



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**“ CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NANOCOMPOSITOS DE ZnO-
MgO Y EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE MICROORGANISMOS
PATÓGENOS ”**

POR:

IBQ. BETSY CRISEL RUVALCABA DIAZ

TESIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

DIRECTOR:

DR. JORGE ALBERTO SÁNCHEZ BURGOS

Tepic, Nayarit, México

Septiembre, 2021



“2021, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Tepic, Nayarit, **01/Noviembre/2021**

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 126-2021

M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis de la alumna I.B.Q. Betsy Crisel Ruvalcaba Díaz con número de control M12400380, cuyo título es “Caracterización fisicoquímica de nanocompositos de ZnO-MgO y efecto antimicrobiano sobre microorganismos patógenos”, a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
(Presidente)

Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga
(Secretario)

Dr. Alejandro Pérez Larios
(Vocal)

Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente



Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **18/noviembre/2021**

No. Oficio: 25-757-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NANOCOMPOSITOS DE ZnO-MgO Y EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE MICROORGANISMOS PATOGENOS" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del C. I.B.Q. **BETSY CRISEL RUVALCABA DÍAZ** con número de control **M12400380** cuenta con un nivel de **originalidad Aceptable** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas indexadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin más por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®



MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ
DIRECTOR



Ccp. Archivo DEPI



Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **19/noviembre/2021**

No. Oficio: 25-758-2021

Asunto: Autorización de impresión

**I.B.Q. CBETSY CRISEL RUVALCABA DÍAZ
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado "CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE NANOCOMPOSITOS DE ZnO-MgO Y EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE MICROORGANISMOS PATOGENOS".

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.*

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo DEPI.





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, 09/diciembre/2021

No. Oficio: 25-819-2021

Asunto: Acto de Examen de Grado

IBQ. BETSY CRISEL RUVALCABA DÍAZ
PRESENTE

De acuerdo con el reglamento de los Institutos Tecnológicos, dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de maestría denominado, “**Caracterización fisicoquímica de nanocompositos de ZnO-MgO y efecto antimicrobiano sobre microorganismos patógenos**”; la División de Estudios de Posgrado e Investigación autoriza que se lleve a cabo el Acto de Examen de Grado, el próximo 14 de diciembre del presente a las 12:00 horas. Sírvase presentarse con puntualidad para llevar a cabo tan importante evento.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica. Pasión de nuestro espíritu®*

LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Ccp. Coordinación de la Maestría en Ciencias en Alimentos



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country C.P.63175
Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401 e-mail:
info@ittec.edu.mx

tecnm.mx | tepic.tecnm.mx



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepic, Nayarit, el mes de diciembre del 2021, el que suscribe Betsy Crisel Ruvalcaba Diaz alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control M12400380, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección del Dr. Jorge Alberto Sanchez Burgos, pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cede los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo, manifiesta que es de su conocimiento que, si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participará como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente



Betsy Crisel Ruvalcaba Diaz

RECONOCIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto. No. CVU: 1009147.

Al **Instituto Tecnológico de Tepic** y al **Posgrado en Ciencias en Alimentos**, por ser participe en mi formación académica al brindarme la oportunidad de desarrollar y ampliar mi conocimiento académico.

A mi director de tesis el **Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos** por permitirme ser parte de su equipo de trabajo; por dirigir este proyecto de tesis, siempre guiando y retándome de la mejor manera, transmitiendo su amor por la ciencia.

Al **Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga** por brindarme su apoyo, asesoría, paciencia (sobre todo paciencia) y tiempo durante estos dos años. Gracias además por ser el honor de ser nuestro padrino de generación.

Al **Dr. Alejandro Pérez Larios** por brindarme su apoyo y accesibilidad durante la estancia realizada y permitirme hacer uso de los equipos del Laboratorio de Investigación de Nanocatálisis del CUAAltos. Gracias por su disponibilidad, paciencia, y por siempre brindarme una sonrisa para seguir adelante.

A la **Dra. Sonia Gpe. Sáyago Ayerdi** por brindarme su apoyo, asesoría, siempre mostrando su entusiasmo por la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Beatriz Diaz y Moisés Ruvalcaba, gracias por su apoyo incondicional, por todo lo que han hecho por mí siempre, con su amor siento que lo puedo TODO. Los amo infinitamente.

A mis hermanas **Sheila y Sherlyn** que siempre me dan fuerza y amor, y por eso seguiré esforzándome a dar lo mejor de mí, tratando siempre de ser una mejor hermana.

A **Alfredo**, no hubo día que paso que no me llenaras de ganas de darte todo, tu positividad es infecciosa, Te amo gracias por siempre apoyarme.

Jade, eres magia, me llenas de ella a diario; siempre buscare dar lo mejor de mi para ti. Todo lo que hago, lo hago para que veas que no hay imposibles. Te amo más que la vida misma.

Isabel, Marifer, y Adriana, Siempre ahí con su disposición para ayudar desde el primer día que llegue a CUAltos, sus sonrisas, abrazos y palabras de anhelo para seguir adelante, los llevare siempre en el corazón.

A **Francia**, al ingresar a la maestría juntas no sabía lo especial que serias para mí, eres resiliencia, fuerza, y carisma; gracias por siempre alentarme y hacerme reír; gracias por ser una gran amiga.

A **Fabian**, por su apoyo y explicaciones detalladas cuando más los necesitaba, eres una increíble persona y profesional.

A mis compañeros, por su aporte en mi crecimiento académico, profesional y personal dentro y fuera del laboratorio: **Osiris, Paulina, Gina, Moni, Miguel, Noé.**

RESUMEN

Ruvalcaba-Díaz, Betsy Crisel. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic, agosto 2021. Efecto antimicrobiano del nanocomposito ZnO-MgO sobre microorganismos patógenos. Dr. Jorge Alberto Sánchez-Burgos.

La nanotecnología tiene diversas funciones y áreas de oportunidad, con aplicaciones en diversos sectores, incluyendo la agricultura, la medicina, alimentos y seguridad alimentaria. En la seguridad alimentaria los nanomateriales son utilizados desde el procesamiento de alimentos hasta los ensayos de detección de patógenos y contaminantes, ya que los patógenos pueden transmitirse al cuerpo humano a partir de la ingesta de estos alimentos contaminados. El empleo de nanomateriales para combatir patógenos que transmiten enfermedades a través de los alimentos, puede ser clave para disminuir las enfermedades transmitidas, debido a su capacidad para penetrar con facilidad las membranas celulares interrumpiendo varios procesos intracelulares.

Por lo cual el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antimicrobiano de los nanomateriales dobles laminares sobre las cepas patógenas *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratyphi A*, y *Listeria monocytogenes*. El desarrollo de los óxidos mixtos a base de ZnO (ZnO-MgO), se llevó a cabo por el método de microondas. Posteriormente se realizó la caracterización de los polvos donde se logró identificar los materiales, y la morfología, de cada material y controles establecidos. Además del tamaño de partícula, los cuales presentaron un tamaño nanométrico (20-49 nm) con forma aglomerada en cubos o semi-globulares de una manera mayoritariamente uniforme. Por otro lado, se presentó un efecto antimicrobiano de parte de los óxidos mixtos (ZnO-MgO), mostrando su efectividad en bacterias tanto Gram negativas como positivas. Es posible que actúen los óxidos mixtos por dos mecanismos, permitiendo una formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales llevan a estrés oxidativo y por último a daño celular o ejerciendo daño a la membrana celular, mediante la unión de átomos o moléculas encontradas en la superficie del material a ésta, resultando en un derrame del contenido intracelular.

