debido a la torsión y que confirman que el biomaterial posee al antibiótico. En la región de 3400 - 3200 cm^{-1} (debido a su forma ancha) existen puentes de hidrogeno del tipo polimérico, así mismo podría confirmarse la presencia de agua intercalada en la región interlaminar con el estiramiento de los hidrógenos con el oxígeno H-O-H en las regiones de 3600 a 3100 cm^{-1} y la flexión en 1650 - 1615 cm^{-1} .

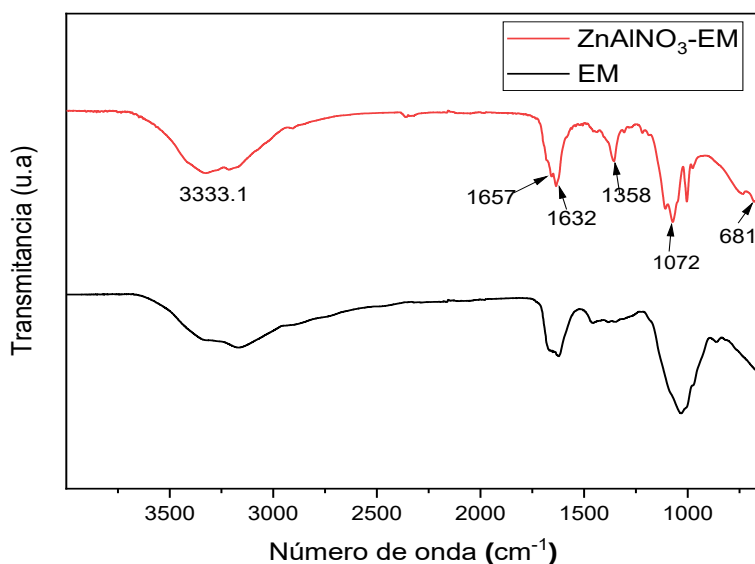


Figura 16. Espectro FTIR de ZnAlNO_3 con EM-S y sintetizado con NaOH .

Por otra parte el análisis de microscopía electrónica de barrido y el análisis elemental adicionalmente, confirman la presencia de la estreptomicina pese a la amorfodidad del material, aún se mantienen las láminas características y algunas de las “hojuelas” permanecen en forma de hexágonos, que de acuerdo con la literatura (Benicio, L. et al.,

2015), son indicio de hidróxidos dobles laminares. El EDS confirma que la relación $Zn/Al = 2$. Por lo que se observa en la Figura 17. MEB de $ZnAl-NO_3-EM$, corresponde a HDL apilados.

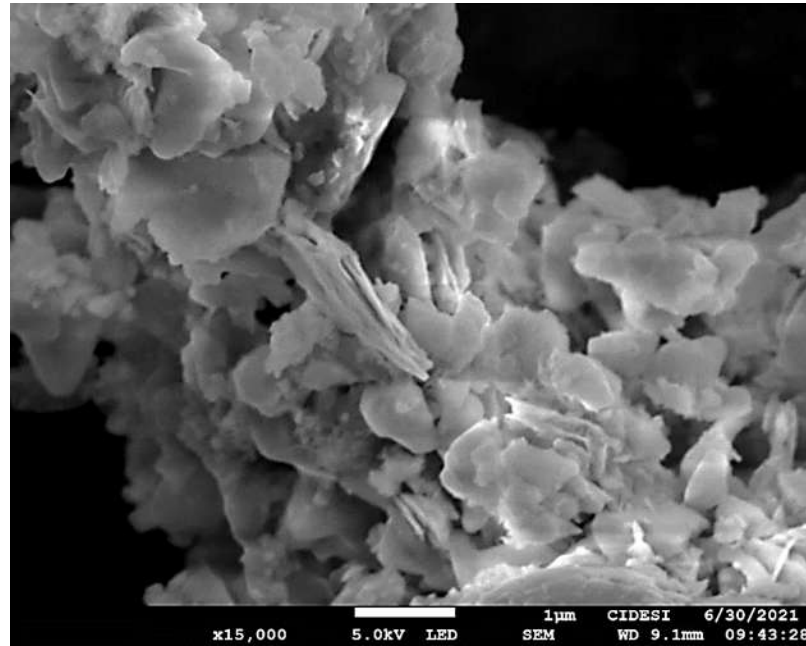


Figura 17. MEB de $ZnAl-NO_3-EM$

Con esto, se comprueba de que si hay formación de hidróxidos dobles laminares. A continuación se muestra la el análisis elemental en la Tabla 7. Análisis elemental del material híbrido $ZnAlNO_3-EMS$, donde se cumple relación de $M^2/M^3 = 0.2$ al promediar todos los espectros (E1 - E11) de Zn y Al.

Tabla 7. Análisis elemental del material híbrido $ZnAlNO_3-EMS$

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
Elemento	% Peso										
C	24.6	28.8	25.9	8.9	27.1	15	28.3	32.2	21.6	25.3	29.5
N	12.3	19.1	16.9	7.01	16.8	4.94	17.1	27.3	11.8	11.7	14.1
O	28.5	26.5	25.5	32.6	25.5	33.1	25.8	23.4	28.4	27.9	27.9
Na	1.61	0.96	1.41	1.5	1.18	1.99	1.18	0.58	1.35	1.38	1.12
Al	6.51	3.97	4.98	9.73	5.09	7.66	4.95	2.12	6.82	5.95	4.59
S	2.73	4.85	4.91	2.68	4.52	2.42	3.4	6.08	4.86	4.54	5.67

Zn	23.8	15.9	20.5	27.6	19.8	34.8	19.2	8.34	25.2	23.2	17.2
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

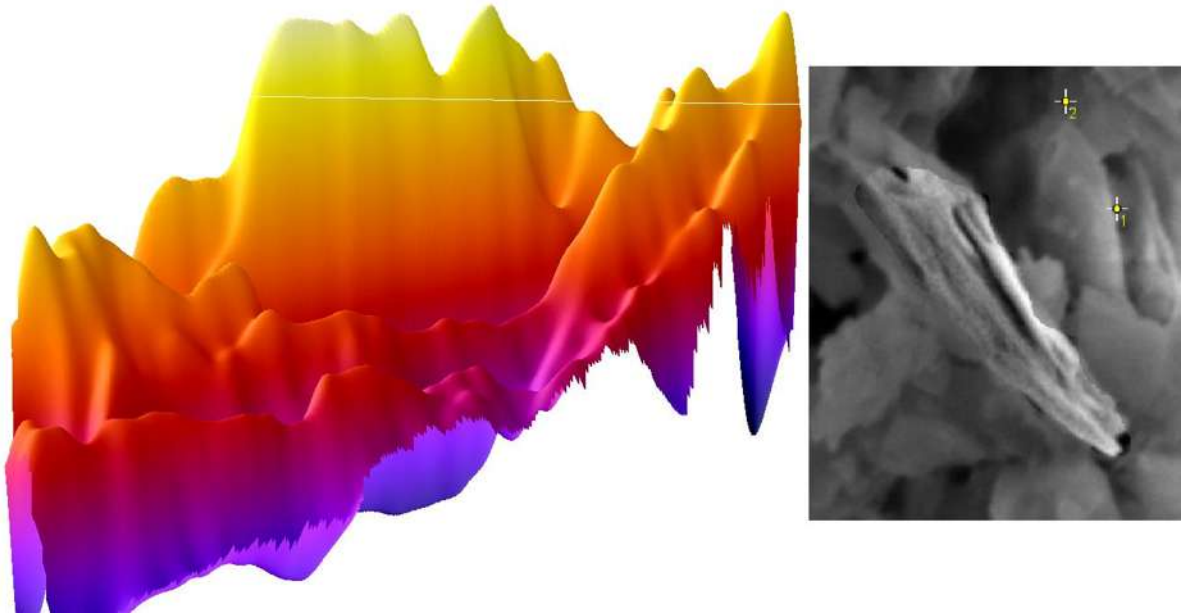


Figura 18. Lamina del material analizada con el Software ImageJ, del material ZnAlNO₃-EMS. Analizando la estructura con el Software ImageJ, en la Figura 18. Lamina del material analizada con el Software ImageJ, del material ZnAlNO₃-EMS se observa que si hay formación de láminas.

8.4.3 (I)-ZnAl-Cl-EM-NaOH

El DRX de la Figura 19. DRX del material híbrido ZnAlCl-EM-S-NaOH, muestra de color rojo la estreptomycin en los planos (003) en 6.44 °, y sus armónicos (006) 12.40 ° y (009) 19.41, mientras que para el Cl⁻ este se encuentra de color negro en las posiciones 10.17 °, 20.17° y 30.36 ° respectivamente. La cantidad de estreptomycin no fue suficiente para desplazar por completo el Cl⁻, es por ello que hay poca cantidad de MBA intercalada en el material, así mismo por la anchura del pico, es predecible que también está contaminada con CO₂ atmosférico (CO₃).

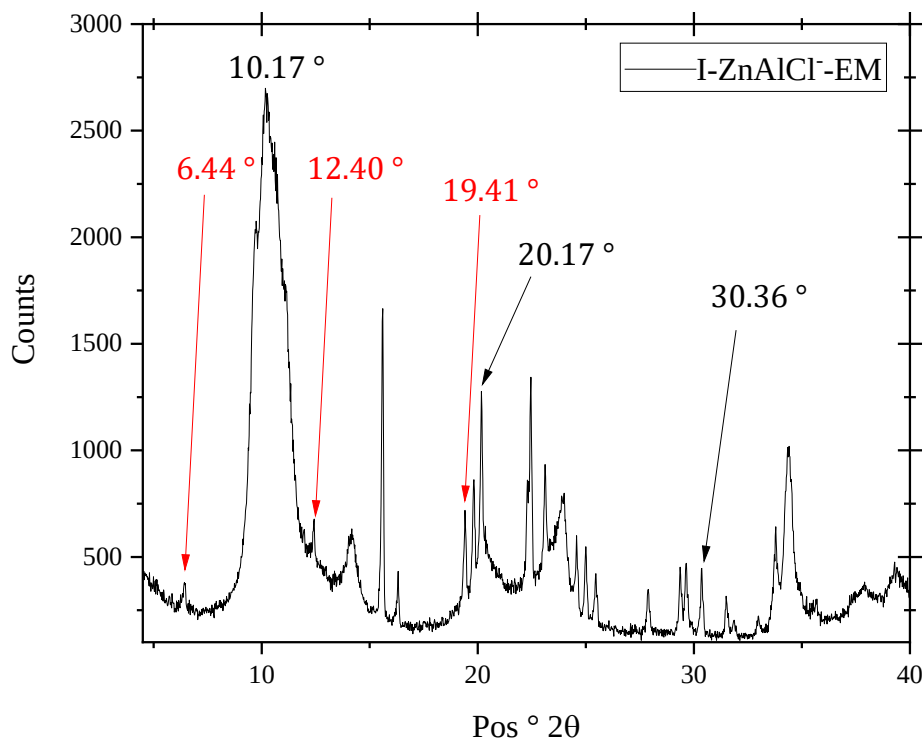


Figura 19. DRX del material híbrido ZnAlCl-EM-S-NaOH

Por otra parte los parámetros cristalográficos (Tabla 8. Parámetros cristalográficos de del material híbrido ZnAl-Cl-EM-NaOH) Revelan que el tamaño de cristal es mayor al de ZnAl-NO₃-EM, esto es debido nuevamente a la gran cantidad de CO₃ intercalado.

Tabla 8. Parámetros cristalográficos de del material híbrido ZnAl-Cl-EM-NaOH

Pos° (2θ)	Tamaño de cristal (Å) (Promedio)	Tamaño de cristal (nm) (Promedio)	d ₍₁₁₀₎ (Å)	Parámetro de red a (Å)	d ₍₀₀₃₎ (Å)	Parámetro de red c (Å)	Altura de galería (Å)
6.44	816	81.6	-	-	13.75	41.25	8.95
60	-	-	1.539	3.078	-	-	-

Esto no quiere decir que el material no contenga la MBA, las próximas caracterizaciones demuestran que si se encuentra dentro del material.

En la Figura 20. FT-IR-ATR de ZnAl-CI-EM, se observa el espectro de FT-IR-ATR, donde se observó una banda de vibración situada a 1356 cm^{-1} que es muy característica del CO_3 , pues proviene de los modos de vibración del anión que reside en el espacio interlamilar. Así mismo en 3340 cm^{-1} el estiramiento del O-H tanto de la EM como del HDL y la flexión en 1634 cm^{-1} , del grupo amino (N-H) que corresponde a EM. Así mismo debajo de 1000 cm^{-1} también se observan las vibraciones de O-M y O-M-O.

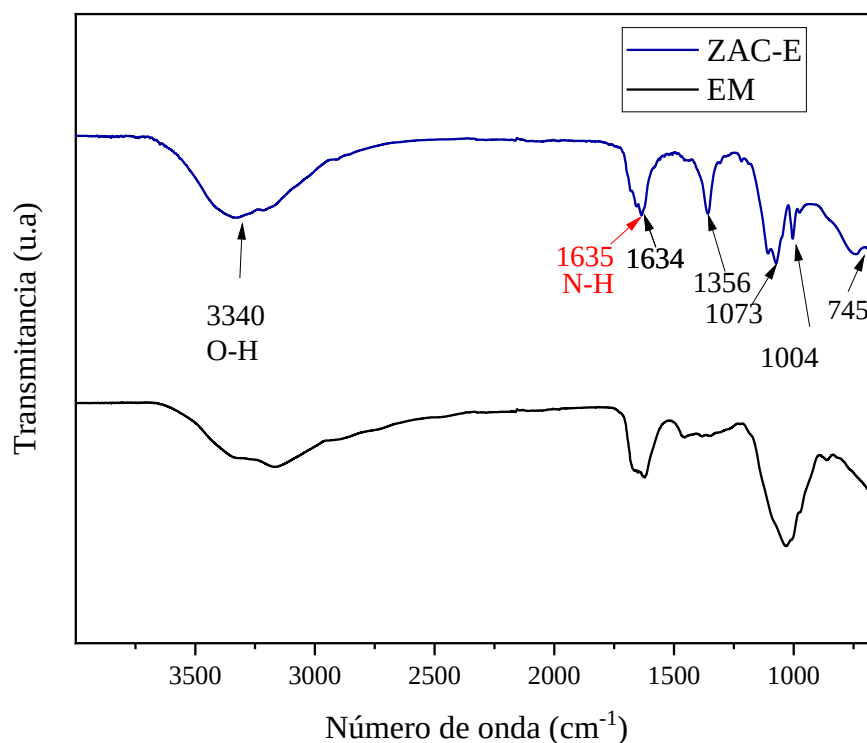


Figura 20. FT-IR-ATR de ZnAl-CI-EM

Por otra parte el análisis de EDS, también confirma que la relación entre Zn y Al es igual a 0.19 (muy cercano a 0.2) por lo que entra dentro de este rango en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis elemental del material híbrido ZnAlCl-EM

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Elemento	% Peso								
C	25.63	38.87	32.58	15.04	30.81	26.06	30.11	25.78	31.15
N	13.93	19.9	20.91	1.63	5.87	11.62	2.53	7.5	15.21
O	30.25	21.78	25.69	32.2	29.1	30.05	27.71	30.12	25.96
Na	1.29	0.65	0.73	2.59	1.54	1.39	1.55	1.68	1.18
Al	4.53	2.58	2.71	9.11	5.78	5.25	6.66	6.01	4.23
S	4.31	5.96	5.8	1.67	1.98	3.35	1.25	2.96	4.54
Cl	0.03	0.02	0.07	0.06	0.04	0.04	0.01	0.05	0
Zn	20.03	10.23	11.51	37.7	24.88	22.24	30.18	25.9	17.74

Así mismo en la Figura 21. Microscopia electronica de barrido del mat. Híbrido ZnAlCl-EM., la micrografía muestra a el material híbrido que conserva la característica de tener laminas apiladas

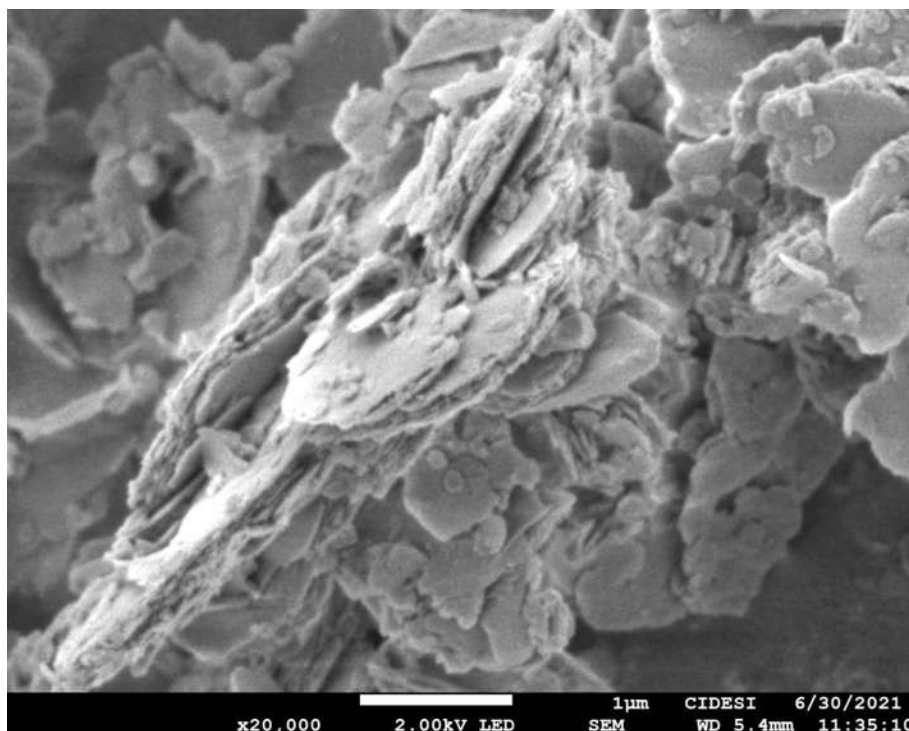


Figura 21. Microscopia electronica de barrido del mat. Híbrido ZnAlCl-EM.