Finalmente, los óxidos mixtos (ZnO-MgO), presentaron un efecto antimicrobiano en contra de, *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratyphi A*, y *Listeria monocytogenes*, preservando las características del ZnO independientemente del dopante (MgO) añadido, y promoviendo así su posible uso como agente antimicrobiano.

Palabras Clave: Nanopartículas, Alimentos, Patógenos, Efecto antimicrobiano.

SUMMARY

Ruvalcaba-Diaz, Betsy Crisel. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic, August 2021. Antimicrobial effect of ZnO-MgO nanocomposite on pathogenic microorganisms. Dr. Jorge Alberto Sánchez-Burgos.

Nanotechnology has various functions and areas of opportunity, with applications in various sectors, including agriculture, medicine, food and food safety. In food safety, nanomaterials are used from food processing to detection tests for pathogens and contaminants, as pathogens can be transmitted to the human body from the intake of these contaminated foods. The use of nanomaterials to combat pathogens that transmit diseases through food, may be the key to reduce foodborne illnesses, due to their ability to easily penetrate cell membranes interrupting various intracellular processes.

Therefore, the objective of this project was to evaluate the antimicrobial effect of double laminar nanomaterials on the pathogenic strains *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratythi A*, and *Listeria monocytogenes*. The development of mixed oxides with ZnO as a base (ZnO-MgO), was carried out by the microwave method. Subsequently, the characterization of the powders was carried out making it possible to identify the materials, and the morphology, of each material and the established controls. In addition to the particle size, which was observed to have a nanometric size (20-49 nm) and semi-globular or an agglomerated shape in cubes, in a mostly uniform way. The mixed oxides (ZnO-MgO), presented an antimicrobial effect showing its effectiveness in both Gram negative and positive bacteria. It is possible that mixed oxides act by two mechanisms, allowing an excessive formation of reactive oxygen species (ROS), which lead to oxidative stress and finally to cellular damage or exertion of damage to the cell membrane, by binding atoms or molecules found on the surface of the material to it, resulting in leakage of the intracellular content.

Finally, the mixed oxides (ZnO-MgO), presented an antimicrobial effect against, *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratythi A*, and *Listeria monocytogenes*. Preserving the characteristics of ZnO regardless of the added dopant (MgO), thus promoting its possible use as an antimicrobial agent.

Key Words: Nanoparticles, Food, Pathogens, Antimicrobial effect.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	4
2.1 Patógenos en seguridad alimentaria	4
2.1.2 <i>Staphylococcus</i>	5
2.1.3 <i>Salmonella</i>	5
2.1.4 <i>Enterococcus</i>	6
2.1.5 <i>Escherichia</i>	6
2.1.6 <i>Listeria Monocytogenes</i>	7
2.3 Nanotecnología	7
2.3.1 Hidróxidos dobles en capas	8
2.3.2 Nanomateriales y sus aplicaciones	9
2.3.2.1 Efecto antibacteriano	10
2.4 Nanopartículas de Óxido de zinc (ZnO NPs)	11
2.5 Nanopartículas de Óxido de magnesio (MgO NPs)	12
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	15
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	17
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS	19

5.1 General.....	19
5.1.1 Específicos.....	19
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 ETAPA 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	21
6.1.1 Diseño experimental	21
6.1.2 Síntesis de ZnO-MgO.....	21
6.1.2 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	22
6.1.3 Difracción de rayos x (DRX)	22
6.1.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	23
6.1.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	23
6.1.6 Análisis estadístico	24
6.2 ETAPA 2: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	24
6.2.1 Actividad antimicrobiana	24
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	26
7.1.1 Síntesis de materiales.....	26
7.1.2 Análisis por infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	26
7.1.3 Difracción de rayos-X (DRX)	27
7.1.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	29
7.1.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	30
7.2 Actividad antimicrobiana	33
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 6.1 Diseño unifactorial.....	21
Cuadro 7.1 Promedio de tamaño de partícula de nanomateriales	32
Cuadro 7.2 Antibiograma con sensidiscos de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.	33
Cuadro 7.3 Actividad antimicrobiana con valores de halos de inhibición (mm) de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.....	34
Cuadro 7.4 Actividad antimicrobiana con valores de halos de inhibición (mm) de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Estructura típica de LDH..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2.2** Esquema de los posibles mecanismos de acción de nMgO contra bacterias..
..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6.1.** Diagrama de flujo para síntesis por el método de coprecipitación. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.1** Espectros FT-IR nanomateriales, a) ZnO, b) MgO, c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.2** Difracción de Rayos X de nanomateriales, a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.3** Microscopias SEM de Materiales, a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.4** Microscopias TEM de materiales, a) ZnO, b) MgO C) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.5** Histogramas de distribución de tamaños de partícula de los materiales sintetizados a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%.....32

LISTA DE ABREVIATURAS

NPs	Nanopartículas
LDH	Hidróxidos dobles en capas
ROS	Reactivos de oxígeno
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas a través de patógenos en los alimentos humanos son la amenaza principal para la seguridad alimentaria, por lo cual la inhibición y control de dichos patógenos representa un problema importante en la industria alimentaria, ya que estos patógenos pueden transmitirse al cuerpo humano a partir de la ingesta de estos alimentos contaminados. Es por esto que, la seguridad alimentaria y los problemas emergentes de bioseguridad alimentaria son importantes no solo para los consumidores sino también para la producción de alimentos.

Los centros de control de enfermedades y prevención (CDC, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos han reportado que cada año los patógenos, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter spp.* entre otros causan más de 2 millones de enfermedades transmitidas por alimentos, 31,000 hospitalizaciones y 700 muertes estimadas, lo que además representa un impacto calculado entre de 9,000 y 11,000 millones de dólares en la salud humana. Hoy en día existe una gran cantidad de tecnologías emergentes que se están utilizando para contrarrestar los efectos a la salud por parte de estos patógenos, entre las cuales están los nanomateriales, esto debido a las ventajas tecnofuncionales que brindan en diferentes áreas de la salud, incluyendo los alimentos. Un ejemplo de este tipo de materiales son los hidróxidos dobles en capas (LDH), que al ser combinado con la funcionalización se puede llegar a tener mejores propiedades que incrementan las potenciales aplicaciones. Una de esas aplicaciones es como agentes antimicrobianos o agentes bacteriostáticos, constituyendo nanoestructuras foto catalíticas que pueden producir especies reactivas de oxígenos (ROS); esto a nivel celular produce daños que comprometen la homeóstasis y viabilidad de las células.

Además, los metales y las nanopartículas de óxido metálico pueden matar las células bacterianas liberando iones metálicos, formando ROS e interacción electrostática con la membrana celular. Así, la acción sinérgica de las nanopartículas con agentes antibacterianos naturales puede mejorar la estabilidad de estos agentes y su rendimiento bactericida. A su vez según su biocompatibilidad y estabilidad, los nanomateriales han mostrado poseer excelentes propiedades bactericidas contra varios tipos de bacterias.

Por lo que resaltan como una estrategia con gran potencial de aprovechamiento. Por esto se propone formular y desarrollar un nanomaterial a base de óxido de zinc (ZnO) con el cual se pretende disminuir el riesgo de enfermedad por bacterias patógenas, mejorando las propiedades bactericidas contra estas mismas.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Patógenos en seguridad alimentaria

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se deben a patógenos que son diversas por naturaleza y son la causa de un problema de salud pública mundial, dichos patógenos son transmitidos a través de varios alimentos y son causantes de enfermedades, (Zhang, 2019). Por consiguiente, implica una carga económica significativa, y un impacto al comercio mundial de los productos alimenticios. Únicamente en los Estados Unidos, se estima que el costo total anual de las enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos es de aproximadamente 77,700 millones de dólares (Scharff, 2012).

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en los Estados Unidos han reportado que cada año los patógenos, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp., causan más de 2 millones de enfermedades transmitidas por alimentos, 31,000 hospitalizaciones y 700 muertes (Scallan, 2011), lo que además representa un impacto estimado de entre 9,000 y 11,000 millones de dólares en la salud humana (Hoffmann, 2015; Minor, 2015).

El aumento considerable de enfermedades causadas por patógenos de origen alimentario en las últimas décadas se debe a la rápida globalización del mercado de alimentos, además de los profundos cambios en los hábitos alimenticios, cambios en patrones de producción, distribución y consumo de alimentos dando lugar a dificultades en la seguridad alimentaria (Sankarankutty, 2014).

La resistencia de los patógenos humanos a los antimicrobianos utilizados actualmente es un problema económico y de salud cada vez mayor en todo el mundo. Las bacterias pueden poseer resistencia innata a un antimicrobiano o pueden adquirir resistencia de otras bacterias. Las bacterias utilizan diferentes mecanismos bioquímicos de resistencia como lo es la inactivación de antibióticos, modificación del objetivo o eliminación activa del antibiótico de la célula por bombas de eflujo (O'Bryan, 2018)

Los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos se encuentran dentro de los productos de origen animal, vegetal, fuentes de agua y alimentos listos para consumo. A lo largo de la producción de alimentos estas pueden ser sometidos a diferentes procesos y un alto grado de manipulación, aumentando la probabilidad de adquirir patógenos durante su

procesamiento (Rodríguez-Cavallini et al., 2010). Además, el riego o procesamiento de los productos frescos con agua con contaminación fecal presenta un riesgo muy común dentro de las causas de ETA (Vital et al., 2014).

2.1.2 *Staphylococcus*

Staphylococcus se clasifica dentro del grupo *Bacillus* - *Lactobacillus*- *Streptococcus* de bacterias Gram-positivas (Becker, 2011). *Staphylococcus* ahora es clasificado en una nueva familia, *Staphylococcaceae*, orden *Bacillales*, clase *Bacilli*. Es un organismo esférico, no esporádico y no motil, el cual se divide en más de un plano formando racimos irregulares similares a la uva. Es facultativamente anaeróbico, catalasa positivo, oxidasa negativo y puede crecer en 10 % NaCl (Foster, 2015).

Sus células esféricas miden de 0.5–1.5 μm de diámetro, los cuales se presentan individualmente, en parejas, tetraedro o en cadenas cortas (3-4 células) con una pared celular que contiene peptidoglicano y ácido teicoico (Schleifer & Bell, 2015).

Además, se les considera uno de los patógenos transmitidos por alimentos más comúnmente aislados y que se considera como una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo (Rubab et al., 2018). Entre los principales efectos en la salud, se puede encontrar una combinación de náusea, diarrea, vómito, y dolor abdominal. En casos más severos, hay patógenos que pueden llegar a afectar el sistema nervioso y médula espinal (Sharif, 2018).

2.1.3 *Salmonella*

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, subdivisión del género *Salmonella* en especies y subespecies por sus características bioquímicas (Le Minor & Popoff, 1987). Morfológicamente son varillas rectas, midiendo $0.7\text{--}1.5 \times 2.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$, conforme a la definición de la familia *Enterobacteriaceae*. Son generalmente motiles (*peritrichous flagella*), gram negativos y facultativamente anaeróbico con colonias de 2-4 mm de diámetro. Es un patógeno para los seres humanos, causando fiebres entéricas, gastroenteritis y septicemia; también puede infectar muchas especies animales además de los seres humanos.

Algunos serotipos o serovars están estrictamente adaptados al anfitrión (Popoff & Le Minor, 2015).

2.1.4 Enterococcus

En el género *Enterococcus*, la mayoría de las especies son parte de la flora intestinal de los mamíferos y aves, y (mucho menos conocido) otros animales también. Es grampositivo con células ovoides, las cuales se presentan individualmente, en parejas o en cadenas cortas, y con frecuencia se alargan en la dirección de la cadena. Son no esporádicas y las cepas de algunas especies pueden ser motiles por flagela escasa. Algunas especies son pigmentadas amarillas. Además, son facultativamente anaeróbicos y tienen su crecimiento óptimo en 35-37 °C (Švec & Devriese, 2015). Es de resaltar que puede causar infecciones graves tales como infecciones del tracto urinario, endocarditis, bacteriemia e infecciones por heridas. Además, ahora se les reconoce como causas significativas de infecciones transmitidas por alimentos y son resistente a muchos agentes antimicrobianos (Archimbaud et al., 2002).

2.1.5 Escherichia

El género *Escherichia* que contempla al microorganismo *Escherichia coli* se encuentra habitando el tracto gastrointestinal humano y constituye la mayoría de las bacterias Gram-negativas aeróbicas del tracto intestinal.

Aunque después de su descubrimiento fue considerada una bacteria no patógena, sin embargo, en el siglo XX, se reconoció que algunos serotipos especiales de *E. coli* eran patógenos para los seres humanos y los animales, especialmente para los bebés y los animales jóvenes, y a menudo causan diarrea y sepsis grave. La infección con *E. coli* se puede dar bebiendo agua contaminada o comiendo alimentos que han sido contaminados con heces (especialmente carne de res, hamburguesas y carne asada) (Liu et al., 2011). Según su morfología es una varilla no formadora de esporas y es motil por medio de *Peritrichous flagella*. Estas bacterias son anaeróbicas facultativas; es decir, crecen aeróbicamente y anaeróbicamente, aunque prefieren crecer aeróbicamente (Pitout, 2011). Las células de *Escherichia coli* tienen una compleja pared celular conformada por dos bicapas lipídicas concéntricas, la membrana externa y la membrana citoplasmática con un espacio periplasmático en el medio. Esta pared celular desempeña muchos roles funcionales en la

protección, transporte, locomoción, detección, desintoxicación y producción de energía (Goodsell, 2009).

2.1.6 *Listeria Monocytogenes*

Listeria Monocytogenes según su morfología tiene varillas cortas regulares con un tamaño de $0.4-0.5 \times 1-2 \mu\text{m}$ con lados paralelos y extremos contundentes. Generalmente se presenta individualmente o en cadenas cortas. Se caracteriza por ser grampositiva, aerobio y anaeróbico facultativo. Sus colonias (24-48 h) tienen entre 0.5 y 1.5 mm de diámetro, siendo redondas, translúcidas, bajas convexas con una superficie lisa y un margen entero, no pigmentado con un aspecto central cristalino. Su temperatura límite de crecimiento es de 0 a 45 °C con un crecimiento óptimo a 30-37 °C. No sobrevive al calentamiento a 60 °C durante 30 minutos (McLauchlin, 2015).

A la mano de alimentos crudos, o procesados pero hechos con leche no pasteurizada *Listeria Monocytogenes* puede causar listeriosis, una infección sistémica que se manifiesta como bacteriemia, a menudo complicada por la meningoencefalitis en individuos inmunodeprimidos y ancianos, e infección fetal-placentaria en mujeres embarazadas (Lecuit, 2020)

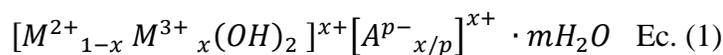
2.3 Nanotecnología

La nanotecnología es un área de gran desarrollo integrada por varias disciplinas, entre ellas física, química, biotecnología e ingeniería, el cual involucra el uso de nanomateriales a nano escala (de 1 a 100 nm) (Bajpai et al., 2018). Se trata de materiales que exhiben diferentes dimensiones en sus elementos estructurales, como racimos, moléculas, o cristales, pudiendo ser de una a tres dimensiones según su estructura (nanovarillas, nanotubos, nanofibras, etc) (Pathakoti, 2017). Estas a su vez pueden ser combinadas con polímeros, resultando en un tamaño de partícula mayor y dando lugar a un nanocomposito. Estos materiales, al tener una alta relación mayor de volumen superficial, da lugar a características fisicoquímicas inimitables, como cambios en solubilidad, toxicidad, fuerza, magnetismo, difusividad, óptica, y color (Gupta, 2016; Singh et al., 2017).