Al momento de usar el software ImageJ (**A**), se observó que evidentemente también hay formación de las láminas como se observa en la microscopia (**B**), en la Figura 22. Estructura del material dibujada en 3D con el Software ImageJ..

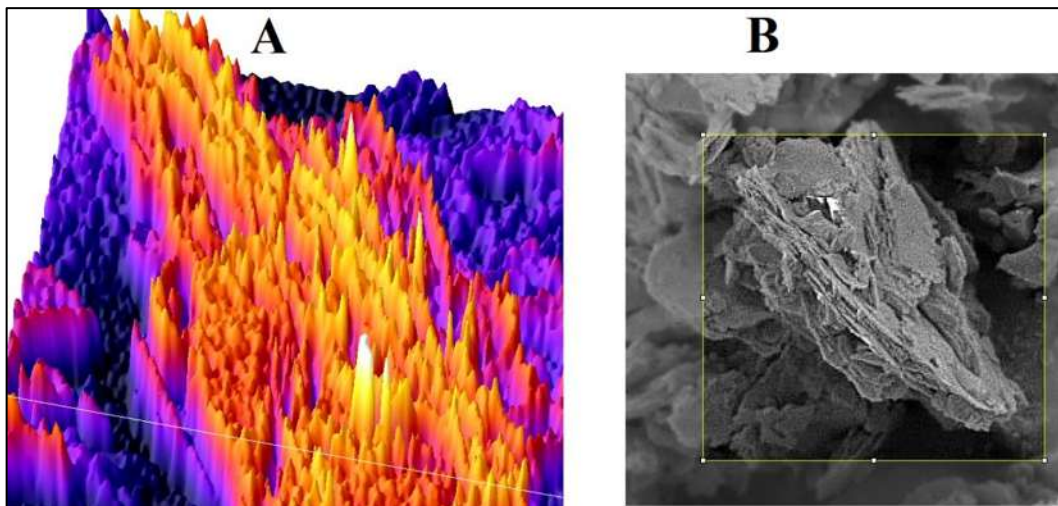


Figura 22. Estructura del material dibujada en 3D con el Software ImageJ.

8.4.4 (R)-ZnAl-AMX-KOH

A diferencia del método de intercalación iónica, donde se observaba que el KOH no permitiría bien la intercalación de la MBA, en el método de reconstrucción mostro resultados similares en IR donde se puede observar que aparecen las regiones características de la AMX, con la excepción de las regiones inferiores a 1000 cm^{-1} , donde las bandas correspondientes a los grupos amino en $800\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, así mismo, en 3413 cm^{-1} , las señales corresponden a la torsión del N-H no están tan evidentes en comparación a la AMX pura. Esto podría deberse a la interacción de puentes de hidrogeno entre el -OH de las moléculas de agua y del antibiótico dentro del material, así como la carga positiva del K^+ sobre los -OH y NH_2 . La señal de 3000 cm^{-1} y corresponde a los O-H, sin embargo, la forma clásica de la región esta solapada con distintas señales provenientes de puentes de hidrogeno intermoleculares de moléculas de agua, del material y de grupos amino en las regiones de 3500 cm^{-1} a 3323 cm^{-1} , en 3100 cm^{-1} , está la presencia del estiramiento de los grupos alcano que pertenecen a la AMX como se observa en la Figura 23. Espectro IR de (R)-ZnAl-AMX-KOH Así mismo

la señales de K^+O-M son muy intensas en 761 cm^{-1} lo que de acuerdo con (Duquesne, E. *et al.*, 2020) los K^+ se ubicarían en la parte externa e interna del material lo que incrementa la señal del espectro IR anteriormente el $K-OH$ podría facilitar la impregnación pero no la intercalación de MBA.

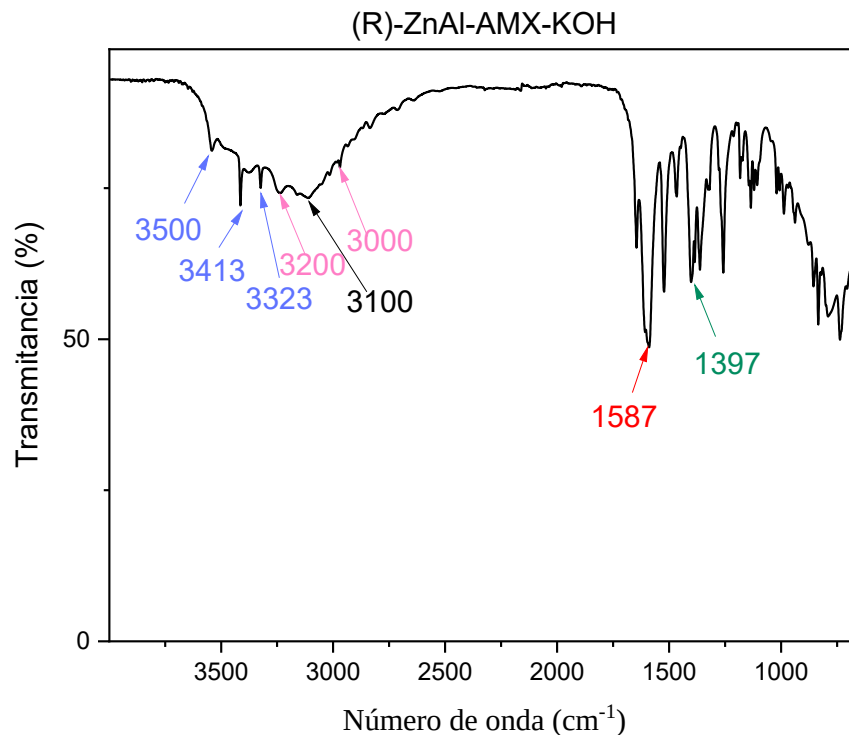


Figura 23. Espectro IR de (R)-ZnAl-AMX-KOH

Sin embargo, debido a que fue ineficaz contra de las bacterias, las demás caracterizaciones no se realizaron.

8.4.5 (R)-ZnAl-AMX-NaOH

El análisis de DRX (Figura 29. Espectro FTIR-(I)-MgAl-AMX-KOH) muestra una buena intercalación con un tamaño de cristal de 91.06 nm , por otra parte muestra que también hay señales ajenas al material, que podrían indicar que el lavado no fue suficiente. Los planos (003), (006) y (009) se muestran en las posiciones 7.06° , 13.96° y 21.37° respectivamente. Así mismo, el pico intenso que sigue después ()

corresponde a el grupo carbonato procedente del aire contaminante que se logró intercalar.

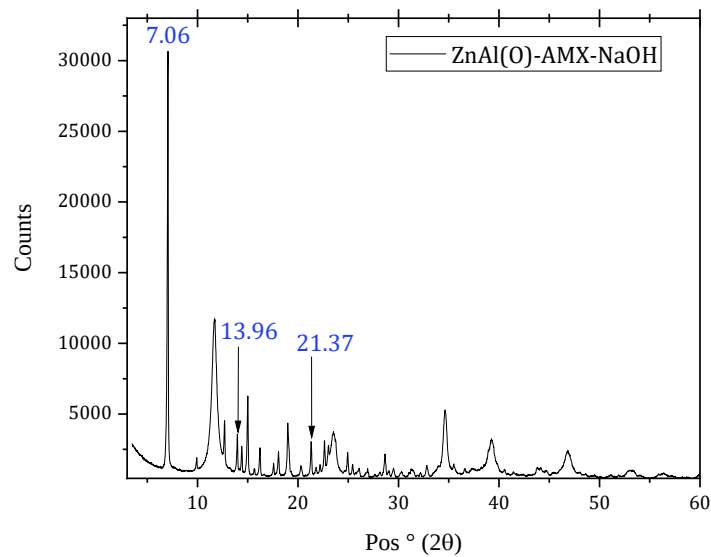


Figura 24. Difractograma del material (R)-ZnAl-AMX sintetizado con NaOH.

Como se puede observar en la Tabla 11, la altura de galería es muy similar a la que se encuentra en la literatura, donde Tang obtuvo una altura de galería 0.98 nm al intercalar una molécula orgánica dentro de un HDL de ZnAl, por otra parte Santana Cruz, reporto una altura de 0.933 nm al intercalar una MBA dentro del HDL ZnAl, por lo que se entiende de que la molécula si se encuentra dentro de la región interlaminar (Tang L et al., 2018; Santana Cruz et al., 2016).

Tabla 10. Parámetros cristalográficos del material ZnAl sintetizado por el método de reconstrucción y NaOH.

Pos ° (2θ)	Tamaño de cristal (Å)	Tamaño de cristal (nm)	d ₍₁₁₀₎ (Å)	Parámetro de red a (Å)	d ₍₀₀₃₎ (Å)	Parámetro de red c (Å)	Altura de galería (Å)
7.050	910,66	91,066	-	-	12.526	37.578	7.226
60	-	-	1,539	3,078	-	-	-

El análisis de MEB muestra que evidentemente hay formación de láminas de forma hexagonal como se observa en la Figura 25. Micrografía del material ZnAl-AMX-NaOH, mientras que el análisis elemental (EDS) demuestra la presencia de átomos característicos de la amoxicilina, como lo es el N, S, y un alto contenido de C. Por otra parte, el oxígeno también está en un alto contenido, no solamente por los -OH coordinados, también por los -OH de la propia amoxicilina

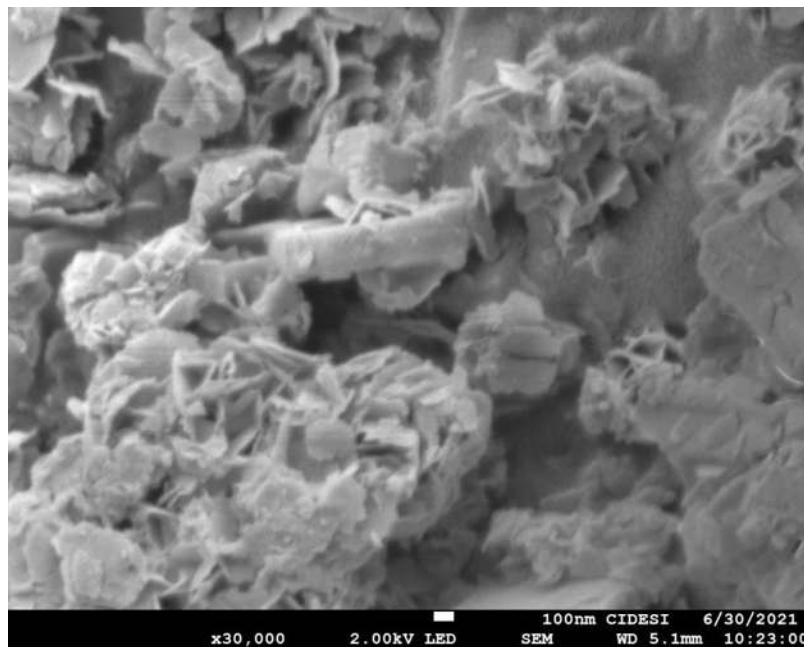


Figura 25. Micrografía del material ZnAl-AMX-NaOH

Así mismo, en la Figura 26. Modelado 3D usando ImageJ, del material R-ZnAl-AMX-NaOH, donde A), es parte de la micrografía mostrada anteriormente y B), es el

modelado 3D, las líneas representarían el acomodo de las láminas. se observan más a detalle las láminas formadas, usando el Software ImageJ®, se dan ideas de las formaciones de las láminas.

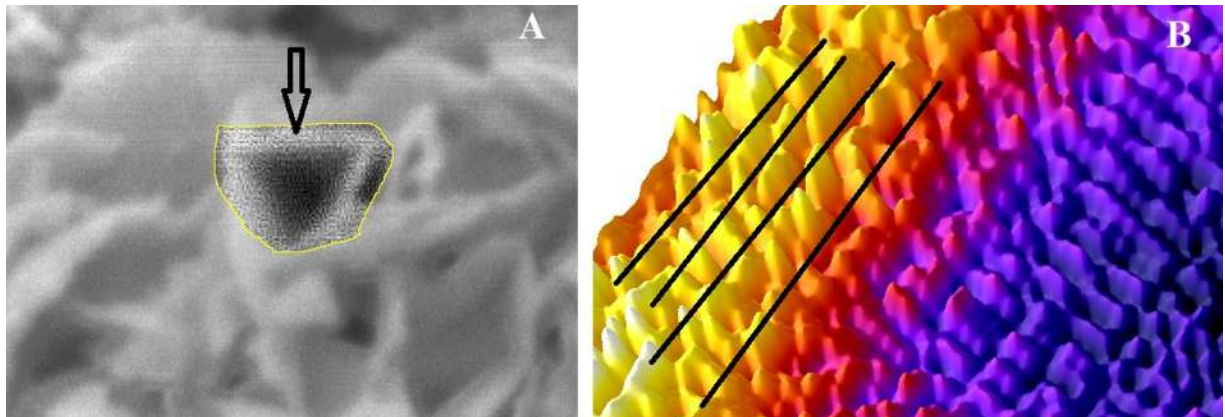


Figura 26. Modelado 3D usando ImageJ, del material R-ZnAl-AMX-NaOH, donde A), es parte de la micrografía mostrada anteriormente y B), es el modelado 3D, las líneas representarían el acomodo de las láminas.

El EDS, muestra trazas de azufre en pequeñas cantidades, que son parte de la molécula de la amoxicilina como se observa en la Tabla 11. EDS de (R)-ZnAl-AMX.

Tabla 11. EDS de (R)-ZnAl-AMX

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Elemento	% Peso								
C	9.19	13.50	12.66	13.58	16.55	11.79	17.33	22.17	40.57
N	1.22	1.44	1.50	1.34	1.87	0.91	1.83	1.41	7.66
O	20.10	23.39	24.77	24.25	22.66	22.86	23.54	25.12	15.42
Na	0.43	0.96	0.23	0.81	0.30	0.04	0.56	0.79	0.53
Al	16.47	12.02	14.36	12.40	12.07	12.74	10.62	10.83	4.31
S	1.08	1.09	1.07	1.04	1.65	0.4	0.6	0.7	0.9
Zn	52.60	48.69	46.48	47.63	46.45	51.67	46.11	39.68	34.52

8.4.6 (R)-ZnAl-EM-NaOH

El DRX de la Figura 28. Espectro de IR de (R)-ZnAl-EM-NaOH, revela que si existe intercalación de la molécula, sin embargo el ruido generado en el difractograma, se a la pobre molienda de la muestra, aún así, se logra ver el plano (003) en la posición 5.29 ° marcado en rojo. Por otra parte también se distingue la posición correspondiente al CO₃

lo que demuestra que está contaminado con el aire atmosférico, de acuerdo con (Yang, Q et al., 2017; Zhang L.H et al., 2007) las señales corresponderían a una mezcla de ZnCO_3 , ZnO y ZnAl_2O_4 .

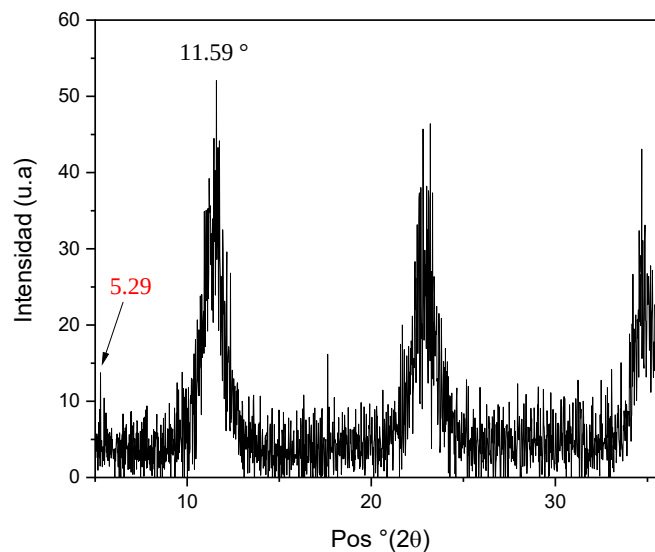


Figura 27. DRX de (R)-ZnAl-EM-NaOH

En la Figura 28. Espectro de IR de (R)-ZnAl-EM-NaOH, se observa el espectro de IR, mostrando que hay intercalación de la estreptomycin. Donde el pico de interés en 1634 cm^{-1} se muestra en rojo, el cual es por los estiramientos de los grupos aminos mientras que en 1353 cm^{-1} de color azul, se muestran torsiones y estiramientos entre C-O y C-H y los estiramientos de CH_3 .