En la seguridad alimentaria los nanomateriales son utilizados desde el procesamiento de alimentos hasta los ensayos de detección de patógenos y contaminantes (Krishna, 2018). Con ayuda de nanomateriales se puede mejorar la eficacia de los envases de alimentos, la vida útil y el valor nutricional utilizándolos como aditivos sin cambiar el sabor o las características fisicoquímica de los productos alimenticios (He, 2016). Además, han sido utilizados para eliminar contaminantes (Sun et al., 2013; Zhu, 2012) como antimicrobianos (Kim, 2012). Un ejemplo del uso de nanomateriales como antimicrobiano, es el embalaje activo el cual utiliza nanomateriales de polímero que contienen moléculas específicas que brindan la capacidad de absorber o liberar los componentes hacia o desde el entorno circundante de los alimentos envasados. Dichos nanomateriales de polímero activos se han desarrollado principalmente para aplicaciones de envasado antimicrobiano (Silvestre, 2011).

2.3.1 Hidróxidos dobles en capas

Los hidróxidos dobles en capas (LDH), conocidos también como arcillas aniónicas, son un tipo de material en capas (Fan et al., 2014). Dicho material está compuesto por capas metálicas cargadas positivamente y aniones entre capas y agua. Su fórmula general es la descrita en la Ecuación 1, donde M^{2+} y M^{3+} son un catión bivalente metálico y un catión trivalente metálico como lo son $M^{2+} = \text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$, $M^{3+} = \text{Al}^{3+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Mn}^{3+}, \text{Co}^{3+}$ (Ecuación 2), respectivamente, y A^{p-} es un anión intercapa, es la carga superficial ($A^{p-} = \text{NO}_3^-, \text{CO}_3^{2-}, \text{Cl}^-, \text{OH}^-, \text{SO}_4^{2-}$), esta es determinada por la relación de los dos cationes metálicos, la cual está sujeta a cambios para diversas aplicaciones, su arreglo estructural se muestra en la Figura 2.1 (Yu, 2017).



$$X = M^{3+} / (M^{2+} + M^{3+}) \quad \text{Ec. (2)}$$

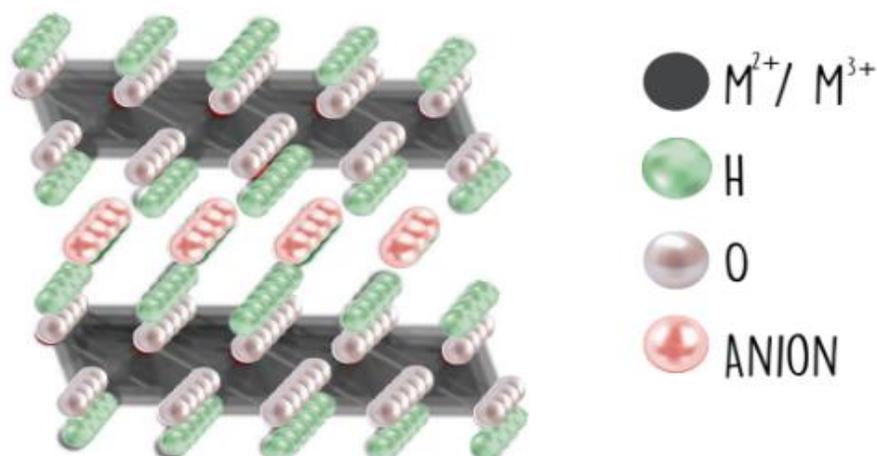


Figura 2.1 Estructura típica de los hidróxidos dobles en capas

Los LDHs son utilizados por poseer características estructurales anisotrópicas únicas, haciéndolas potencialmente útiles en una amplia gama de aplicaciones, como optoelectrónica, fotónica, catálisis, control de la contaminación ambiental, almacenamiento de energía y conversión, y biomateriales (Laipan et al., 2020).

Debido a las propiedades químicas, en conjunto se utiliza la funcionalización ya que es apta para mejorar notoriamente el rendimiento de los LDHs o ayudar en el desarrollo de nuevas propiedades para diferentes aplicaciones (Wan et al., 2016). La funcionalización de LDHs incluye modificaciones a nivel de superficie, forma, tamaño y composición, (Gao, 2019). Es posible funcionalizar los LDHs mediante la manipulación de la composición de la capa, lo cual incluye el tipo, la relación y la valencia química de los componentes metálicos, la regulación del tamaño y la morfología de las LDH, y además mediante la creación de defectos resultantes de la regulación de la composición superficial y en capas (Laipan et al., 2020).

2.3.2 Nanomateriales y sus aplicaciones

El reciente incremento en la atención al desarrollo de la nanotecnología en la seguridad alimentaria se debe por un lado al uso de estas en los sistemas de detección basados en nanotecnología por los variados mecanismos y diseños los cuales aportan una detección oportuna y precisa de patógenos traza u otros contaminantes (Banerjee, 2017). Las aplicaciones de los nanomateriales siguen en aumento en diversos sectores, incluyendo la agricultura, la medicina, la ropa, la cosmética, alimentos y salud pública. En la industria

alimentaria las aplicaciones tecnológicas se enfocan principalmente en envases, tecnología de procesos, antimicrobianos e ingredientes alimentarios, clasificándose su uso como "directo" o "indirecto" (Pathakoti, 2017). Ejemplos de aplicaciones directas incluyen fragancias, agentes colorantes, antioxidantes, conservantes y componentes biológicamente activos. Por otro lado, el uso indirecto de estos materiales se resalta en su uso en la tecnología de envasado y sensores, o el uso de catalizadores nanoestructurados competentes para la hidratación de las grasas (Moraru et al., 2009; Stanković et al., 2009)

2.3.2.1 Efecto antibacteriano

La nanotecnología tiene diversas funciones y áreas de oportunidad, pero en los últimos años se observó mayor atención centrado en las nanopartículas metálicas (plata, zinc, etc.) por sus propiedades antimicrobianas notables (Khan, 2016).

Los mecanismos más comunes a través de los cuales los nanomateriales exhiben su actividad bactericida son mediante la interrupción de la membrana celular (Xi, 2014), o la perturbación del metabolismo como lo es el metabolismo purina (Sirelkhatim, 2016), a través de la desnaturalización de las proteínas y daño al ADN o por inhibición de la replicación del ADN (con la unión al ADN) (Li, 2013), interrupción de la cadena respiratoria (Choi, 2008), inducción del estrés oxidativo, formación de radicales libres (von Moos, 2014) y por último mutagénesis (Ahmad, 2012). Tiene además una alta reactividad y actividad antibacteriana debido a su capacidad para penetrar con facilidad, las membranas celulares interrumpiendo varios procesos intracelulares (Park, 2013). Son utilizados diversos metales y óxidos metálicos, por su efectividad como antimicrobianos. A través de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas que poseen, permiten una formación excesiva de especies reactivos de oxígeno (ROS), estas a su vez llevan a el estrés oxidativo y por último a daño celular. La presencia de estos iones metálicos puede alterar la estructura celular o su función ya sea si están dentro o en la superficie celular (Fu, 2014; Wu, 2014). Tanto nanopartículas como nanocompositos, son utilizados ampliamente en la industria alimentaria con este fin, y están aprobados para ser utilizados en contacto con alimentos por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (U.S.FDA, 2015) para su uso como desinfectante. Nanopartículas de plata son utilizadas como una fuente de iones de Ag^+ , formando proteínas de membrana que a la par forman poros resultando en

cambios morfológicos (Morones, 2005), y a su vez catalizando la generación de ROS en células bacterianas, esta acción conduce a la muerte celular a través del estrés oxidativo (Kim, 2012). Es importante resaltar que la actividad antimicrobiana de los nanomateriales es afectada por propiedades fisicoquímicas como lo son, el tamaño, forma, solubilidad, y capacidad de formar iones metálicos (Khan, 2016). Por ejemplo, nanopartículas de un tamaño menor muestran una mayor actividad antimicrobiana que las nanopartículas de tamaño mayor (Lu, 2013).

2.4 Nanopartículas de Óxido de zinc (ZnO NPs)

Las nanopartículas de óxido de zinc son una de las nanopartículas más abundantes, esta tiene una producción anual global de alrededor de 550 toneladas y además tiene una actividad antimicrobiana significativa. Dicha actividad se ha probado contra patógenos tanto grampositivos como gramnegativos incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhurim*, *Klebsiella pneumoniae*, incluyendo también patógenos transmitidos en alimentos como *Escherichia coli* (0157:H7), *Listeria monocytogenes*, y *Vibrio cholerae* (Khan, 2016). Cabe resaltar también que las ZnO NPs son económicas en su obtención y ya son utilizadas en varios productos comerciales (Dastjerdi & Montazer, 2010; Keller et al., 2013; Piccinno et al., 2012). Además, las ZnO NPs son menos tóxicas a los humanos en comparación con nanopartículas de CuO y Ag (Bai et al., 2012; Bondarenko et al., 2013). Los mecanismos de la actividad antimicrobiana de ZnO NPs son muy similares a Ag NPs, por ejemplo, la relación entre la disminución en tamaño de partícula y una mayor actividad antimicrobiana ha sido reportada en ambas (Lu, 2013; Maqsood et al., 2014). La forma de dichas nanopartículas influye en su propiedad de entrar a las células. Se ha reportados que en formas floreadas con bordes afilados se tiene mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en comparación con formas de varillas esféricas lisas (Talebian et al., 2013).

En un estudio donde se reportó la toxicidad de MgO en 3 tipos de células de mamíferos, se demostró que no muestran efectos de toxicidad a menos de 100 µg/ml. Por otro lado, ZnO NPs, tuvieron valores promedio IC50 de 22.4 µg/mL y una toxicidad mínima de ZnO NPs (8-10 nm) con valores menores a 100 µg/mL (Buzulukov Iu, 2014). Por otro lado, se observó

que la genotoxicidad de ZnO NPs solo se observa en estudios *in vitro* y no en estudios *in vivo*, esta particularidad se debía en gran cantidad al estrés oxidativo (Vandebriel 2012).

2.5 Nanopartículas de Óxido de magnesio (MgO NPs)

Las nanopartículas de óxido de magnesio son un material atractivo para las industrias debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y relativamente bajo costo por lo que son utilizados ampliamente. Algunos usos en la salud atribuidos a esta nanopartícula son el aliviar la acidez estomacal, dolor de estómago y para la regeneración del hueso, además su uso como antimicrobiano y agente antitumoral (Tang, 2014).

Las nanopartículas de óxido de magnesio también han mostrado tener actividad antimicrobiana significativa. Se pueden utilizar solo como antimicrobianos o en combinación con otros agentes antimicrobianos (Dizaj, 2014). Además, se ha demostrado que la eficacia bactericida de MgO NPs aumenta con la disminución del tamaño de partícula y el aumento de la concentración (Hotze, 2010).

El mecanismo antimicrobiano de nanopartículas de MgO se debe a la generación de superóxido en la superficie de las nanopartículas, además de un aumento en el pH por la hidratación con agua (Yamamoto, 2010). Aunque estos factores han sido comprobados, un reciente estudio resaltó que no son los factores principales que contribuyen a la actividad antimicrobiana (Nguyen, 2018). Está reportado que las nanopartículas de MgO ejercen un daño en la membrana celular, mediante la unión de éstas a la membrana celular (Figura 2.2) mostrándose en bacterias patógenas tales como *Escherichia coli O157:H7* y *Salmonella* esto causa un derrame del contenido intracelular lo que deriva en la muerte de las células bacterianas (Jin, 2011). El incremento en el área de superficie determina el número de grupos reactivos en la superficie de la partícula, y este a su vez mejora su efecto antimicrobiano. El incremento del área de superficie se alcanza a través de nanopartículas de óxidos metálicos como lo es el MgO, que exhibe tamaños menores a 100 nm, permitiendo una mayor proporción de átomos o moléculas que se exhibirán en la superficie en lugar del interior del material. En resumen, a medida que el tamaño de una partícula disminuye, aumenta su área de superficie y su actividad antimicrobiana (Jin, 2011).

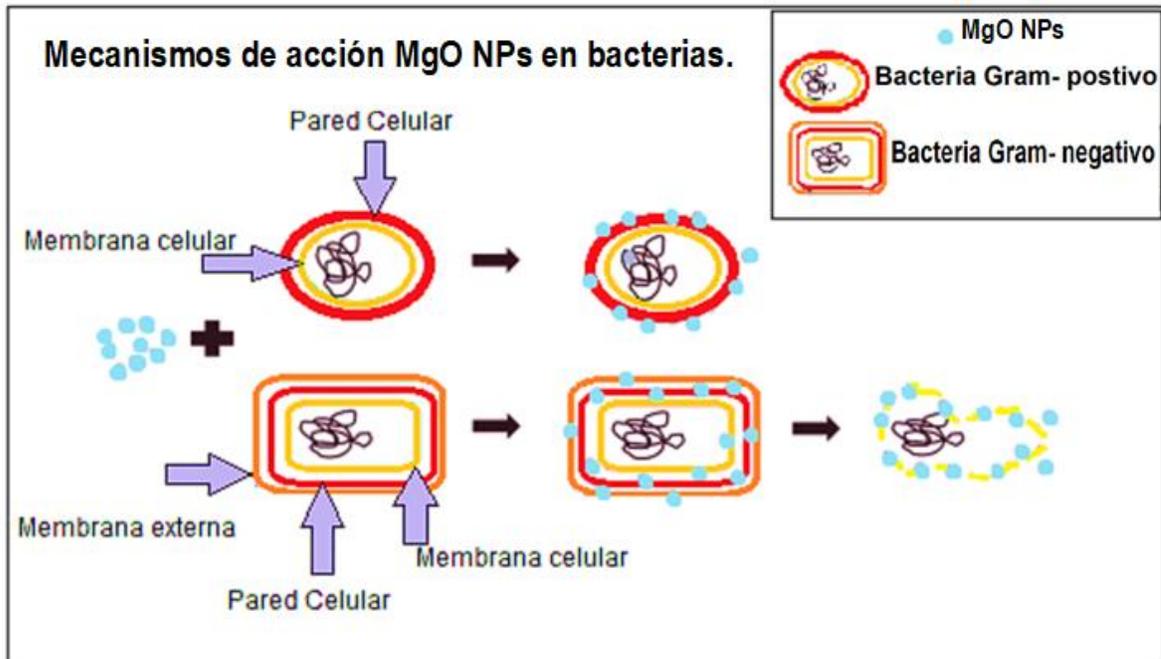


Figura 2.2 Esquema de los posibles mecanismos de acción de MgO NPs contra bacterias. Estrés oxidativo, daño de membrana, y concentración de iones Ca^{2+} son algunos de los posibles mecanismos de acción antibacteriana que se pueden presentar mediante el uso de nMgO.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La nanotecnología tiene diversas funciones y áreas de oportunidad, con aplicaciones de los nanomateriales en diversos sectores, incluyendo la agricultura, la medicina, la ropa, la cosmética, alimentos y salud pública. El aumento considerable de enfermedades causadas por patógenos de origen alimentario en las últimas décadas se debe a la rápida globalización del mercado de alimentos, además de los profundos cambios en los hábitos alimenticios, cambios en patrones de producción, distribución y consumo de alimentos. Dando lugar a dificultades en la seguridad alimentaria ya que las bacterias pueden poseer resistencia innata a un antimicrobiano o pueden adquirir resistencia de otras bacterias. Con ayuda de nanomateriales se puede mejorar la eficacia de los envases de alimentos, la vida útil y el valor nutricional utilizándolos como aditivos sin cambiar el sabor o las características fisicoquímica de los productos alimenticios.