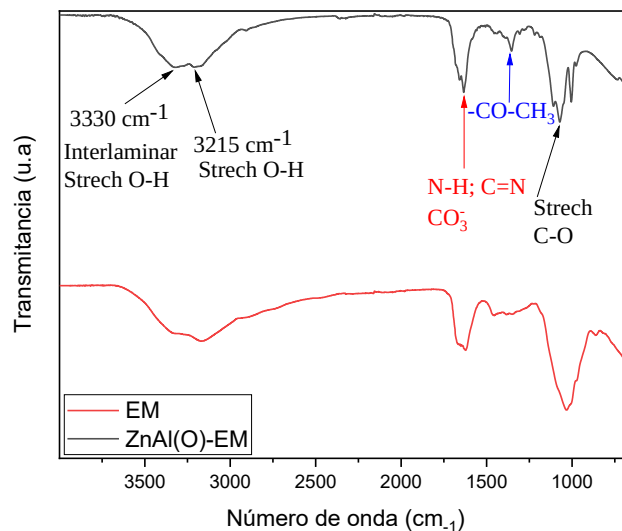


Figura 28. Espectro de IR de (R)-ZnAl-EM-NaOH

8.5 Material híbrido con MgAl

8.5.1 (I)-MgAl-Cl-AMX-KOH

La caracterización de FT-IR-ATR de MgAl-Cl-AMX muestra que no hay intercalación de la amoxicilina (por lo mismo, no se le realizaron pruebas de DRX y MEB.), ya que los únicos dos picos que aparecen son en 3416 cm^{-1} de los O-H, mientras que en 1360 cm^{-1} aparece el pico único de los carbonatos. Lo que comprueba de que no se intercalo la molécula de la amoxicilina, ya que ni sus picos característicos aparecen, sin embargo se hace notar que la interacción $\text{K}^+\text{-O-M}$ es muy intensa en 761 cm^{-1} Figura 29. Espectro FTIR-(I)-MgAl-AMX-KOH, lo que supondría que abarco en gran parte de la región interlaminar como se planteo anteriormente

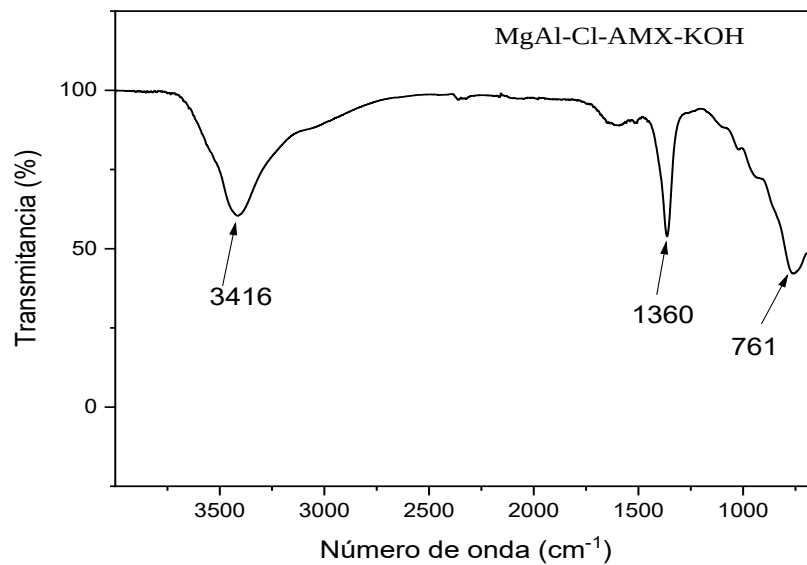


Figura 29. Espectro FTIR-(I)-MgAl-AMX-KOH

8.5.2 (I)-MgAl-Cl-EM-NaOH

El análisis de DRX, muestra que no existe intercalación dentro del material, pues el ángulo menor de 9.86° es por parte del anión Cl^- y el ángulo de 11.48° es por parte del CO_3 con sus respectivos planos armónicos (006) y (009), de acuerdo con Lv. L., el anión Cl^- presenta posiciones similares entre 9 y $9,5$ (Lv. L., 2009).

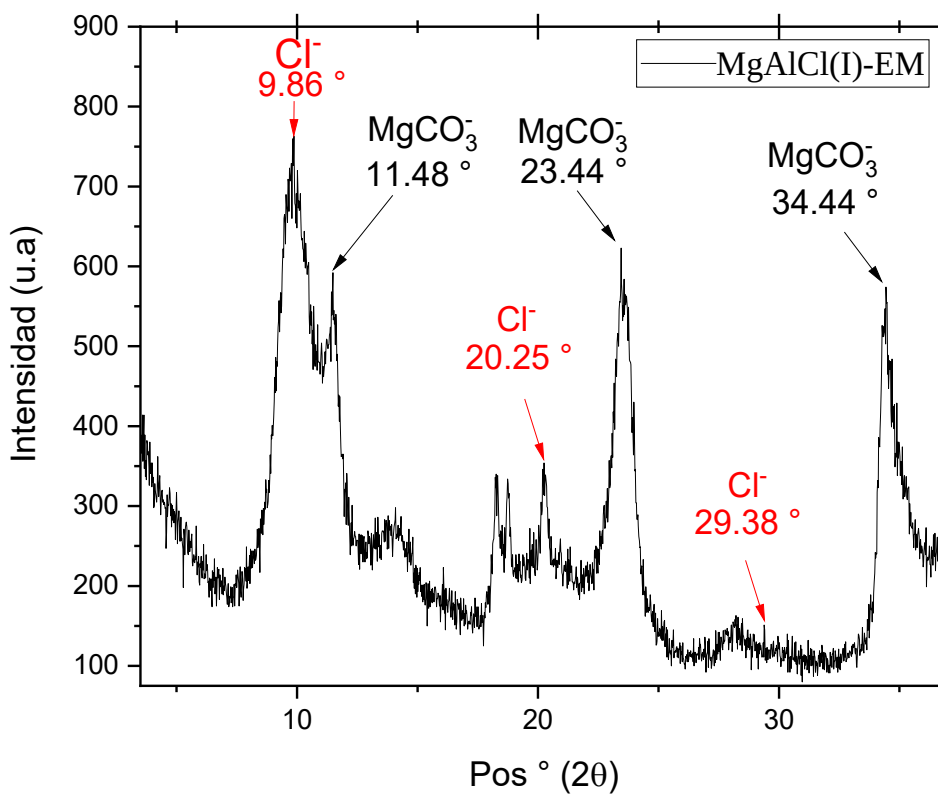


Figura 30. DRX de MgAlCl con EM-S

Claramente se observa en la Figura 30. DRX de MgAlCl con EM-S y en la Tabla 12. Parámetros cristalográficos de MgA₂Cl-EM-S con NaOH., que no hay intercalación existente de la molécula, de hecho el tamaño de cristal es muy alto en comparación de aquellos intercalados y la altura de galería es muy corta.

Tabla 12. Parámetros cristalográficos de MgA₂Cl-EM-S con NaOH.

Pos° (2θ)	Tamaño de cristal (Å)	Tamaño de cristal (nm)	d ₍₁₁₀₎ (Å)	Parámetro de red a (Å)	d ₍₀₀₃₎ (Å)	Parámetro de red c (Å)	Altura de galería (Å)
9.44	2021	200.1	-	-	8.97	26.91	4.17
60	-	-	1.539	3.078	-	-	-

El análisis de infrarrojo (Figura 31. FTIR de $\text{MgAl}_2\text{Cl}_2\text{-EMS}$ por intercambio iónico.) muestra que se encuentra la estreptomycin en el material, sin embargo puede ser que la estreptomycin este impregnada y no intercalada, por lo que concordaría con las bandas similares con el material híbrido aunque en menor intensidad. Por otra parte, se detectó una intensa señal en 1359 cm^{-1} que de acuerdo con Mahassene M., corresponde al anión CO_3 dentro de las galerías del HDL. (Mahassene M et al., 2016). Así mismo, en 1635 cm^{-1} corresponde a moléculas de agua atrapadas dentro de la región interlaminar y en 1456 cm^{-1} a estiramientos del CO_3 (Wang et al., 2015). A continuación, podría considerarse que en la región de $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (debido a su forma ancha) existan puentes de hidrogeno del tipo polimérico, así mismo podría confirmarse la presencia de agua intercalada en la región interlaminar con el estiramiento de los hidrógenos con el oxígeno H-O-H ($3600\text{ - }3100\text{ cm}^{-1}$) y la flexión en $1650\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$. Así mismo puede confirmarse la presencia de agua intercalada en la región interlaminar con el estiramiento H-O-H ($3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) y la flexión en $1650\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$

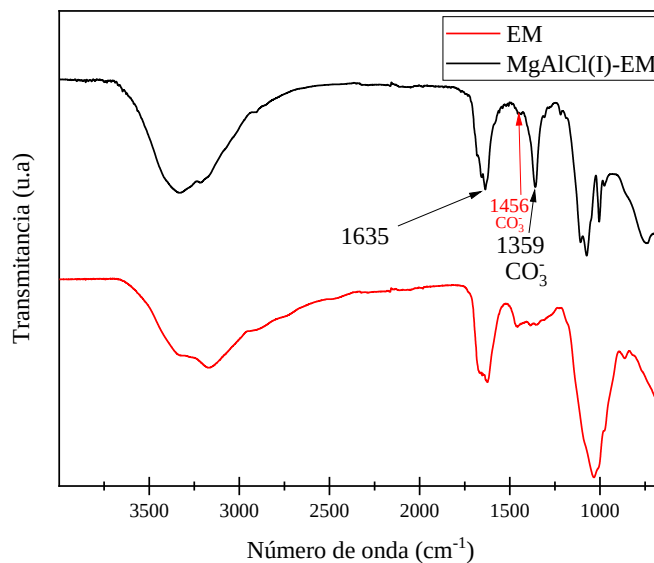


Figura 31. FTIR de $\text{MgAl}_2\text{Cl}_2\text{-EMS}$ por intercambio iónico.

8.5.3 (R)MgAl-EMS-NaOH

El DRX (Figura 32. Difractograma de (R)-MgAl-EM) muestra que la molécula no se encuentra intercalada en el espacio interlamilar, de acuerdo con la literatura, el pico cercano a 11° indica que hay una gran presencia de carbonatos, estos se introdujeron como gas carbónico atmosférico y se oxidaron en forma de CO_3 , lo que ocasionó un impedimento para posicionar la estreptomicina dentro del material.

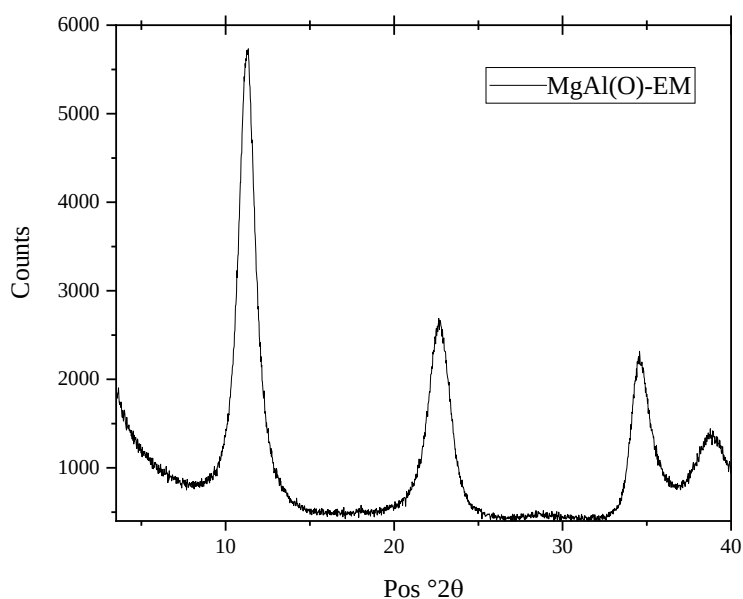


Figura 32. Difractograma de (R)-MgAl-EM

Es posible que esto haya sucedido debido al reactor utilizado, es decir, el matraz de 3 bocas, que supone tener más accesos para facilitar el análisis, sin embargo, debido a las diversas fugas de argón el material terminó por acaparar la mayor cantidad de CO_3 , esto mismo se confirma con el análisis de FTIR-ATR que muestra (**Figura 33.** Espectro del material (R)-MgAl-EM-NaOH) la intercalación, las bandas que están presentes pertenecen a los estiramientos de los carbonatos, dicha banda está marcada en azul. Los posteriores análisis elemental y de MEB no fueron llevados a cabo debido a que carecía de la molécula.

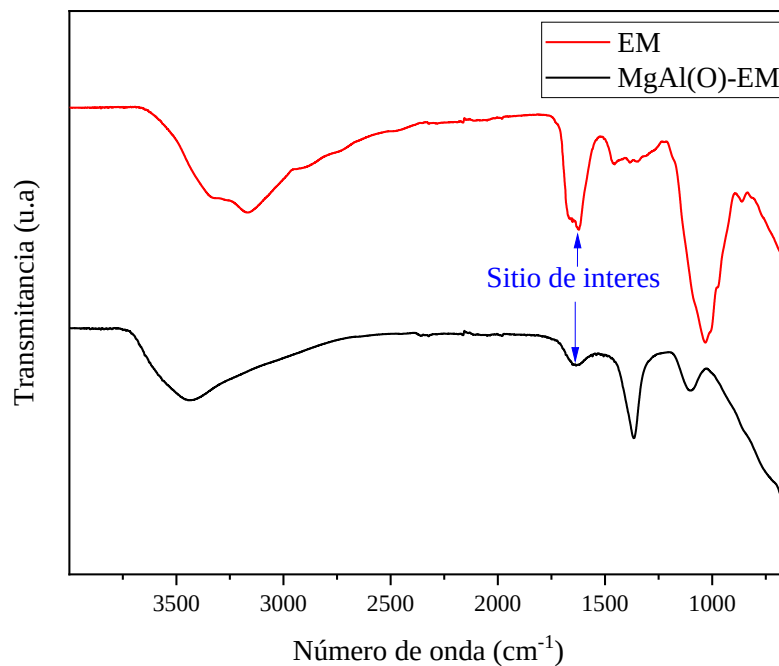


Figura 33. Espectro del material (R)-MgAl-EM-NaOH

8.5.4 (CdR)-MgAl-AMX

El análisis de DRX (Figura 34. DRX de MgAl-AMX-NaOH.) muestra que no existió intercalación de la AMX dentro de la región interlamina y que los aniones de CO_3 en la posición de 11° (003), con sus respectivos armónicos, que están ocupando el espacio dentro de la galería, esto se debe a la decisión inefectiva de cerrar a presión el envase sin la presencia del globo de argón a diferencia de los métodos anteriores. Sin embargo, el método de calcinación resulto efectivo debido la cristalinidad del material es muy favorable.

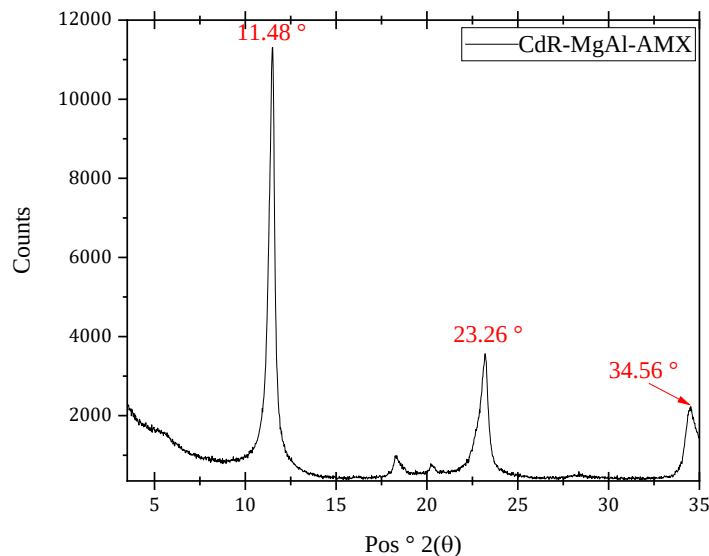


Figura 34. DRX de MgAl-AMX-NaOH.

8.6 Resumen de materiales híbridos

Los materiales que mejor lograron intercalar las MBA's fueron aquellos sintetizados por el método de intercalación iónica y el uso de NaOH, con el HDL de ZnAl-NO₃ debido a que el anión NO₃ es más susceptible a ser desplazado a diferencia del resto de los aniones (Cl⁻, CO₃), por otra parte el usar KOH resultó inefectivo, ya que de acuerdo a la literatura citada previamente, los iones K⁺ están en la superficie del material y no en la región interlaminar, lo que podría provocar que el material estuviera más propenso a tener MBA'S en dicha zona (por la densa nube electrónica que se forma) en la zona, esto se comprobaría con las pruebas microbiológicas, pues los materiales que estuvieron contra dichas bacterias, formaron más rápido su resistencia, que aquellas sintetizadas con NaOH, así mismo se cree que si se llegase a controlar la atmosfera adecuadamente se tendría una buena incorporación como se mostró con el material (R)-ZnAl-AMX-NaOH, donde la síntesis fue realizada en un matraz bola de fondo plano, al existir una sola abertura limita las posibilidades de tener contaminación atmosférica que acaparen la región interlaminar. Por otra parte el método de síntesis por CdR resultó ser ineficaz debido a la alta exposición del HDL colapsado al CO₂



atmosférico, ya que la mufla usada no contaba con una válvula de purga de argón lo que facilitaba su introducción a las láminas.

8.7 Evaluación antibacterial

8.7.1 Fármacos en estado puro

Las bacterias *S. typhi*, *S. Sonnei* y *E. coli* presentan inhibición a 2 distintos fármacos, la amoxicilina y la estreptomicina respectivamente, esto se determinó así, porque las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones mínimas bactericidas (CMB), mostraron que la amoxicilina y estreptomicina funcionan mejor contra *S. sonnei* y *S. typhi* y que en el caso de *E. coli* la estreptomicina funciona mejor.

Para poder evaluar la actividad antibacterial primero es necesario realizar un estándar de concentración conocido o 0.5 MF, que equivale a 1×10^8 UFC/mL el cual se prepara usando de 4 a 6 mL de sol. salina 0.85% estéril y seleccionando de 3 a 5 colonias con 18 h de previa incubación, posteriormente es analizado en el espectrofotómetro Uv-Vis λ 625 nm en un rango de 0.08 - 0.130 nm. Así mismo, se hacen las respectivas diluciones (1:100) para que dicho valor se reduzca a 1×10^6 UFC/mL o 1,000,000 de colonias formadoras/ mL.

Para poder ejecutar las pruebas de concentración mínima inhibitoria, se requirió probar los diferentes antibióticos en concentraciones conocidas, en placas de plástico con capacidad de 3 ml, usando 1 ml de caldo de soya tripticaseína 2 % y efectuando una serie de diluciones usando el antibiótico, para finalizar añadiendo un 1 mL de concentración ajustada 1:100 de bacterias a una temperatura de incubación de 37 °C por 18 a 24 h. Las concentraciones mínimas de antibiótico están indicadas en la Tabla 13. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de Amoxicilina con distintas bacterias. usando AMX y en la Tabla 14. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas con Estreptomicina. usando EM.

Bacteria	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	9.76	78.125
<i>S. typhi</i>	2.44	4.88
<i>S. sonnei</i>	9.76	39.06



Tabla 13. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de Amoxicilina con distintas bacterias.

Bacteria	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	9.76	78.125
<i>S. typhi</i>	156	≥ 1000
<i>S. sonnei</i>	156	≥ 1000

Tabla 14. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas con Estreptomicina.