El empleo de nanomateriales para combatir patógenos que transmiten enfermedades a través de los alimentos, puede ser clave para disminuir las enfermedades transmitidas y la pérdida económica que esta puede conllevar en la industria de alimentos, debido a su capacidad para penetrar con facilidad, las membranas celulares interrumpiendo varios procesos intracelulares.

Por esto se propone controlar los patógenos que dan lugar a enfermedades transmitidas por alimentos a través del uso de nanomateriales antimicrobianos. El empleo de este nanomaterial resultará en daño o muerte celular al entrar en contacto directo con el patógeno. Además, se ha reportado un efecto antimicrobiano significativo sin la creación de resistencia bacteriana con el uso de nanomateriales.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Los nanomateriales elaborados a partir de hidróxidos dobles laminares mostrarán una estructura típica del material mayoritario, con características estructurales y fisicoquímicas mejoradas, las cuales tendrán un efecto antimicrobiano significativo contra cepas patógenas involucradas en las enfermedades transmisibles alimentarias.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto antimicrobiano de los nanomateriales dobles laminares caracterizados fisicoquímicamente sobre las cepas patógenas *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratythi A*, y *Listeria monocytogenes* transmisoras de enfermedades alimentarias

5.1.1 Específicos

1. Sintetizar nanomateriales a base de ZnO mediante el método de microondas.
2. Caracterizar fisicoquímicamente formulaciones de los nanomateriales a base de ZnO.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano de los nanomateriales sobre las cepas patógenas *Escherichia coli* (ATCC 8939), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862), *Salmonella paratythi A* (ATCC 9150), y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ETAPA 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

6.1.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño unifactorial donde el factor fue el tratamiento con 5 niveles (Dos controles: ZnO, MgO y 3 concentraciones de óxidos mixtos ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%), tanto para la etapa 1: síntesis y caracterización, como para la etapa 2: actividad antimicrobiana. En el cual se hizo un análisis de normalidad Shapiro-Wilk y un Análisis de Varianza de una vía, permitiendo estudiar la influencia de los tratamientos sobre los variables de respuesta descritas en el cuadro 6.1.

Cuadro 6.1 Diseño unifactorial.

Tratamientos	Variables de Respuesta
ZnO	Tamaño de partícula
MgO	Morfología
ZM 1 %	Actividad antimicrobiana
ZM 3 %	
ZM 5 %	

ZM 1%: ZnO-MgO 1%, ZM 3%: ZnO-MgO 3%, ZM 5%: ZnO-MgO 5%

6.1.2 Síntesis de ZnO-MgO

Se empleó como precursor acetato de Zinc di hidratado ($C_4H_6O_4Zn \cdot 2 H_2O$), como dopante nitrato de magnesio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$) agregando 1 %, 3 % y 5 % en peso en una solución de alcohol etílico (CH_3CH_2OH) y agua destilada (H_2O), sintetizadas por el método de microondas en un Monowave 50 (synthesis reactor Monowave 50, Anton Paar, Graz, Austria) 150°C por 3 min (Figura 6.1), Las muestras se secaron por 24 h y después se calcinaron a 500°C por 5 horas (Wang, 2021).

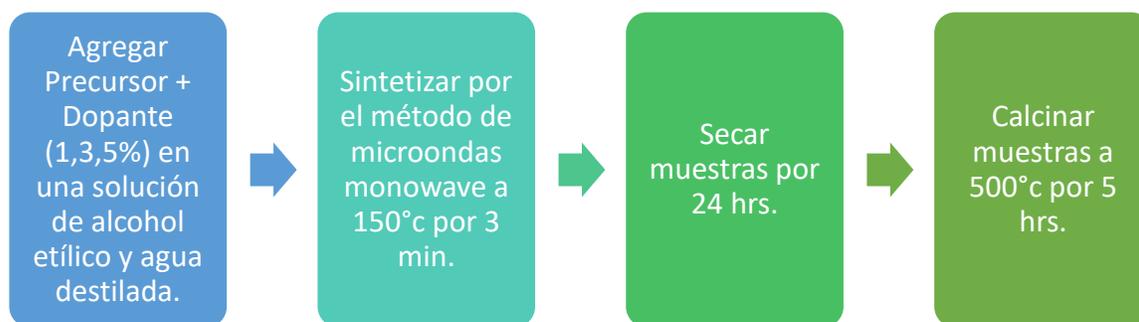


Figura 6.1. Diagrama de flujo para síntesis por el método de microondas.

6.1.2 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización fue obtenida mediante el espectro del nanomaterial empleando un espectrómetro FT-IR (Nicolet iS5, ThermoFisher Scientific, Tokio, Japón) con ayuda de la reflectancia especular (por su análisis no destructiva). El espectro se registró a temperatura ambiente, con 24 exploraciones y 4 cm^{-1} resolución.

6.1.3 Difracción de rayos x (DRX)

El análisis se realizó a un voltaje de 40 kV y una corriente de 30 mA (XRD; Empyrean, Malvern Panalytical, Almelo, Países bajos). La intensidad de difracción en función del ángulo de difracción (2θ) se midió entre 4° y 70° , usando un paso de 0.03° y un tiempo de conteo de 0.3 s por paso, para determinar la medida del tamaño de partícula, y también de esta manera se proporcionó información para identificar y cuantificar los componentes presentes en los nanomateriales.

El tamaño de partícula se obtuvo mediante el uso de la fórmula de Debye–Scherrer's (ecuación 3):

$$D = \frac{K\lambda}{(\beta\cos\theta)} = K\lambda/(\beta\cos\theta) \quad (3)$$

Donde D es el tamaño de cristal y λ es el número de onda de la radiación de rayos X ($\lambda = 0.15406$ nm) para $\text{CuK}\alpha$; K es generalmente tomado como 0.9 (Ecuación 4), y β es el ancho de línea a la mitad de la altura máxima en radianes, obteniéndose mediante FWHM, la cual es el ancho completo a la mitad del máximo (Ecuación 5).

$$D = \frac{K\lambda}{(\beta \cos\theta)} = (0.9)(0.15406)/(\beta \cos\theta) \quad (4)$$

$$\beta = \frac{\pi}{180} * \text{FWHM} \quad (5)$$

6.1.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (Figura 6.5) (Bondarenko et al. 2013) (Tescan, MIRA 3LMU, Reino Unido) a 20 kV a un total de 5 nanomateriales. Se preparó la muestra mediante un proceso el método de fijación sputtering, el cual consiste en la colocación de una cinta de carbón en cada pin, y posteriormente la muestra en dicha cinta de carbón. Posteriormente se coloca el pin en el SEM donde se recubre con un material conductor (oro) durante 20 s (0.1 mL/s) de baño de oro para perfeccionar la imagen y lograr magnificaciones de 50,000-100,000 aumentos (hasta 4 nm) permitiendo su observación en el microscopio.

6.1.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

En la etapa de muestra (specimen stage) se optó por mantener estacionario la muestra, ya que es así como se determina la resolución espacial de la imagen TEM, creando una muestra circular con un diámetro de 3 mm. Posteriormente, este fue insertado en el vacío de la columna TEM sin introducir aire (airlock).

Se rotó sobre un eje perpendicular (horizontal o vertical) según fue necesario para examinar la forma de ciertas características o para visualizar la ubicación del ensamblaje de las nanopartículas. Se utilizó difracción de área seleccionada (Zhu, 2012) para limitar la región de la muestra a partir de la cual un electrón patrón de difracción se registró tomando $D \approx 20$ μm y un aumento de lente objetivo $M \approx 100$.

6.1.6 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software STATISTICA (Stat Soft inc 1984-2014. Tulsa, OK, USA) versión 12. La evaluación de las diferencias significativas para cada etapa experimental, se realizó por análisis de varianza con un nivel de significancia < 0.05 para el rechazo de hipótesis de igualdad de medias, seguido de un análisis post hoc de Tukey con un alfa de 0.05. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Además, para la etapa 1 y 2 se utilizó un diseño unifactorial en el que previamente se corroboró normalidad por la prueba Shapiro-Wilk.

6.2 ETAPA 2: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

6.2.1 Actividad antimicrobiana

Para evaluar el efecto antimicrobiano del nanomaterial, se realizó un ensayo mediante el método de Kirby-Bauer, generando un antibiograma disco-placa. Se inocularon los siguientes microorganismos *Escherichia Coli* (ATCC8939), *Enterococcus Faecalis* (ATCC19433), *Staphylococcus Aureus* (ATCC33862), *Salmonella paratyphi A* (ATCC9150), y *Listeria monocitogenes* (ATCC15313) en placas con agar Mueller-Hinton, la preparación del medio se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (BD bioxon).

En las placas se impregnaron sensidiscos (Figura 2) con los nanomateriales (ZnO-Mg) así como los controles positivos (ampicilina, 50 mg/mL) y negativo (agua). Posteriormente, las placas se incubaron a 38°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 cajas Petri por cada tratamiento resultando en 15 cajas y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de la medición de los halos de inhibición formados utilizando un vernier digital (Claude, 2015).

Los halos de inhibición formados por los controles positivos fueron comparados con los obtenidos por cada uno de los tratamientos. La interpretación del potencial efecto antimicrobiano se realizó considerando los criterios de: sensible (S, >17 mm), intermedia (I, 14-16 mm), o resistente (R, <13 mm) según las categorías establecidas por El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés). Seguido por un análisis de normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk para analizar el comportamiento de los tamaños tanto en una determinación cualitativa como cuantitativa.

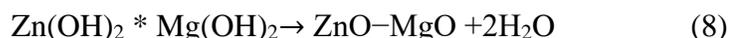
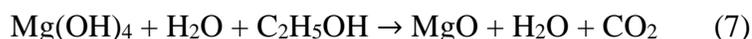
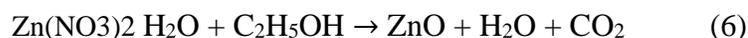
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

7.1.1 Síntesis de materiales

Las nanopartículas de ZnO y MgO se sintetizaron a partir de la hidroxilación de los precursores, debido a los procesos de evaporación y condensación propios del método de síntesis utilizado (Wang, 2021), tal como se muestra en la Ecuación 6 y Ecuación 7, respectivamente. Al igual que la mezcla de óxidos mixtos, tal como se muestra en la Ecuación 8 (Das, 2016).



7.1.2 Análisis por infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de infrarrojo se utilizó para identificar las vibraciones asociadas a los grupos funcionales existentes en el nanocomposito y sus interacciones (Figura 7.1). En lo referente al ZnO se detectaron bandas en las regiones de los 550, 650 cm^{-1} ; lo anterior, demuestra la presencia del enlace Zn-O (Christobel, 2016). Por su parte, en el MgO de igual manera se observaron señales (667 cm^{-1}) atribuidas a la presencia del enlace Mg-O (Ashok, 2015). Asimismo, en el FT-IR de los nanocompositos se detectaron las señales relacionadas con el ZnO y MgO (550, 650, 667 cm^{-1}), independientemente de la concentración del MgO como material dopante. Así mismo, se detectó una señal en 2329 cm^{-1} la cual es relacionada con el modo de vibración de O=C=O, esto consistente con lo reportado por Kayani (2015), en películas delgadas de ZnO obtenidas mediante el método de recubrimiento por inmersión sol-gel. Misma que disminuía en intensidad conforme aumentaba el dopante MgO en la composición. Esto nos indica que este grupo funcional puede asociarse con el efecto antimicrobiano.

Por otro lado, las vibraciones comprendidas entre la región de 1500 y 1700 cm^{-1} se asocian a vibraciones asimétricas O=C-O y de estiramiento en C=O de la estructura del ZnO, la banda

en 1600 cm^{-1} pertenece a las vibraciones O-H asociadas con la absorción de agua en las muestras, tal como lo reporta Anaya-Esparza (2019), en nanopartículas con $\text{TiO}_2\text{-ZnO-MgO}$.

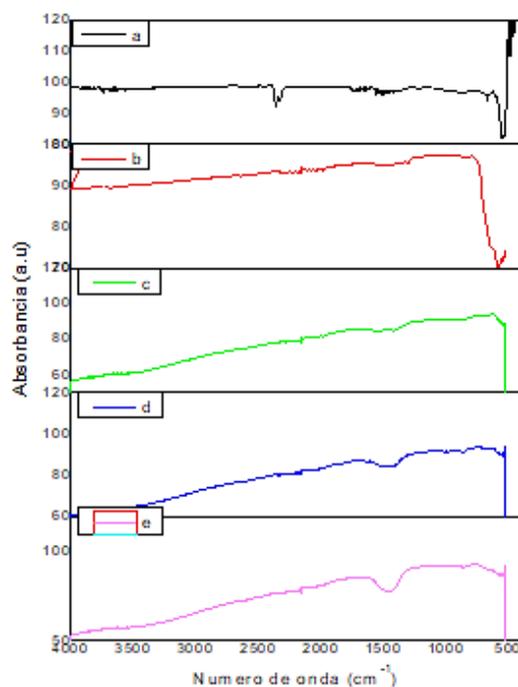


Figura 7.1 Espectros FT-IR nanomateriales. a) ZnO, b) MgO, c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%.