Los datos obtenidos de ambas tablas, muestran que tanto *S. typhi* como *S. sonnei* presentan una mayor resistencia a la EM, que a la AMX. (Ranjbar, R. et al., 2009) reporta que *S. sonnei*, *S. typhi* y *E. coli* tienen resistencia contra EM debido a la expresión génica de los cassettes genéticos (secuencia de ADN con funcionalidad común, en este caso de resistencia) y de los integrones promotores de plásmidos que esparcen genes de resistencia que codifican enzimas como la Aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) de la clase 1 que traen consigo los genes *estX-psp-aaadA2-cmlA-aad1-qacH* de forma esporádica. Por otra parte, la resistencia a la AMX está conferida por la modificación a las porinas de la membrana externa lo que reduce el tiempo de acción del fármaco y por la expresión génica dentro de los cassettes tipo 1 que expresan el gen *AmpC* que confiere la resistencia a casi todos los antibióticos β -lactámicos (Bharathi, S. et al., 2008; Iyobe, S. et al., 2000).

En el caso de *E. coli* la concentración requerida de estreptomicina fue de 9.76 $\mu\text{g/ml}$. La acción de los fármacos mostró que la estreptomicina es más viable para ser usada con *E. coli* que con AMX, ya que la bacteria secreta enzimas β -lactamasa para hidrolizar el anillo β -lactámico de las penicilinas, amoxicilinas, etc. y que tiene como objetivo, inhibir la biosíntesis de la pared celular. En el caso de la estreptomicina, está ataca a nivel genético, en el ribosoma 30S, que ocasionan problemas de replicación y transcripción del ARN.

8.7.2 Curva de inhibición bacteriana

Se colocaron 0.05, g de material en 3 tubos con 9 mL de soya tripticaseína al 2 %. Así mismo a cada uno de los tubos, se les adiciono 1 mL 1:100 0.5 MF de bacteria, es decir 1×10^6 CFU/mL, dando como resultado una concentración 1:1000 final de

bacteria en los tubos. La cinética de inhibición duro un total de 3 h. Diversos materiales lograron inhibir el crecimiento de *E. coli* a partir de las 2 h (T 120 min) de haber comenzado con la cinética. Así mismo, solo unos pocos materiales alcanzaron la inhibición parcial al termino de las 3 h y solo un material logro la inhibición después de haber pasado la primera h.

8.7.2.1 (I)-d-ZnAlNO₃-AMX-NaOH contra *S. typhi*

Debido a que este material fue inútil y que la cantidad de bacterias sobrepasaba realizar un conteo, no se graficó la cinética de inhibición, pues no existió como se observa en la **Tabla 15**. Tabla de cinética de la inhibición de *S. typhi*.

Tabla 15. Tabla de cinética de la inhibición de *S. typhi*.

(I)-ZnAlNO ₃ -AMX-NaOH			
<i>S. typhi</i>			
Tiempo			
0 min	15 min	30 min	60 min
120 min		180min	

Aunque en dicho caso no existió inhibición aparente por lo que se descartó usar amoxicilina para enfrentarse contra de *S. typhi*, lo que si se percibió fue que no existió resistencia por crecimiento de colonias satélite, es decir, colonias con el gen AmpC que hidrolizan el antibiótico.

8.7.2.2 (I)-ZnAl-NO₃-EM-NaOH contra *E. coli*

El material ZnAlNO₃-EM sintetizado por el método de intercambio iónico, logró una inhibición completa de la bacteria *E. coli*. Inicio con una cantidad de 8.78 log₁₀ CFU/mL de bacteria en el min 0, destacando que hubo un ligero incremento entre el min 15 y 30, que puede deberse a la cantidad de las colonias por placa, posteriormente a partir de la primera hora hubo reducción considerable de colonias, en la tercera hora, no se registraron colonias presentes.

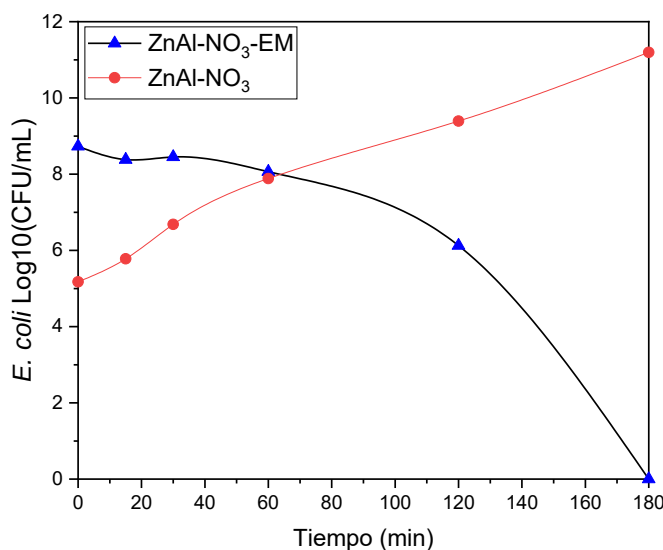


Figura 35. Cinética de inhibición de *E. coli* usando (I)-ZnAlNO₃-EM

Por otra parte, a partir de las 3 h no se detectan colonias, como se observa en Figura 35. Cinética de inhibición de *E. coli* usando (I)-ZnAlNO₃-EM por lo que se toma como 0, cabe destacar que la lectura se tomó después de las 48 h, porque esto permite que se terminen de desarrollar posibles colonias que no aparecerían después de 24 h de haber inoculado, es por ello que el conteo se debe de realizar al pasar dicho tiempo para obtener resultados precisos. Se puede notar también que las colonias aparecen un poco difuminadas en el agar, esto probablemente se deba a la interacción con el fármaco, que pudiera estar afectado la estructura celular y que provocará que liberaran su

contenido intracelular de forma exógena. Antes de probar el material en la cinética, fue necesario evaluarlo en la superficie al enfrentarlo de forma directa en un método de autoría propia, como se puede observar en la Figura 36. Inhibición de *E. coli* por zona usando $ZnAlNO_3$ -EMel material $ZnAl-NO_3$ -EMS inhibe el crecimiento de *E. coli* en placa sólida.

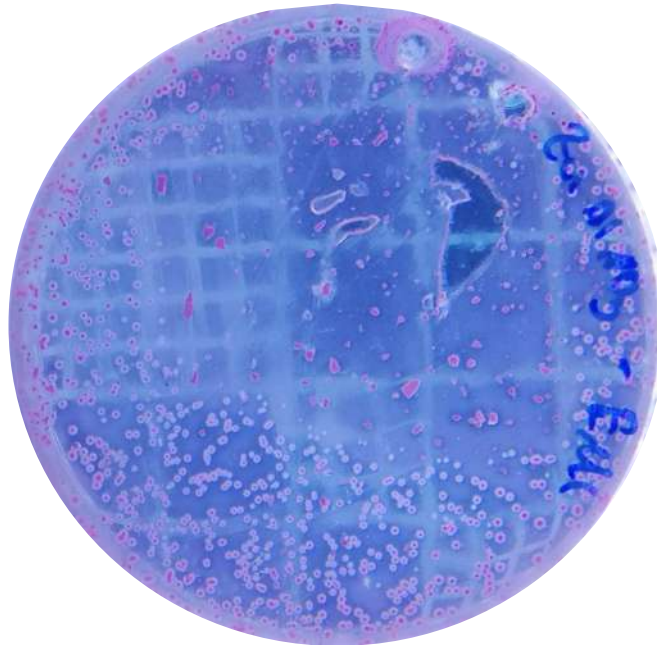
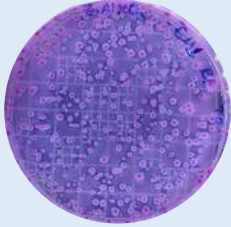
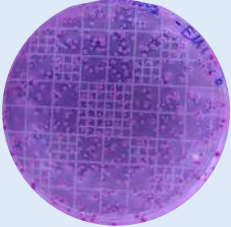
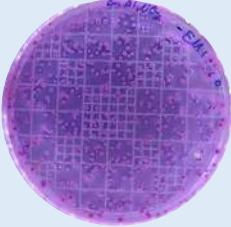
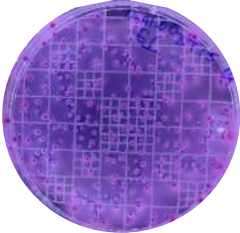
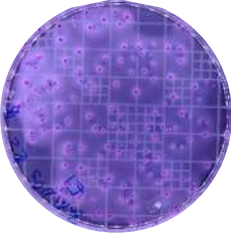
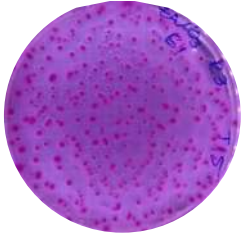
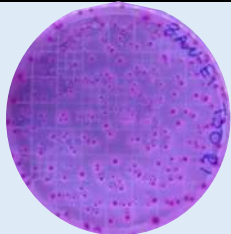
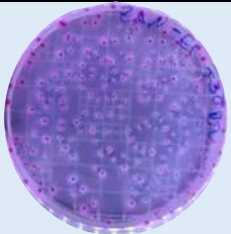
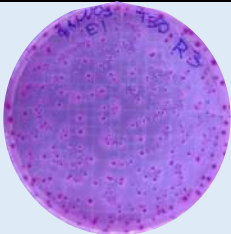
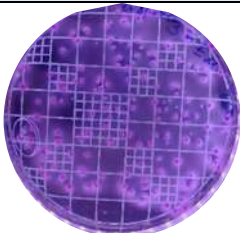
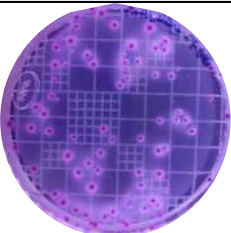
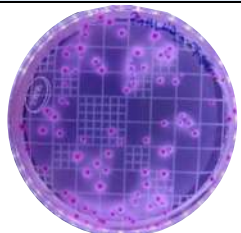
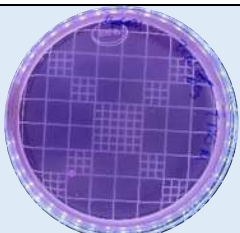
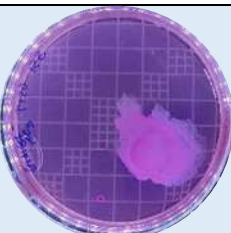
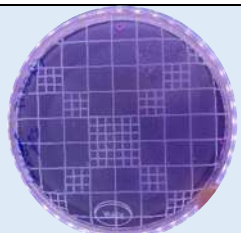
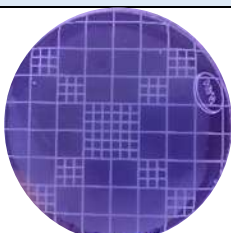
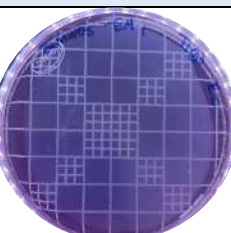
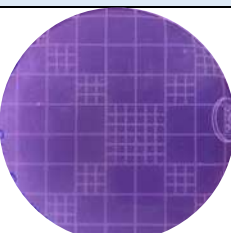


Figura 36. Inhibición de *E. coli* por zona usando $ZnAlNO_3$ -EM

Por otra parte, una vez confirmada a la acción del material se procedió a realizar la cinética de inhibición mostrada en la **Tabla 16**. Triplicado de cinética de inhibición de *E. coli* usando $ZnAl-NO_3$ -EM en AMC.

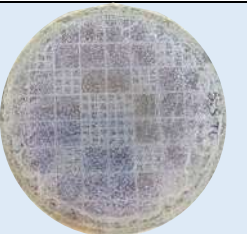
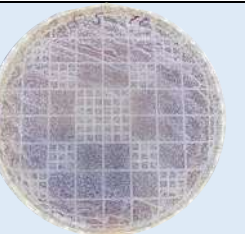
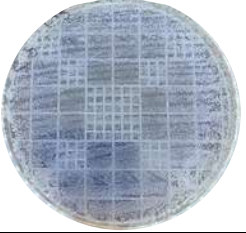
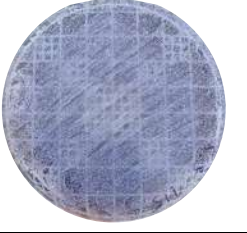
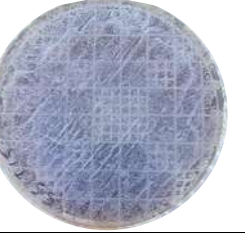
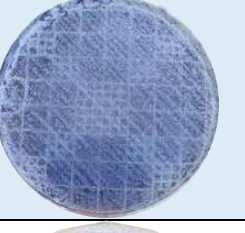
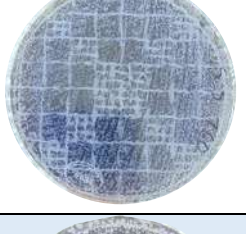
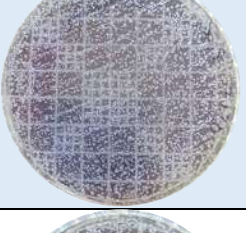
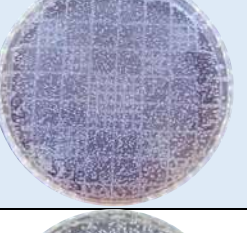
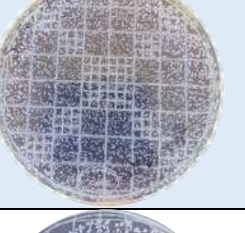
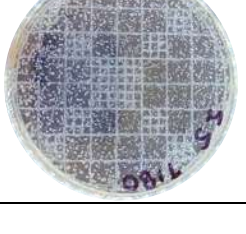
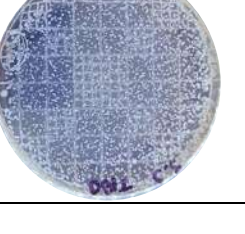
La CMI y CMB fue de 0.05 g es decir 500 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo la concentración real de antibiótico dentro del material es de 86 $\mu\text{g/mL}$ (Apéndice A)

Tabla 16. Triplicado de cinética de inhibición de *E. coli* usando ZnAl-NO₃-EM en AMC

Tiempo (min)	<i>E. coli</i> R1	<i>E. coli</i> R2	<i>E. coli</i> R3
0			
15			
30			
60			
120			
180			

8.7.2.3 (I)-ZnAlNO₃-AMX-NaOH contra *S. sonnei*

Tabla 17. Comparativa de enfrentamiento con distintas cantidades usando ZnAl-NO₃-AMX con NaOH

Tiempo	(I)-ZnAlNO ₃ -AMX-NaOH		
	Tubo		
	(1) 0.05 g	(2) 0.01 g	(3) 0.015 g
0			
15			
30			
60			
120			
180			

Debido a que el material tampoco logro la inhibición de *S. typhi*, no se pudo contabilizar la cantidad de células después de 3 h de haberse expuesto. A partir del min 120, se empiezan a notar cambios en las cantidades presentes de las colonias, sin embargo, son demasiadas para ser contadas; al principio se pensaba que el material no tenía efecto sobre la bacteria, sin embargo, se decidió tomar la lectura después de 24 h (Figura 37. *S. typhi* en contacto con ZnAl-NO₃-AMX después de 24 h parece haber inhibición.), y el resultado fue sorprendente. La CMI fue de 0.05 g y CMB del material fue de 0.01 g.

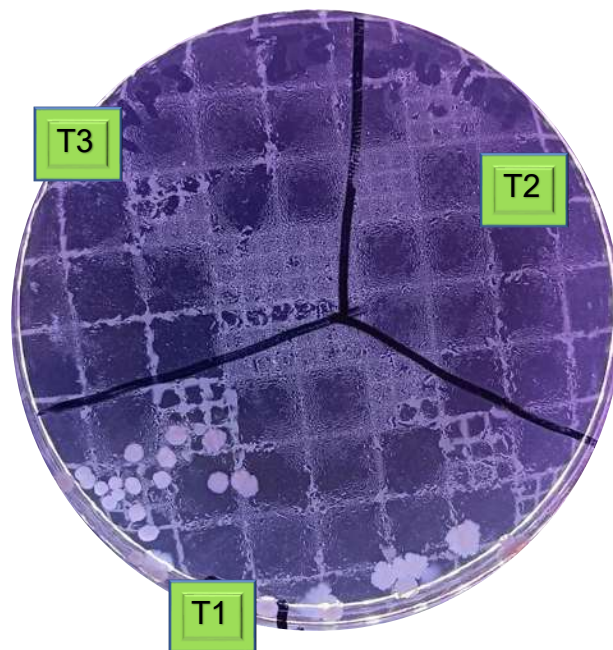


Figura 37. *S. typhi* en contacto con ZnAl-NO₃-AMX después de 24 h parece haber inhibición. Sin embargo, no fue tan efectivo como el material sintetizado con estreptomicina pero confirma que el material se libera paulatinamente.

8.7.2.4 (I)-ZnAl-NO₃-EM-NaOH contra *S. sonnei*

Usando estreptomicina, si existió inhibición, usando 0.05 g de material, representa la CMI y CMB por lo que la cinética queda de la siguiente forma mostrada en la Figura 38. Cinética de inhibición de *S. sonnei* usando ZnAl-NO₃-EMS observando así la tendencia a la baja, que indica la inhibición y la eliminación de la bacteria en el medio líquido, destacando así al único material que logró su completa aniquilación, debido a la EMS.

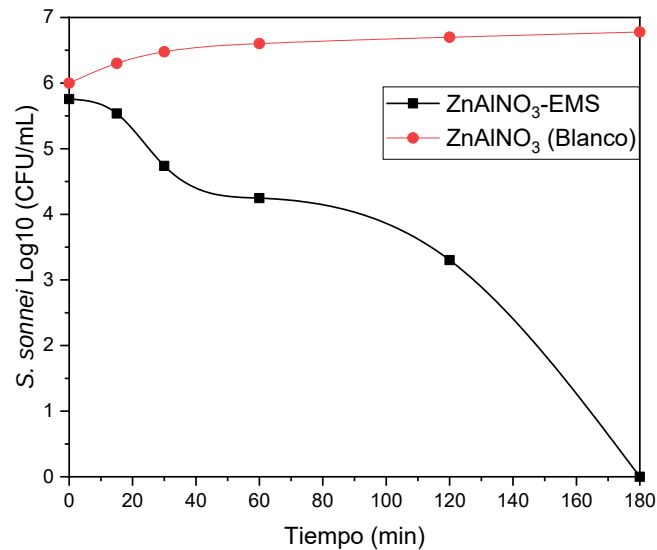
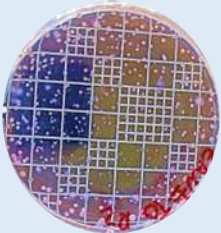
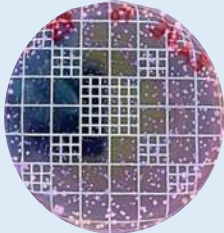
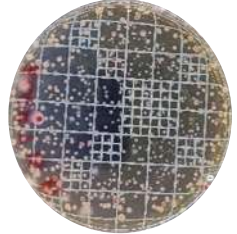
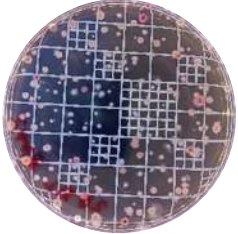
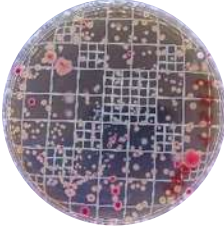
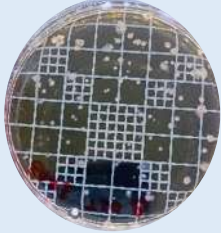
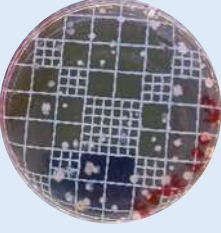
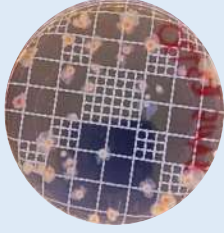
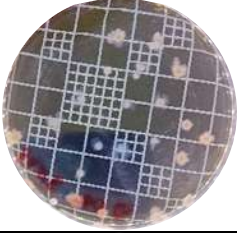
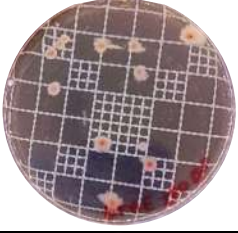
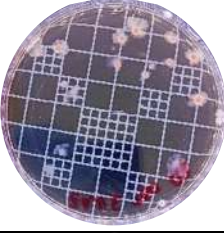
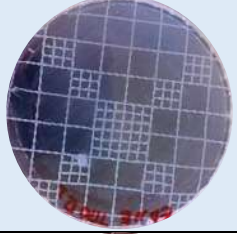
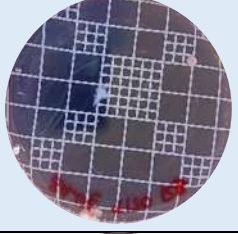
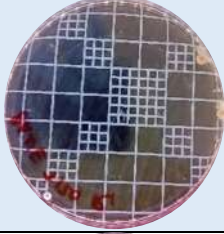
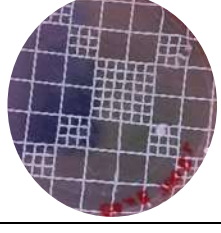
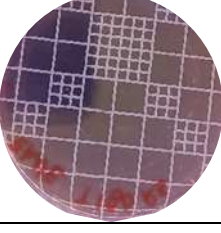
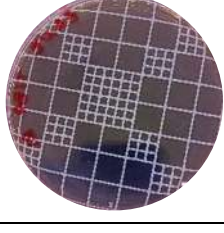


Figura 38. Cinética de inhibición de *S. sonnei* usando ZnAl-NO₃-EMS

Todos los tubos dieron buen resultado, de hecho, como se observa en la **Tabla 18**. Cinética de inhibición usando ZnAlNO₃-EMS-NaOH con distintas cantidades., las colonias en el min 120, eran las mismas cantidades para los 3 tubos, por lo que se puede concluir que la CMI fue de 0.05 g y CMB fue de 0.1 g de material híbrido. Por ello, se utilizó este material en el bioplástico y usarlo para recubrir las superficies.

Tabla 18. Cinética de inhibición usando $\text{ZnAlNO}_3\text{-EMS-NaOH}$ con distintas cantidades.

Tiempo	(I)- $\text{ZnAlNO}_3\text{-EM-NaOH}$ contra <i>S. sonnei</i>		
	Tubo		
	(1) 0.05 g	(2) 0.01 g	(3) 0.015 g
0			
15			
30			
60			
120			
180			

8.7.2.5 (I)-ZnAlNO₃-EM-NaOH contra *S. typhi*

Dicho material mostro resultados favorables de inhibición al enfrentar directamente el material como se observa en la Figura 43. Cinética de inhibición de ZnAl-EMS por el método de reconstrucción, donde en la parte externa al material, se observan muy pequeñas colonias de la *S. typhi*, que podrían haber sobrevivido ya que no hay una difusión completa de ZnAl sobre el agar, sin embargo muestran un evidente halo de inhibición por lo que se procedió a realizar la cinética de inhibición, mostrada (Tabla 19. Cinética de inhibición de *S. typhi* usando ZnAl-NO₃ con EM) más abajo.

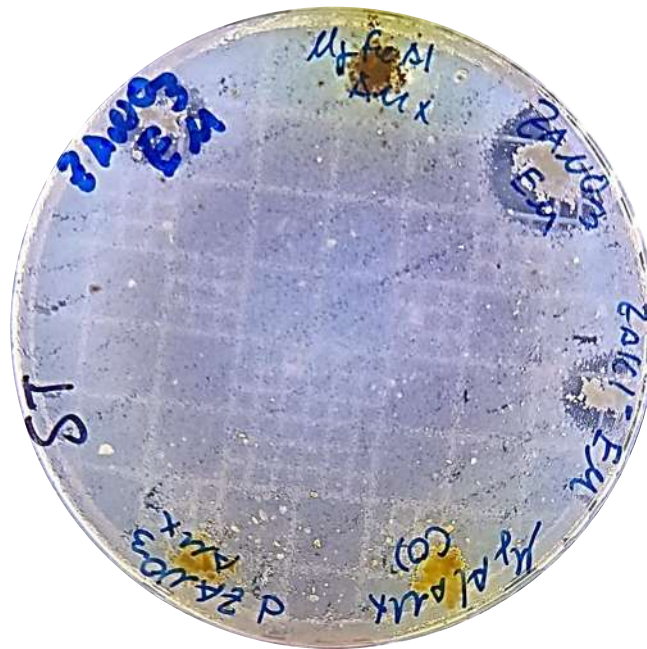
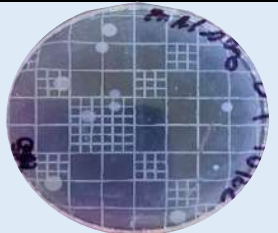
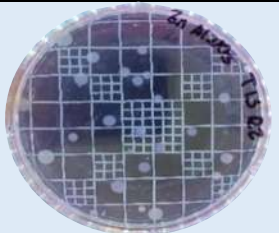
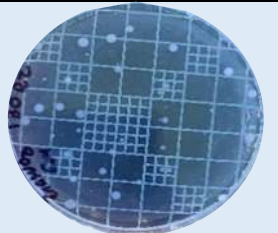
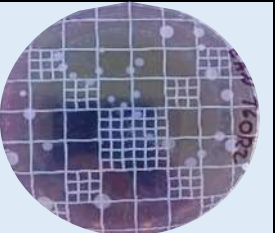
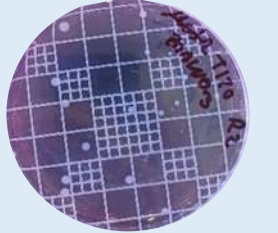
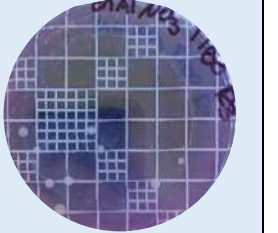


Figura 39. Mostrando inhibición en contra de *S. typhi*, se agregó un ligero filtro para observar mejor los halos de inhibición.

Tabla 19. Cinética de inhibición de *S. typhi* usando ZnAl-NO_3 con EM

(I)- ZnAlNO_3 -EM-NaOH contra <i>S. typhi</i>			
Tiempo			
0 min	15 min	30 min	60 min
			
120 min		180 min	
			

Sin embargo, al enfrentarlo en forma líquida, dicho efecto se vio reducido, aunque si es notoria la inhibición después de 3 h en contacto con el material como se observa en la Figura 40. Cinética de inhibición usando ZnAlNO_3 -EM.

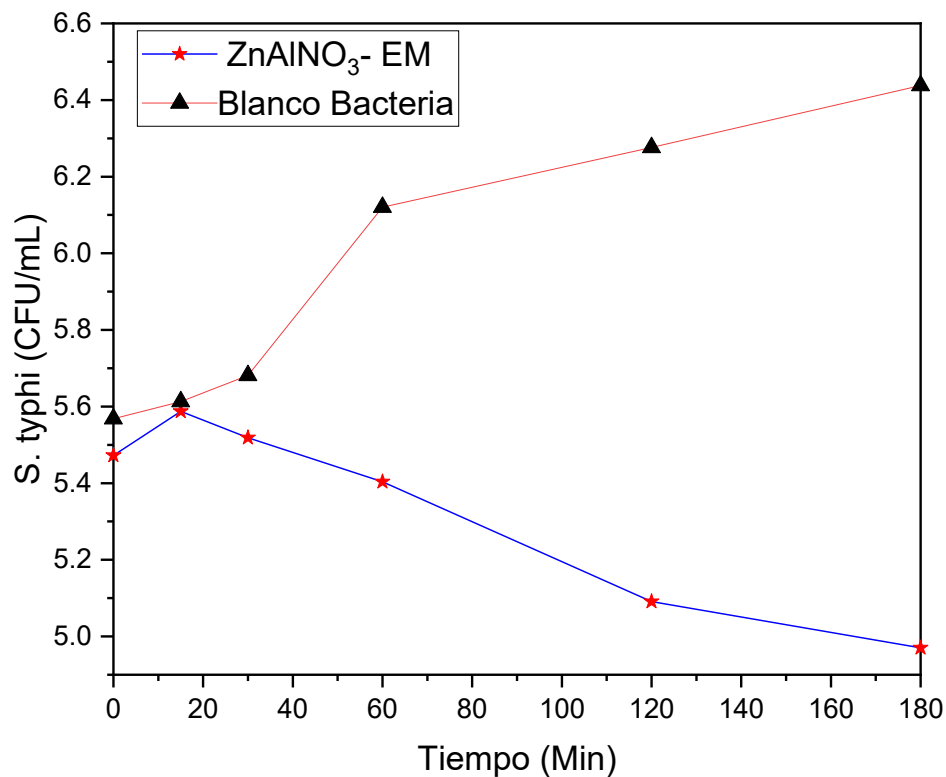


Figura 40. Cinética de inhibición usando ZnAlNO₃-EM

8.7.2.6 (I)-ZnAl-Cl-EM-NaOH contra *E. coli*

Otro material que también logró la inhibición completa de la bacteria fue ZnAlCl-EM. En este material no se observó un incremento como en aquel sintetizado con nitratos, sin embargo la inhibición no fue tan prometedora en su forma solida como se observa en la Figura 41. Inhibición solida usando ZnAlCl-EM contra *E. coli*.

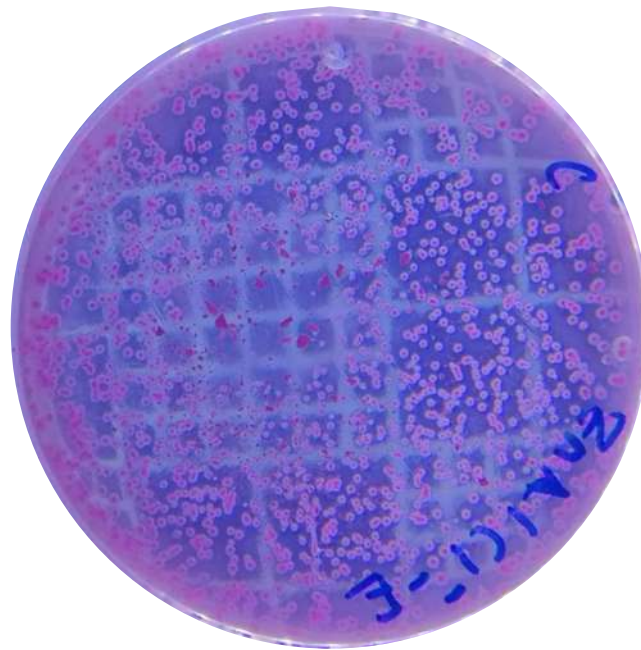
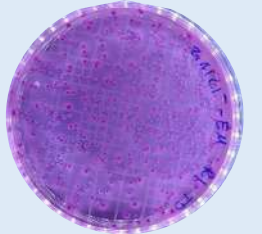
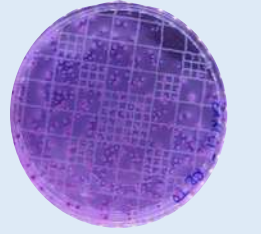
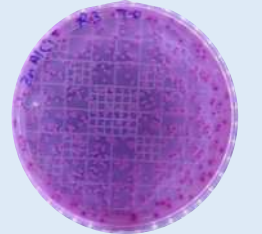
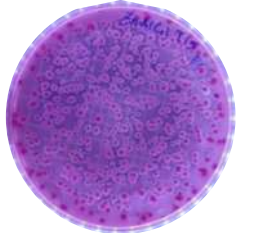
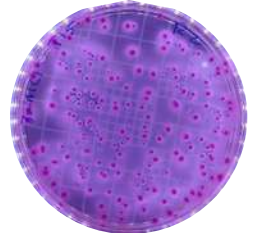
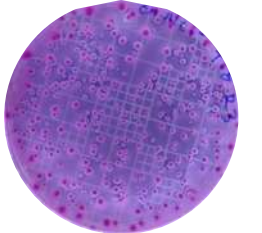
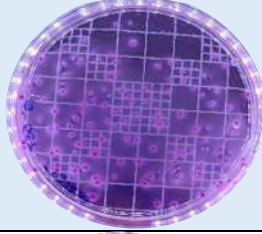
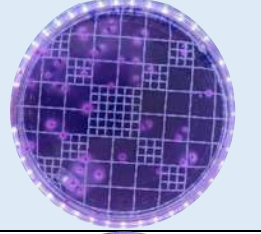
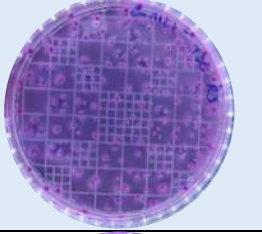
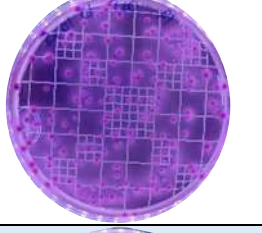
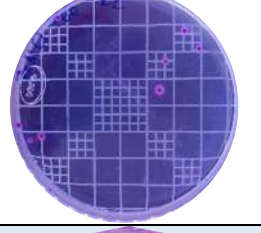
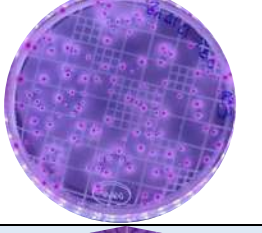
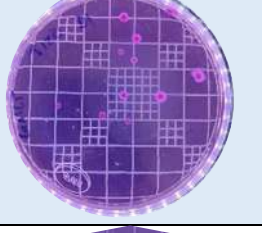
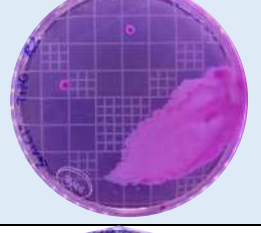
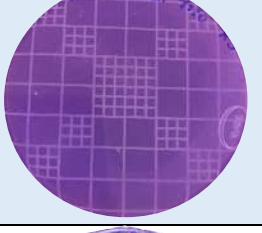
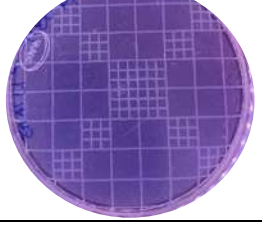
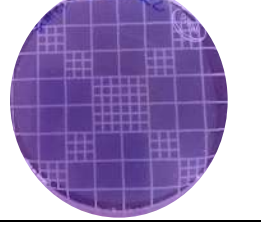
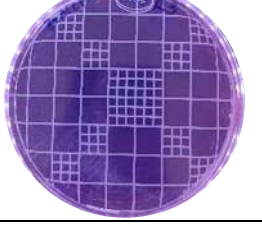


Figura 41. Inhibición sólida usando ZnAlCI-EM contra E. coli.

Como se observó una pequeña inhibición se procedió a realizarlo en forma líquida. Obteniendo así los resultados mostrados en la **Tabla 20**. Triplicado de cinética de inhibición usando ZnAl-CI-EM

Tabla 20. Triplicado de cinética de inhibición usando ZnAl-CI-EM

Tiempo (min)	<i>E. coli</i> R1	<i>E. coli</i> R2	<i>E. coli</i> R3
0			
15			
30			
60			
120			
180			

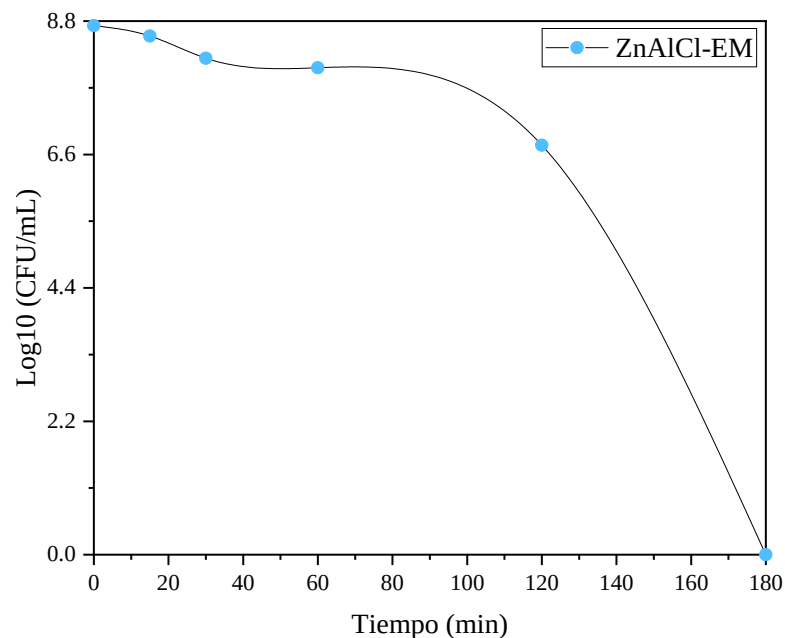


Figura 42. Cinética de inhibición usando (I)-ZnAlCl-EM con *E. coli*

Esto pudo deberse al efecto del anión cloruro, provocaría daño a la bacteria, sin embargo no fue tan eficaz como aquel con NO_3 . En promedio se nota claramente una tendencia a la baja (Figura 42. Cinética de inhibición usando (I)-ZnAlCl-EM con *E. coli*) Por otra parte, a partir de las 3 ho hay solamente una colonia sobreviviente como se observa en la Tabla 15 , por lo que se toma como 0 porque no representa un valor real al tener las otras dos placas libres de colonias, cabe destacar que la lectura se tomó después de las 48 h, porque esto permite que se terminen de desarrollar posibles colonias que no aparecerían después de 24 h de haber inoculado, es por ello que el conteo se debe de realizar al pasar dicho tiempo para obtener resultados precisos.

8.7.2.7 (R)-ZnAl-EM-NaOH contra *E. coli*

Como se puede observar en la Figura 43. Cinética de inhibición de ZnAl-EMS por el método de reconstrucción El material ZnAl sintetizado por el método de reconstrucción con EM y NaOH, logró inhibir el crecimiento de *E. coli* a partir del min 120. Este sin duda, fue el mejor material que ha logrado una inhibición tan rápida.

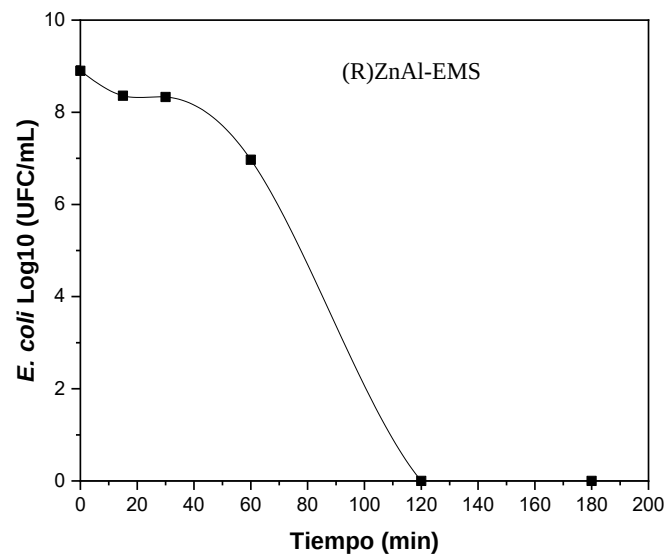
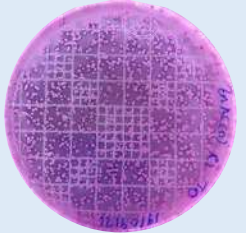
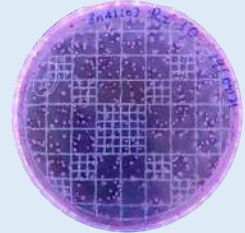
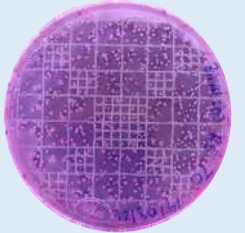
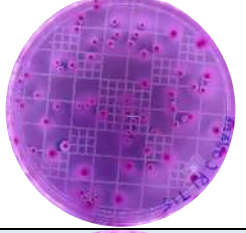
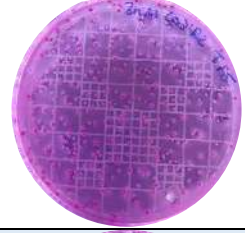
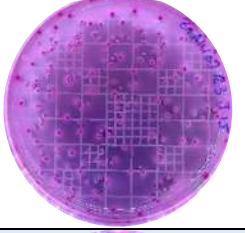
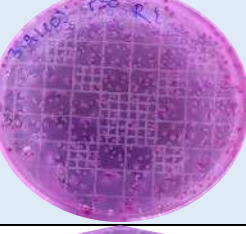
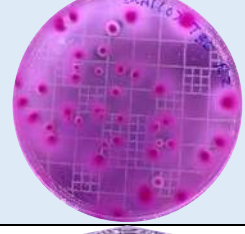
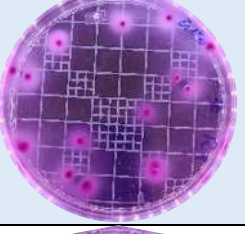
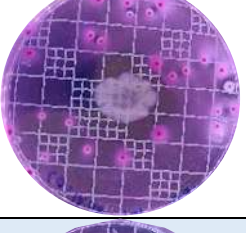
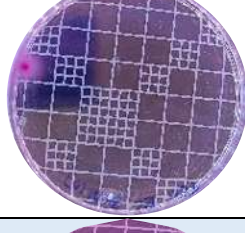
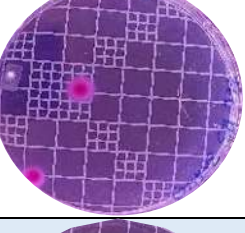
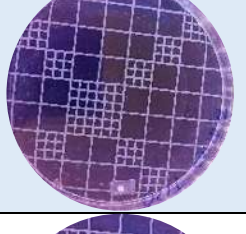
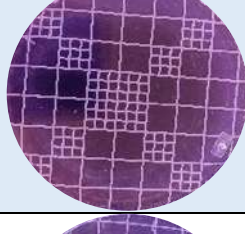
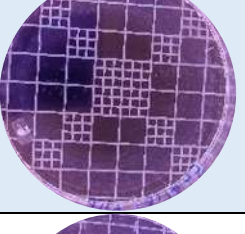
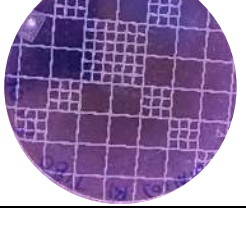
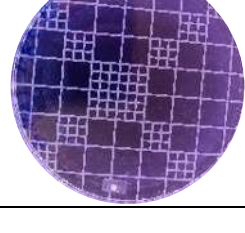
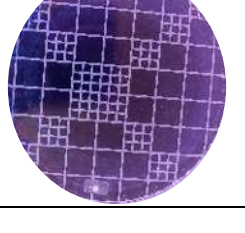


Figura 43. Cinética de inhibición de ZnAl-EMS por el método de reconstrucción

En la Tabla 16, la inhibición mostraba signos a partir del min 15, sin embargo, fue hasta el min 60 que el número de colonias descendió drásticamente. Esto puede ser por el hecho de que las bacterias no habían liberado suficiente fármaco para su total aniquilación. Las imágenes de la Tabla 17, son de placas Petri con 48 h de incubación, por lo que el valor que está representado es completamente certero.

Tabla 21. Triplicado de cinética de (R)-ZnAl-EM-NaOH

Tiempo (min)	<i>E. coli</i> R1	<i>E. coli</i> R2	<i>E. coli</i> R3
0			
15			
30			
60			
120			
180			

Esta teoría se respalda con la siguiente **Figura 44**. Mostrando una colonia amorfa con liberación de pequeñas células en el agar MacConkey. La foto fue tomada a color pero se le puso un filtro de blanco y negro para que se observara mejor dicho fenómeno., como se puede observar, la estreptomicina también causa daños en la morfología de la colonia que a su vez, va liberando células por el agar, de hecho se puede observar una ligera difusión de miles o millones de células como se teorizó anteriormente.

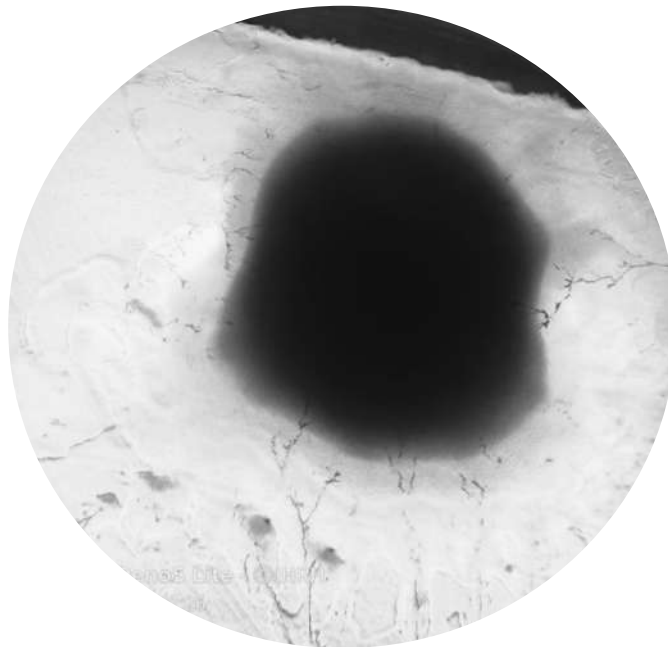


Figura 44. Mostrando una colonia amorfa con liberación de pequeñas células en el agar MacConkey. La foto fue tomada a color pero se le puso un filtro de blanco y negro para que se observara mejor dicho fenómeno.

Así mismo en la **Figura 46**. Cinética de inhibición de *E. coli* usando $MgAlCl_2$ - EMS- NaOH., está presente la lisis colonial, como se puede observar, la glucocálix ha sido destruida y está empezando a liberar células al agar en conjunto a los exopolisacáridos, proteínas y azúcares al medio ([Romero, Hurtado y Iregui., 2010](#))

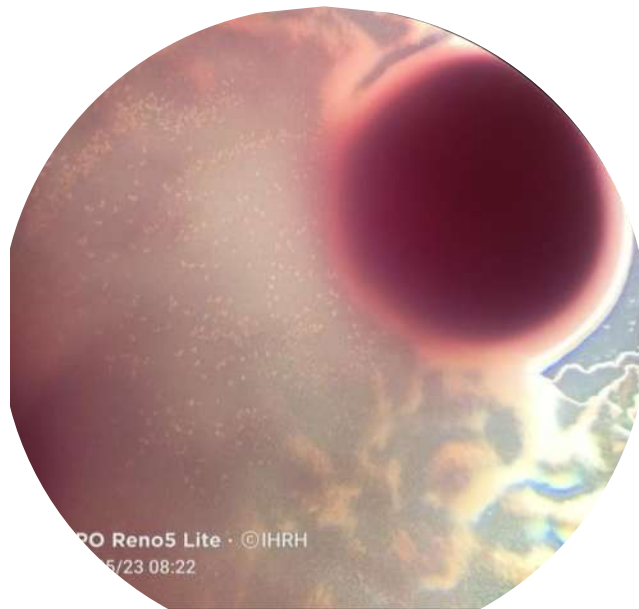


Figura 45. Posible apoptosis o necrosis y liberación de líquido celular en el medio junto con miles o millones de células de *E. coli*, vista en el microscopio invertido a 10x.

8.7.2.8 MgAl-CI-EM

Este material presenta una inhibición parcial sobre *E. coli*, esto puede deberse a la cantidad presente de MBA en el material como se discutió en la parte de síntesis, lo que comprueba de que los iones CO_3 están ocupando la mayor cantidad de espacio y que solo hay una fracción de fármaco intercalado en algunas partes del material como se aprecia en la Figura 46. Cinética de inhibición de *E. coli* usando MgAlCl_2 -EMS-NaOH.

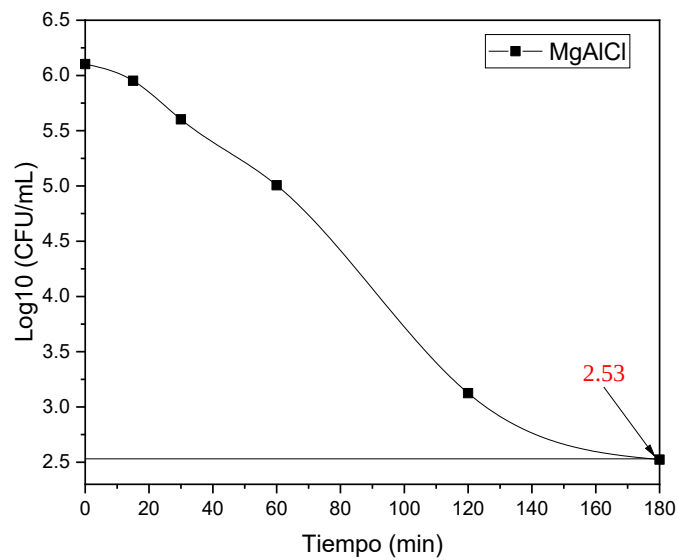
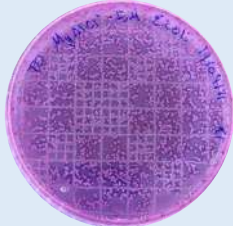
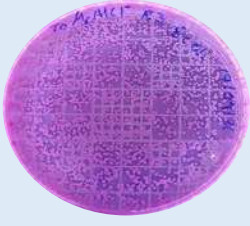
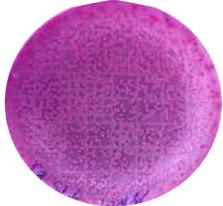
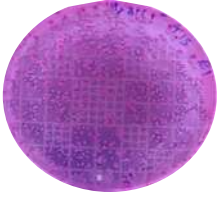
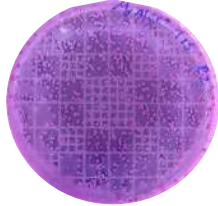
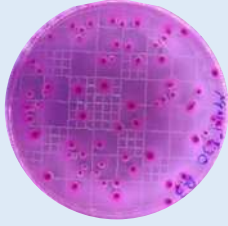
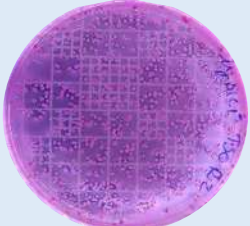
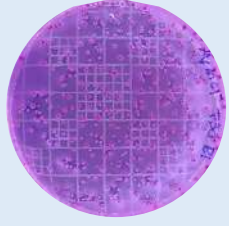
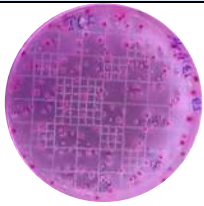
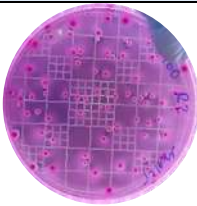
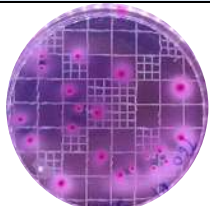
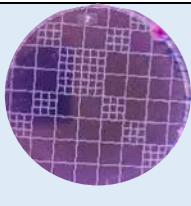
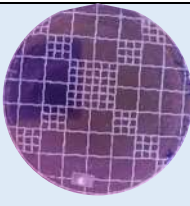
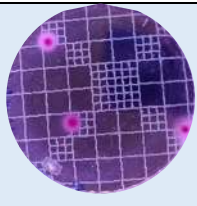
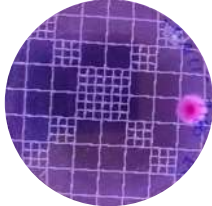
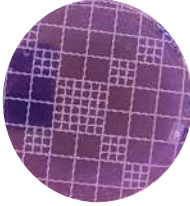
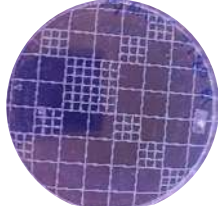


Figura 46. Cinética de inhibición de *E. coli* usando $MgAlCl$ - EMS-NaOH.

Es por ello que el material no es viable para enfrentar a las bacterias antes del min 180.

Por lo que su posterior uso queda descartado como se ve en la Figura 46.

Tabla 22. Comparativa de la cinética de inhibición de *E. coli* usando $MgAl_2Cl$ -EMS

Tiempo (min)	<i>E. coli</i> R1	<i>E. coli</i> R2	<i>E. coli</i> R3
0			
15			
30			
60			
120			
180			



8.7.3 Elaboración de bioplástico

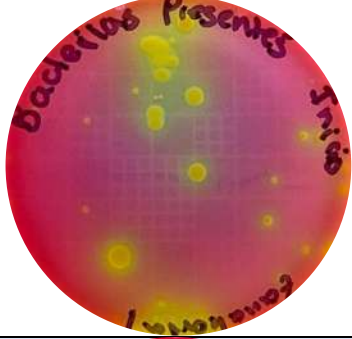
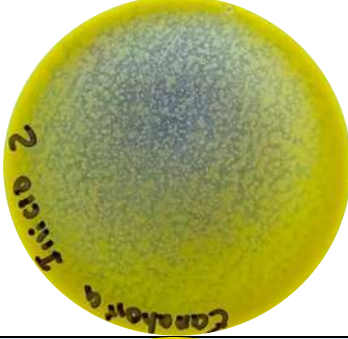
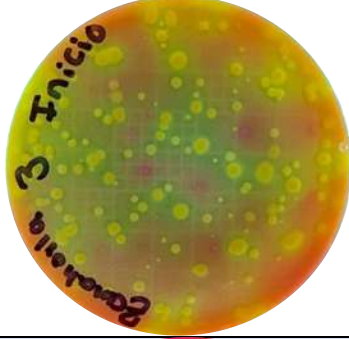
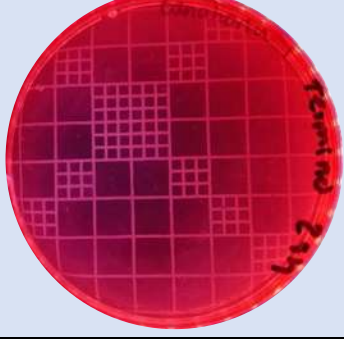
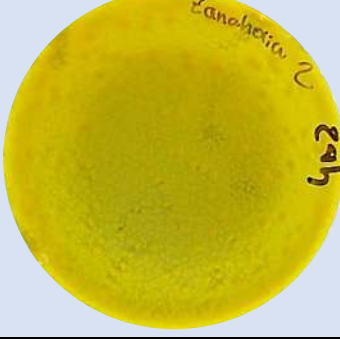
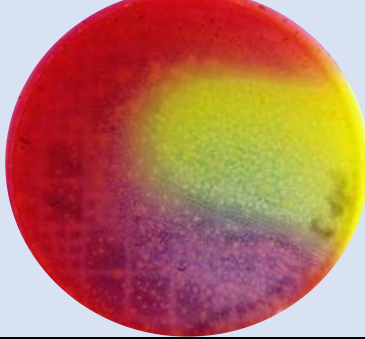
El bioplástico se sintetizó por la metodología de Alvares Cortes, sin embargo, está fue modificada debido a que se encontraron mejores resultados en cuanto a la resistencia del material y la manera de obtenerlo. Las cantidades que se usaron fueron: 0.2 g de alginato de sodio, 0.1 g de agar-agar, 0.160 g de alcohol polivinílico, 0.014 g de goma arábica en 196 mL de H₂O, posteriormente se sometió a agitación constante y a una temperatura de calentamiento de 95 °C por 30 min. A continuación se transfirió a un embudo con un filtro hecho de gasa estéril, pasándolo una sola vez por dicho filtro y recolectándolo en un vaso de precipitados de 250 mL. Se procedió a añadir 0.150 g de material híbrido en conjunto al líquido y se agito con ayuda del Vortex, como por la acción del vortex se generaron burbujas, éstas fueron eliminadas usando un encendedor. Se transfirió a un molde de silicona y se dejó secar a 45 °C por 24 h.

Una vez seco, simplemente se recolectó con ayuda de unas pinzas pequeñas y se depositaron en placas inoculadas con *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*. Otra parte fue destinada a ser probada en el recubrimiento de la zanahoria.

8.7.3.1 Evaluación biológica del biomaterial sobre la Zanahoria.

Se procedió a tomar muestras por triplicado del recubrimiento sin haber sido expuesto a las bacterias las cuales se estriaron en agar XLD, así mismo a cada zanahoria se le aplicó el biomaterial y con ayuda de un hisopo estéril, cargado con un poco de agua estéril, se procedió a pegar sobre la superficie de la zanahoria. Después a cada zanahoria se le adicionó inóculo de bacteria y se dejó en incubación a 37 °C por 24 h. Las zanahorias se adquirieron en el mercado local (Mercado Independencia, Morelia, Michoacán). Posteriormente se encontró que 2 zanahorias habían sufrido transformación, aparentemente no solo por las bacterias, si no por los posibles hongos que hubieran estado presente como se observa en la Tabla 23.

Tabla 23. Comparativa del bioplástico en la superficie de la zanahoria

Bacterias			
Tiempo	(1) <i>E. coli</i>	(2) <i>S. typhi</i>	(3) <i>S. sonnei</i>
0 h			
24 h			
0 h			
24 h			



Es notoria la eliminación de bacterias en la Zanahoria 1, sin embargo en la Zanahoria 2 y 3 también hubo eliminación pero de las bacterias añadidas, quizá por competencia con las otras bacterias que habitaban antes, esto es porque *S. typhi* crece de color negro en dicho agar y *S. sonnei* crece de color traslucido, similar al agar, las bacterias que se encuentran en la zanahoria 3 podrían ser *Pseudomona aeruginosa*, una bacteria patógena que viaja por el aire, y en XLD su color es rosado.

9. Conclusiones

1. Se lograron sintetizar materiales de ZnAl y MgAl por el método de la urea y de coprecipitación a baja saturación, así mismo se logró sintetizar una gran cantidad de materiales híbridos por el método de intercambio iónico.
2. Los materiales híbridos sintetizados con KOH, mostraron una intercalación inefectiva sin embargo resulto ayudar a la impregnación del fármaco sobre el material a diferencia de aquellos materiales sintetizados con NaOH donde si se intercalaron satisfactoriamente.
3. El material híbrido que mostró mejores resultados en contra de las bacterias fue ZnAl-NO₃-EM.
4. Las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* CDC 99 y *Shigella sonnei* ATCC 9290, presentaron resistencia contra las moléculas AMX y EMS no obstante, al usar los materiales híbridos esta resistencia cedió significativamente.
5. Las CMI y CMB de *E. coli* usando ZnAlNO₃-EMS fue de 0.005 g mientras que para *S. sonnei* la CMI fue de 0.05 g y la CMB fue de 0.01 g y para *S. typhi* fue la CMI y CMB fue de 0.1 g.
6. La EM fue más eficiente en la inhibición y eliminación de todas las bacterias probadas.
7. El frotis microscópico revela como interactúa el material con las bacterias, pero no muestra un seguimiento continuo de la eliminación, no obstante, nos da una idea de que es lo que está pasando entre la bacteria y el material.
8. El uso de estos materiales puede ser presentado ser idóneo para intercalar cualquier tipo de molecular cargada negativamente.



10. Referencias

1. Adam, N., Mohd Ghazali, S. A. I. S., Dzulkifli, N. N., Hak, C. R. C., & Sarijo, S. H. (2019). Intercalations and characterization of zinc/aluminium layered double hydroxide-cinnamic acid. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 14(1), 165–172. <https://doi.org/10.9767/bcrec.14.1.3328.165-172>
2. Akmalayah, M. (2013). Revista de tendencias Químicas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
3. Al-Masaudi, S. B., Hussain, M. B., Al-Maaqar, S. M., Al Jaouni, S., & Harakeh, S. (2020). In vitro antibacterial activity of honey against multidrug-resistant *Shigella sonnei*. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 41(October), 101257. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101257>
4. Anghel, I., Grumezescu, A. M., Holban, A. M., Gheorghe, I., Vlad, M., Anghel, G. A., Balaure, P. C., Chifiriuc, C. M., & Ciuca, I. M. (2013). Improved activity of aminoglycosides entrapped in silica networks against microbial strains isolated from otolaryngological infections. *Farmacia*, 62(1), 69–78.
5. Armoa, J. (2020). *Producción de exopolisacáridos a partir de bacterias ácido lácticas utilizando una de maíz como fuente de carbono*. 120. https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/BECA02-38_Jissel Armoa.pdf
6. Awasthi, R., Kulkarni, G. T., Pawar, V. K., & Garg, G. (2012). Optimization studies on gastroretentive floating system using response surface methodology. *AAPS PharmSciTech*, 13(1), 85–93. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9730-y>
7. Baranowska-Wójcik, E., Szwajgier, D., Oleszczuk, P., & Winiarska-Mieczan, A. (2020). Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review. *Biological Trace Element Research*, 193(1), 118–129. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01706-6>
8. Benício, L. P. F., Silva, R. A., Lopes, J. A., Eulálio, D., dos Santos, R. M. M., De Aquino, L. A., Vergütz, L., Novais, R. F., Da Costa, L. M., Pinto, F. G., & Tronto, J. (2015). Layered double hydroxides: Nanomaterials for applications in agriculture | Hidróxidos duplos lamelares: Nanomateriais para aplicações na agricultura. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 39(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/01000683rbc20150817>
9. Benício, L. P. F., Constantino, V. R. L., Pinto, F. G., Vergütz, L., Tronto, J., & Da Costa, L. M. (2017). Layered Double Hydroxides: New Technology in Phosphate Fertilizers Based on Nanostructured Materials. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(1), 399–409. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01784>
10. Bernardo, M. P., Guimarães, G. G. F., Majaron, V. F., & Ribeiro, C. (2018). Controlled Release of Phosphate from Layered Double Hydroxide Structures: Dynamics in Soil and Application as Smart Fertilizer. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(4), 5152–5161. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04806>



11. Bouali, A. C., Iuzviuk, M. H., Serdechnova, M., Yasakau, K. A., Wieland, D. C. F., Dovzhenko, G., Maltanova, H., Zobkalo, I. A., Ferreira, M. G. S., & Zheludkevich, M. L. (2020). Zn-Al LDH growth on AA2024 and zinc and their intercalation with chloride: Comparison of crystal structure and kinetics. *Applied Surface Science*, 501(November), 144027. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144027>
12. Bugatti, V., Vertuccio, L., Zuppari, F., Vittoria, V., & Gorrasi, G. (2019). Pet and active coating based on a Ldh nanofiller hosting p-hydroxybenzoate and food-grade zeolites: Evaluation of antimicrobial activity of packaging and shelf life of red meat. *Nanomaterials*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nano9121727>
13. Bukhtiyarova, M. V. (2019). A review on effect of synthesis conditions on the formation of layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 269(June 2018), 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.10.018>
14. Cescutti, P. (2010). Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (First edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00006-7>
15. Chaillot, D., Bennici, S., & Brendlé, J. (2021). Layered double hydroxides and LDH-derived materials in chosen environmental applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(19), 24375–24405. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08498-6>
16. Choi, S. J., Oh, J. M., & Choy, J. H. (2009). Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(3), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.017>
17. Choy, J. H., Choi, S. J., Oh, J. M., & Park, T. (2007). Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Applied Clay Science*, 36(1–3), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.07.007>
18. Contents, T. O. F. (2014). *MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING : B Advanced Functional Solid-State Materials AUTHOR INFORMATION PACK*. May, 1–12.
19. Conterposito, E., Gianotti, V., Palin, L., Boccaleri, E., Viterbo, D., & Milanese, M. (2018). Facile preparation methods of hydrotalcite layered materials and their structural characterization by combined techniques. *Inorganica Chimica Acta*, 470, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.08.007>
20. Cortés-Ortiz, I. A., Rodríguez-Angeles, G., Moreno-Escobar, E. A., Tenorio-Lara, J. M., Torres-Mazadiego, B. P., & Montiel-Vázquez, E. (2002). [Outbreak caused by Escherichia coli in Chalco, Mexico]. *Salud Publica de Mexico*, 44(4), 297–302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216516>
21. Costantino, U., Marmottini, F., Nocchetti, M., & Vivani, R. (1998). New Synthetic Routes to Hydrotalcite-Like Compounds – Characterisation and Properties of the Obtained Materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1998(10), 1439–1446. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0682\(199810\)1998:10<1439::aid-ejic1439>3.3.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0682(199810)1998:10<1439::aid-ejic1439>3.3.co;2-t)
22. Darmograi, G., Prelot, B., Geneste, A., Martin-Gassin, A., Salles, F., & Zajac, J. (2016). How does competition between anionic pollutants affect adsorption onto Mg-Al layered double hydroxide? Three



- competition schemes. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(19), 10410–10418. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01888>
23. Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2018). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74–87. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>
24. Ding, T., Lin, K., Chen, J., Hu, Q., Yang, B., Li, J., & Gan, J. (2018). Causes and mechanisms on the toxicity of layered double hydroxide (LDH) to green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Science of the Total Environment*, 635, 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.222>
25. Djebbi, M. A., Elabed, A., Bouaziz, Z., Sadiki, M., Elabed, S., Namour, P., Jaffrezic-Renault, N., & Amara, A. B. H. (2016). Delivery system for berberine chloride based on the nanocarrier ZnAl-layered double hydroxide: Physicochemical characterization, release behavior and evaluation of anti-bacterial potential. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.089>
26. Duquesne, E., Betelu, S., Bazin, C., Seron, A., Ignatiadis, I., Perrot, H., Sel, O., & Debiemme-Chouvy, C. (2020). Insights into Redox Reactions and Ionic Transfers in Nickel/Iron Layered Double Hydroxide in Potassium Hydroxide. *Journal of Physical Chemistry C*, 124(5), 3037–3049. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09699>
27. Dutta, S., Jana, T. K., Halder, S. K., Maiti, R., Dutta, A., Kumar, A., & Chatterjee, K. (2020). Zn₂Al-CO₃ Layered Double Hydroxide: Adsorption, Cytotoxicity and Antibacterial Performances. *ChemistrySelect*, 5(20), 6162–6171. <https://doi.org/10.1002/slct.202001264>
28. Elmoubarki, R., Mahjoubi, F. Z., Elhalil, A., Tounsadi, H., Abdennouri, M., Sadiq, M., Qourzal, S., Zouhri, A., & Barka, N. (2017). Ni/Fe and Mg/Fe layered double hydroxides and their calcined derivatives: Preparation, characterization and application on textile dyes removal. *Journal of Materials Research and Technology*, 6(3), 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2016.09.007>
29. Forano, C., Bruna, F., Mousty, C., & Prevot, V. (2018). Interactions between Biological Cells and Layered Double Hydroxides: Towards Functional Materials. *Chemical Record*, 18(7), 1150–1166. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700102>
30. Galvão, T. L. P., Neves, C. S., Caetano, A. P. F., Maia, F., Mata, D., Malheiro, E., Ferreira, M. J., Bastos, A. C., Salak, A. N., Gomes, J. R. B., Tedim, J., & Ferreira, M. G. S. (2016). Control of crystallite and particle size in the synthesis of layered double hydroxides: Macromolecular insights and a complementary modeling tool. *Journal of Colloid and Interface Science*, 468. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.038>
31. Gómez Eichelmann, C. (2006). Respuesta celular a estrés. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 162.



32. González R, G., Mella M, S., Zemelman Z, R., Bello T, H., & Domínguez Y, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Medica de Chile*, 132(5), 619–626. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872004000500013>
33. Gorrasi, G., & Bugatti, V. (2016). Mechanical dispersion of layered double hydroxides hosting active molecules in polyethylene: Analysis of structure and physical properties. *Applied Clay Science*, 132–133, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.03.011>
34. Gorrasi, G., & Bugatti, V. (2016). Mechanical dispersion of layered double hydroxides hosting active molecules in polyethylene: Analysis of structure and physical properties. *Applied Clay Science*, 132–133, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.03.011>
35. Gorrasi, G., & Sorrentino, A. (2020). 18. Layered double hydroxide polymer nanocomposites for food-packaging applications. In *Layered Double Hydroxide Polymer Nanocomposites*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101903-0.00018-0>
36. Hutchings, C., Yair, Z. P., Reifen, R., & Shemesh, M. (2021). Antimicrobial effect of zn²⁺ ions governs the microbial quality of donor human milk. *Foods*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods10030637>
37. Ilayaraja, S., Prabakaran, K., & Manivannan, R. (2014). Evaluation of anti-bacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of oncocalyxone A isolated from *Prenanthes sarmentosus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 88–91. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40116>
38. Inayat, A., Klumpp, M., & Schwieger, W. (2011). The urea method for the direct synthesis of ZnAl layered double hydroxides with nitrate as the interlayer anion. *Applied Clay Science*, 51(4), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.01.008>
39. Institucional, P., Biol, C., En, M., Biol, C., Presenta, G., Alvarez, O., Asesora, C., & Mart, E. (2020). *Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo División de Estudios de Posgrado “Elaboración de una biopelícula comestible incorporando nanocápsulas de aceite esencial y extractos polifenólicos de Aloysia citriodora con actividad antiinflamatoria evaluado.*
40. Iversen, J., Sandvang, D., Srijan, A., Cam, P. D., & Dalsgaard, A. (2003). Characterization of antimicrobial resistance, plasmids, and gene cassettes in *Shigella* spp. from patients in vietnam. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 9 Suppl 1. <https://doi.org/10.1089/107662903322541856>
41. Iyobe, S., Kusadokoro, H., Ozaki, J., Matsumura, N., Minami, S., Haruta, S., Sawai, T., & O'Hara, K. (2000). Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8), 2023–2027. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2023-2027.2000>
42. Kidane, A., & Bhatt, P. P. (2005). Recent advances in small molecule drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(4), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.06.006>
43. Kuroda, Y., Miyamoto, Y., Hibino, M., Yamaguchi, K., & Mizuno, N. (2013). Tripodal ligand-stabilized layered double hydroxide nanoparticles with highly exchangeable CO₃²⁻. *Chemistry of Materials*, 25(11), 2291–2296. <https://doi.org/10.1021/cm400846k>



44. Kuthati, Y., Kankala, R. K., & Lee, C. H. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects. *Applied Clay Science*, 112–113, 100–116. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.04.018>
45. Lay, M. C. (1983). Tercera edición. *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio.*, 3, 210. https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual-_Bioseguridad-_junio_2018.pdf
46. Lima, E., Flores, J., Cruz, A. S., Leyva-Gómez, G., & Krötzsch, E. (2013). Controlled release of ferulic acid from a hybrid hydrotalcite and its application as an antioxidant for human fibroblasts. *Microporous and Mesoporous Materials*, 181, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.07.014>
47. Lin, J. J., & Juang, T. Y. (2004). Intercalation of layered double hydroxides by poly(oxyalkylene)-amidocarboxylates: Tailoring layered basal spacing. *Polymer*, 45(23), 7887–7893. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.09.031>
48. Liu, J., Song, J., Xiao, H., Zhang, L., Qin, Y., Liu, D., Hou, W., & Du, N. (2014). Synthesis and thermal properties of ZnAl layered double hydroxide by urea hydrolysis. *Powder Technology*, 253, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.11.007>
49. Liu, J., Song, J., Xiao, H., Zhang, L., Qin, Y., Liu, D., Hou, W., & Du, N. (2014). Synthesis and thermal properties of ZnAl layered double hydroxide by urea hydrolysis. *Powder Technology*, 253, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.11.007>
50. Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J. A., & Fetter, G. (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Applied Clay Science*, 153(May 2017), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.017>
51. López Tévez, L., & Torres, C. (2006). El tamaño, forma y tipos de agrupaciones bacterianas. *Universidad Nacional Del Nordeste, Facultad de Agroindustrias*, 1–12. <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
52. López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L. A., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R., Slah, H., Nadia, M., Mouadh, M., Zouhair, M. B., Ahmed, L., Shen, Y., Zhao, W., Zhang, C., Shan, Y., Shi, J., Springer, B., ... Sander, P. (2017). Degradation of streptomycin in aquatic environment: kinetics, pathway, and antibacterial activity analysis. *African Journal of Biotechnology*, 45(28), 1520–1530. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001>
53. Luzzatto, L., Apirion, D., & Schlessinger, D. (1968). Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(3), 873–880. <https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.873>
54. Lv, F., Xu, L., Zhang, Y., & Meng, Z. (2015). Layered Double Hydroxide Assemblies with Controllable Drug Loading Capacity and Release Behavior as well as Stabilized Layer-by-Layer Polymer



- Multilayers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(34), 19104–19111. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04569>
55. Mahassene, M. (2016). THE INTERCALATION OF Zn/Al HDL BY THE DIAMINO DODECYL PHOPHONIC ACID: SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ADSORPTION OF CADMIUM. *International Journal of Advanced Materials Manufacturing and Characterization*, 6(1), 21–28. <https://doi.org/10.11127/ijammc2016.04.05>
56. Martínez, D. R., & Carbajal, G. G. (2012). Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances En Química*, 7(1), 87–99.
57. Martínez-Alcalá, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibiotics as emerging pollutants. Ecotoxicological risk and control in wastewater and reclaimed water. *Ecosistemas*, 29(3). <https://doi.org/10.7818/ECOS.2070>
58. Matai, I., Sachdev, A., Dubey, P., Uday Kumar, S., Bhushan, B., & Gopinath, P. (2014). Antibacterial activity and mechanism of Ag-ZnO nanocomposite on *S. aureus* and GFP-expressing antibiotic resistant *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.005>
59. Mayer, G., & Hechel, A. (2006). Biologically active molecules with a “light switch.” *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(30), 4900–4921. <https://doi.org/10.1002/anie.200600387>
60. McIver, C. J., White, P. A., Jones, L. A., Karagiannis, T., Harkness, J., Marriott, D., & Rawlinson, W. D. (2002). Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1538–1540. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1538-1540.2002>
61. Michael, G. B., & Schwarz, S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clinical Microbiology and Infection*, 22(12), 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.033>
62. Microorganismos, C. De. (2007). *El IV Seminario sobre Conservación de Cepas*.
63. Mishra, G., Dash, B., & Pandey, S. (2018). Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. In *Applied Clay Science* (Vol. 153). <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.021>
64. Miyata, S. (1983). Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays & Clay Minerals*, 31(4), 305–311. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1983.0310409>
65. Miyata, S. (1975). *THE SYSTEMS MgZ + -A13 + -NO3, MgZ + -A13 + -C1 -, THE SYNTHESSES OF HYDROTALCITE-LIKE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES I*: 23, 369–375.
66. Moaty, S. A. A., Farghali, A. A., & Khaled, R. (2016). Preparation, characterization and antimicrobial applications of Zn-Fe LDH against MRSA. *Materials Science and Engineering C*, 68(3), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.110>
67. Morales, J. (1958). Control microbiológico de antibióticos: Curvas standard, determinación de potencia y preparación de discos para pruebas de sensibilidad. In *Revista Peruana de Medicina*



- Experimental y Salud Pública* (Vol. 12, Issues 1–2, pp. 1–64).
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.1958.121-2.679>
68. Mosangi, D., Moyo, L., Kesavan Pillai, S., & Ray, S. S. (2016). Acetyl salicylic acid-ZnAl layered double hydroxide functional nanohybrid for skin care application. *RSC Advances*, 6(107), 105862–105870. <https://doi.org/10.1039/c6ra22172f>
69. Muro, Loera, Flor, Ramírez, Francisco, Avelar, & Guerrero, A. (2012). Biopelículas multi-especie : asociarse para sobrevivir Multi-species biofilms : association to survive. *Investigacion y Ciencia de La Universidad Autonoma de Aguascalientes*, 20(54), 49–56.
70. Musterman, M., & Placeholder, P. (2018). *Inflammatory Bowel Disease etiology : current knowledge What Is So Different About Was ist so anders am Neuroenhancement ?* 1(2), 206–214.
71. Nacher Vazquez, M., Ibarburu Lopez, I., Notararigo, S., Fernandez de Palencia Delgado, P., Aznar Novella, R., Dueñas Chasco, M. T., & Lopez Garcia, P. (2018). Aplicaciones De Los Exopolisacáridos Producidos Por Bacterias Lácticas En La Calidad Y Funcionalidad De Los Alimentos. 5D, 1–16. http://www.old.cib.csic.es/repositorio_bd/publicacion/4128/urls_documento/5D_Exopolisacaridos_final.pdf
72. OMS. (2004). Laboratory biosafety manual fourth edition. In *World Health Organization*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>
73. Paquin, F., Rivnay, J., Salleo, A., Stingelin, N., & Silva, C. (2015). Multi-phase semicrystalline microstructures drive exciton dissociation in neat plastic semiconductors. *J. Mater. Chem. C*, 3, 10715–10722. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
74. Patil, K. C., Aruna, S. T., & Mimani, T. (2002). Combustion synthesis: An update. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(6), 507–512. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00123-7)
75. Peng, F., Wang, D., Cao, H., & Liu, X. (2018). Loading 5-Fluorouracil into calcined Mg/Al layered double hydroxide on AZ31 via memory effect. *Materials Letters*, 213, 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.11.007>
76. Peng, F., Wang, D., Zhang, D., Cao, H., & Liu, X. (2018). The prospect of layered double hydroxide as bone implants: A study of mechanical properties, cytocompatibility and antibacterial activity. *Applied Clay Science*, 165(May), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.08.020>
77. Peng, F., Wang, D., Zhang, D., Yan, B., Cao, H., Qiao, Y., & Liu, X. (2018). PEO/Mg-Zn-Al LDH Composite Coating on Mg Alloy as a Zn/Mg Ion-Release Platform with Multifunctions: Enhanced Corrosion Resistance, Osteogenic, and Antibacterial Activities. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(12), 4112–4121. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01184>
78. Pereira, M. (2018). Ibero-Americano De Catálise. In *Xxvi Congresso Ibero-Americano De Catálise (Cicat 2018)*.
79. Press, D. (2018). *Controlled release of organic – inorganic nanohybrid : cefadroxil intercalated Zn – Al-layered double hydroxide*. 3203–3222.



80. Qiu, S., Wang, Y., Xu, X., Li, P., Hao, R., Yang, C., Liu, N., Li, Z., Wang, Z., Wang, J., Wu, Z., Su, W., Yang, G., Jin, H., Wang, L., Sun, Y., Yuan, Z., Huang, L., & Song, H. (2013). Multidrug-resistant atypical variants of *Shigella flexneri* in China. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1147–1150. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121221>
81. Raja, S. B., Murali, M. R., & Devaraj, S. N. (2008). Differential expression of ompC and ompF in multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* and *Shigella flexneri* by aqueous extract of *Aegle marmelos*, altering its susceptibility toward β -lactam antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61(3), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.006>
82. Ranjbar, R., & Farahani, A. (2019). *Shigella*: Antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3137–3167. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>
83. Ranjbar, R., & Farahani, A. (2019). *Shigella*: Antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3137–3167. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>
84. Ray, S. S., Mosangi, D., & Pillai, S. (2018). Layered Double Hydroxide-Based Functional Nanohybrids as Controlled Release Carriers of Pharmaceutically Active Ingredients. *Chemical Record*, 18(7), 913–927. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700080>
85. Ray, S. S., Mosangi, D., & Pillai, S. (2018). Layered Double Hydroxide-Based Functional Nanohybrids as Controlled Release Carriers of Pharmaceutically Active Ingredients. *Chemical Record*, 18(7), 913–927. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700080>
86. Rebitski, E. P., Souza, G. P., Santana, S. A. A., Pergher, S. B. C., & Alcântara, A. C. S. (2019). Bionanocomposites based on cationic and anionic layered clays as controlled release devices of amoxicillin. *Applied Clay Science*, 173(September 2018), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.02.024>
87. Roca Jalil, M. E., Baschini, M., & Sapag, K. (2015). Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Applied Clay Science*, 114, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.010>
88. Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 37–45. <https://doi.org/10.19052/mv.783>
89. Ryu, S. J., Jung, H., Oh, J. M., Lee, J. K., & Choy, J. H. (2010). Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 71(4), 685–688. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2009.12.066>
90. Santana, A. (2014). *Materiales híbridos como bactericidas de Escherichia coli*. 0–158.
91. Santana-Cruz, A., Flores-Moreno, J. L., Guerra-González, R., & Martínez-Ortiz, M. D. J. (2016). Antibacterial activity of pipemidic acid ions-MgFeAl layered double hydroxide hybrid against *E. Coli* and *S. typhi*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(2), 62–66. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v60i2.74>



92. Sasai, R., Sato, H., Sugata, M., Fujimura, T., Ishihara, S., Deguchi, K., Ohki, S., Tansho, M., Shimizu, T., Oita, N., Numoto, M., Fujii, Y., Kawaguchi, S., Matsuoka, Y., Hagura, K., Abe, T., & Moriyoshi, C. (2019). Why Do Carbonate Anions Have Extremely High Stability in the Interlayer Space of Layered Double Hydroxides? Case Study of Layered Double Hydroxide Consisting of Mg and Al (Mg/Al = 2). *Inorganic Chemistry*, 58(16), 10928–10935. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01365>
93. Sepehr, M. N., Al-Musawi, T. J., Ghahramani, E., Kazemian, H., & Zarrabi, M. (2017). Adsorption performance of magnesium/aluminum layered double hydroxide nanoparticles for metronidazole from aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(5), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.07.003>
94. Seron, A., & Delorme, F. (2008). Synthesis of layered double hydroxides (LDHs) with varying pH: A valuable contribution to the study of Mg/Al LDH formation mechanism. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5–6), 1088–1090. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2007.10.054>
95. Serrato Rodríguez, J., & Ruiz Marines, A. (2017). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 9(17), 49. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58151>
96. Shad, A. A., & Shad, W. A. (2021). Shigella sonnei: virulence and antibiotic resistance. *Archives of Microbiology*, 203(1), 45–58. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02034-3>
97. Shakeel, M., Jabeen, F., Shabbir, S., Asghar, M. S., Khan, M. S., & Chaudhry, A. S. (2016). Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biological Trace Element Research*, 172(1), 1–36. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0550-x>
98. Sharma, M. K., & Melesse, S. F. (2011). Optimal block designs for CDC experiments method (2). *Metron*, 69(3), 297–307. <https://doi.org/10.1007/BF03263563>
99. Sousa, R., Jouin, J., Masson, O., Remondiere, F., Lemarchand, A., Colas, M., Thomas, P., Lameira, J., Bastos, G. N. T., Lima, A. B., Nascimento, J. L. M., Anicete-Santos, M., Monteiro, W. R., & Alves, C. N. (2017). Structure and analgesic properties of layered double hydroxides intercalated with low amounts of ibuprofen. *Journal of the American Ceramic Society*, 100(6), 2712–2721. <https://doi.org/10.1111/jace.14763>
100. Taneja, N., & Mewara, A. (2016). Shigellosis: Epidemiology in India. *Indian Journal of Medical Research*, 143(MAY), 565–576. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187104>
101. Tang, L. P., Cheng, H. M., Cui, S. M., Wang, X. R., Song, L. Y., Zhou, W., & Li, S. J. (2018). DL-mandelic acid intercalated Zn-Al layered double hydroxide: A novel antimicrobial layered material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 165, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.017>
102. Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 36(Cim), 663–671.
103. Taylor, C. M., & Roberts, I. S. (2005). Capsular polysaccharides and their role in virulence. *Contributions to Microbiology*, 12, 55–66. <https://doi.org/10.1159/000081689>



104. Tichit, D., Layrac, G., & Gérardin, C. (2019). Synthesis of layered double hydroxides through continuous flow processes: A review. *Chemical Engineering Journal*, 369(December 2018), 302–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.057>
105. V., A. M. (2015). EVALUACIÓN DEL EXOPOLISÁCARIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES. *Maestría En Ciencias Con Orientación En Microbiología Aplicada*, 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
106. Vial, S., Ghanbaja, J., & Forano, C. (2006). Precipitation of Zn₂Al LDH by urease enzyme. *Chemical Communications*, 1(3), 290–292. <https://doi.org/10.1039/b510470j>
107. Vijayamma, R., Kalarikkal, N., & Thomas, S. (2020). Layered double hydroxide based nanocomposites for biomedical applications. In *Layered Double Hydroxide Polymer Nanocomposites*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101903-0.00016-7>
108. Villegas, J. C., Giraldo, O. H., & Suib, S. L. (2002). New layered double hydroxides containing intercalated manganese oxide nanoparticles: Synthesis and characterization. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 224(18), 508-INOR.
109. Wei, M., Yuan, Q., Evans, D. G., Wang, Z., & Duan, X. (2005). Layered solids as a “molecular container” for pharmaceutical agents: L-tyrosine-intercalated layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry*, 15(11), 1197–1203. <https://doi.org/10.1039/b416068a>
110. Weinstein, M. (2021). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Services Marketing* (Vol. 8, Issue 3).
111. Williams, P. C. M., & Berkley, J. A. (2018). Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. *Paediatrics and International Child Health*, 38, S50–S65. <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1409454>
112. Wong, F., & Buchheit, R. G. (2004). Utilizing the structural memory effect of layered double hydroxides for sensing water uptake in organic coatings. *Progress in Organic Coatings*, 51(2), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2004.07.001>
113. Xin, X., Huang, G., & Zhang, B. (2021). Review of aquatic toxicity of pharmaceuticals and personal care products to algae. *Journal of Hazardous Materials*, 410(November), 124619. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124619>
114. Yan, K., Wu, G., & Jin, W. (2016). Recent Advances in the Synthesis of Layered, Double-Hydroxide-Based Materials and Their Applications in Hydrogen and Oxygen Evolution. *Energy Technology*, 4(3), 354–368. <https://doi.org/10.1002/ente.201500343>
115. Yan, L., Gonca, S., Zhu, G., Zhang, W., & Chen, X. (2019). Layered double hydroxide nanostructures and nanocomposites for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(37), 5583–5601. <https://doi.org/10.1039/c9tb01312a>



116. Yan, L., Gonca, S., Zhu, G., Zhang, W., Chen, X., Bugatti, V., Vertuccio, L., Zuppari, F., Vittoria, V., Gorrasi, G., Rebitski, E. P., Souza, G. P., Santana, S. A. A., Pergher, S. B. C., & Alcântara, A. C. S. (2019). Pet and active coating based on a ldh nanofiller hosting p-hydroxybenzoate and food-grade zeolites: Evaluation of antimicrobial activity of packaging and shelf life of red meat. *Applied Clay Science*, 173(12), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.02.024>
117. Yang, Q., Wang, S., Chen, F., Luo, K., Sun, J., Gong, C., Yao, F., Wang, X., Wu, J., Li, X., Wang, D., & Zeng, G. (2017). Enhanced visible-light-driven photocatalytic removal of refractory pollutants by Zn/Fe mixed metal oxide derived from layered double hydroxide. *Catalysis Communications*, 99, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2017.05.010>
118. Yang, W., Wang, L., Mettenbrink, E. M., Deangelis, P. L., & Wilhelm, S. (2021). Nanoparticle Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338>
119. Yasaei, M., Khakbiz, M., Ghasemi, E., & Zamanian, A. (2019). Synthesis and characterization of ZnAl-NO₃ (-CO₃) layered double hydroxide: A novel structure for intercalation and release of simvastatin. *Applied Surface Science*, 467–468(October 2018), 782–791. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.202>
120. Zalipsky, S. (1995). Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(2–3), 157–182. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00023-Z](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00023-Z)
121. Zhang, L. H., Xiang, X., Zhang, L., Li, F., Zhu, J., Evans, D. G., & Duan, X. (2008). Influence of iron substitution on formation and structure of Cu-based mixed oxides derived from layered double hydroxides. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5–6), 1098–1101. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2007.10.002>
122. Zhitova, E. S., Centre, K. S., & Krivovichev, S. V. (2016). Минералогия и кристаллохимия пироаурита из Ковдорского массива (Кольский п - ов , Россия) и Fe-Mn месторождения Лонгбан (Вермланд , Швеция) June.

APÉNDICE A

Curva Estándar de Estreptomicina

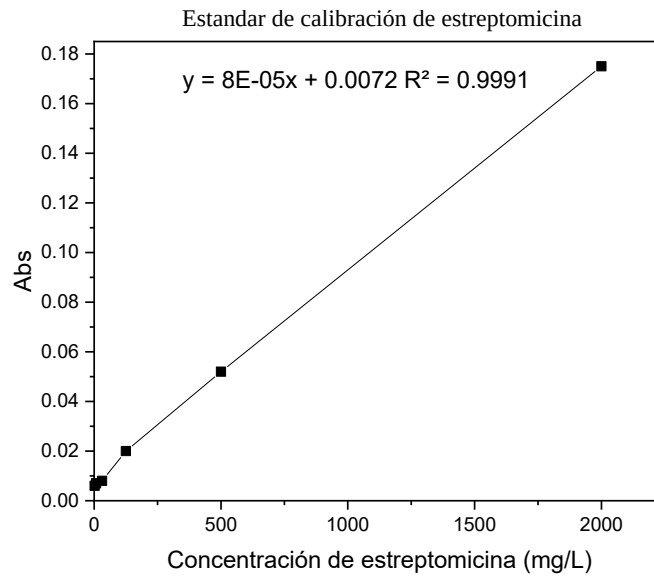


Figura 47. Estándar de calibración de estreptomicina

Tabla 24. Concentración de fármaco intercalado

Material Híbrido	Concentración $\mu\text{g/mL}$
MgAl-Cl	0.000001
R-ZnAl	0.000140
ZnAl-NO ₃ -EM	86
ZnAl-Cl	42



Tabla 25. Costos del material

Nombre	Precio	Envío	Costo neto + iva	Marc a	SKU	cantidad en M o L	Canti dad usada	Cantidad costo
ZnNO₃ 9 H₂O	909	0	1054.44	Meye r	500 g	0.335	117.61515	8.965171579
AlNO₃ 6 H₂O	634	0	735.44	Meye r	500 g	0.165	52.97424	13.88297406
Urea	780	0	904.8	Fagal ab	Urea R. A. De 500 G Fagala b	1	60.06	15.06493506
NO₃NH₄	478	0	554.48	Meye r	Helsam	1	80	6.931
Argón	7,500	300	9048	INFR A	argón de alta pureza		200	45.24
Agua	200	200	464	Mona rca	20 L	6	6	77.33333333
Estreptomina	1837	0	2130.92		100g	3.49	3.49	610.5787966

El material tiene un costo de 242. pesos por cada 0.250 g, para su efectividad solamente se requieren 0.005 g por lo que, su costo es de \$1.21. A este cálculo no se le adiciono el valor energético simplemente es un aproximado.