7.1.3 Difracción de rayos-X (DRX)

Las técnicas de DRX son utilizadas para evidenciar la estructura cristalina de los materiales, además de permitir calcular el tamaño de nanopartícula. La Figura 7.2 muestra el DRX del ZnO, MgO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%. En general, el DRX del ZnO presentó señales de difracción (2θ) a los 31.60° (100), 34.20° (002), 36.10° (101), 47.50° (102), 56.40° (110), 62.60° (103) y 68.80° (112) consistentes con la carta cristalográfica (JCPDS Card No.00-001-1136). Por su parte, el MgO mostró señales de difracción (2θ) a los 36.80° (111), 42.60° (200), 62.50° (220), 74.50° (311) y 78.40° (222) consistentes con la carta cristalográfica (JCPDS Card 75-1525). Adicionalmente, los nanocompositos formados por ZnO y MgO presentaron señales de difracción correspondientes tanto al ZnO como al MgO ($2\theta = 31.60^\circ$, $2\theta = 34.20^\circ$, $2\theta = 36.10^\circ$, $2\theta = 47.50^\circ$, $2\theta = 56.40^\circ$, $2\theta = 62.60^\circ$, $2\theta = 68.90^\circ$ y $2\theta = 74.50^\circ$). Cabe señalar, que al aumentar la concentración de magnesio la intensidad de la señal del ZnO

[(100) (002) (101)] disminuye. Lo anterior, ha sido previamente reportado en la literatura donde se argumenta que pudiera existir reemplazo de los iones de Zn^{2+} por iones de Mg^{2+} en la estructura cristalina del ZnO, lo anterior, asociado a que el Zinc presenta mayor radio iónico (0.60\AA) en comparación con el Magnesio (0.57\AA) (Rouchdi, 2017; Yousefi, 2013). Por su parte, los materiales ZnO, MgO, ZM 1%, ZM 3%, y ZM 5% presentaron tamaño de partícula de 20, 42, 24, 26, 23 nm respectivamente. Dobrucka (2018) reportó tamaños de partícula (utilizando la fórmula de Scherrer) de 10 nm en ZnO sintetizado por el método de coprecipitación. Del mismo modo, Kumar, (2013) informó un tamaño de partícula de 11 nm en partículas de MgO. Los autores mencionan que el incremento del tamaño de partícula puede estar relacionado con el incremento del tiempo de calcinación. Asimismo, se observó que existe un decremento en el tamaño de partícula en los nanocompositos a mayor concentración del MgO. Rouchdi (2017) menciona que la presencia de iones Mg^{2+} previene el crecimiento de cristales de ZnO, influyendo directamente en el tamaño de cristal formado debido al reemplazo de iones de Zn^{2+} por iones Mg^{2+} .

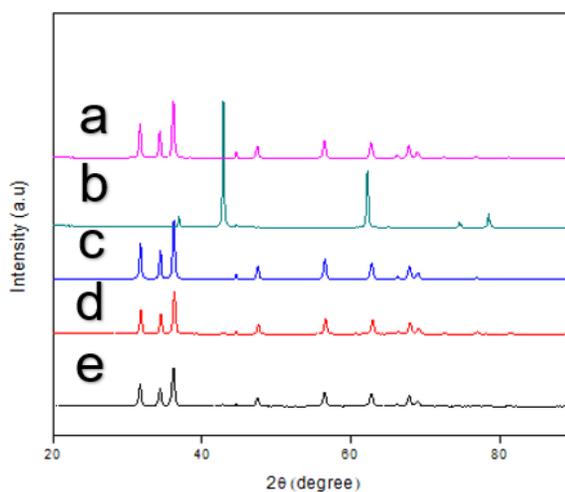


Figura 7.2 Difracción de Rayos X de nanomateriales. a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%.

7.1.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las microscopias SEM son utilizadas para visualizar la superficie de una muestra permitiendo observar las morfologías presentes. Las imágenes SEM, que se muestran en la Figura 7.3 indicaron la formación de nanopartículas ZnO mayoritariamente uniforme mostrándose en forma aglomerada en cubos o semi-globulares, tal como lo reportado por Al-Bedairy (2018), en nanopartículas ZnO sintetizadas mediante el método de microondas. Por otro lado, se observó una consistencia entre las superficies exteriores bien definidas y lisas en forma de nano-hojuelas observadas en nanopartículas MgO por Shi (2017) y aquella forma altamente aglomerada reportada por Zaidi (2019). Las morfologías mencionadas anteriormente son asimilables en los óxidos mixtos ZnO-MgO, las cuales mantienen las morfologías características. Las diferencias encontradas entre estos materiales mixtos se deben a las proporciones de sales utilizados durante la síntesis, las cuales tienen una afectación mínima sobre la morfología, alargando levemente las nano hojuelas observadas, mostrando mayor afectación en la morfología a mayor cantidad de dopante.

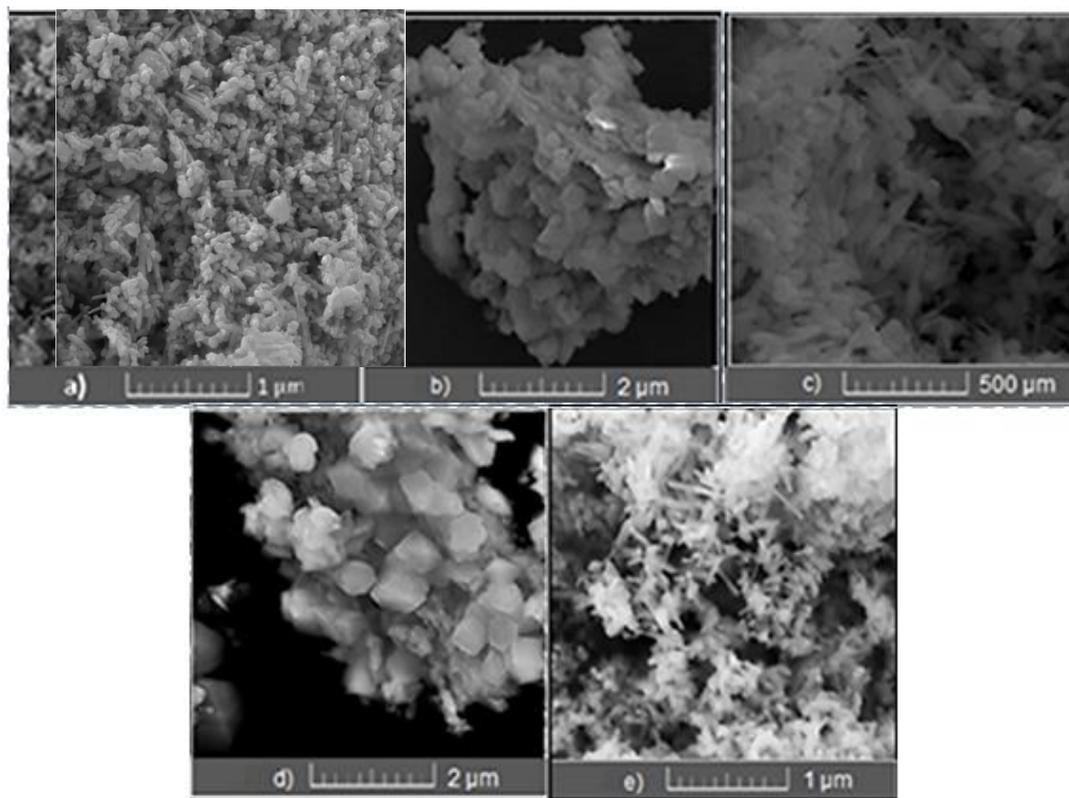


Figura 7.3 Microscopias SEM de Materiales a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%.

7.1.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La Figura 7.4 muestra las imágenes TEM de los materiales donde se apreciaron formas de varillas alargadas o esféricas con tamaños en rangos entre 20 y 49 nm calculados mediante el uso del software Image J (Public domain, BSD-2). Las partículas en la Figura 7.4 a, y b mostraron a ZnO y MgO respectivamente, en las cuales se puede visualizar que la primera se compone mayoritariamente por estructuras esféricas y la segunda por varillas elongadas. Ambas muestran tener su respectiva formulación como la única en su composición, es decir, no existen mezclas ni una aparente contaminación, indicadas por su interior translucido. Por otro lado, las microscopias de los nanocompositos ZM 1%, ZM 3%, y ZM 5% (Figura 7.4 c,d y e, respectivamente) muestran la integración de las sales en el interior de las partículas que la componen, esto sugerido por la opacidad del interior de las partículas, las cuales indican que tuvieron una correcta estructuración.

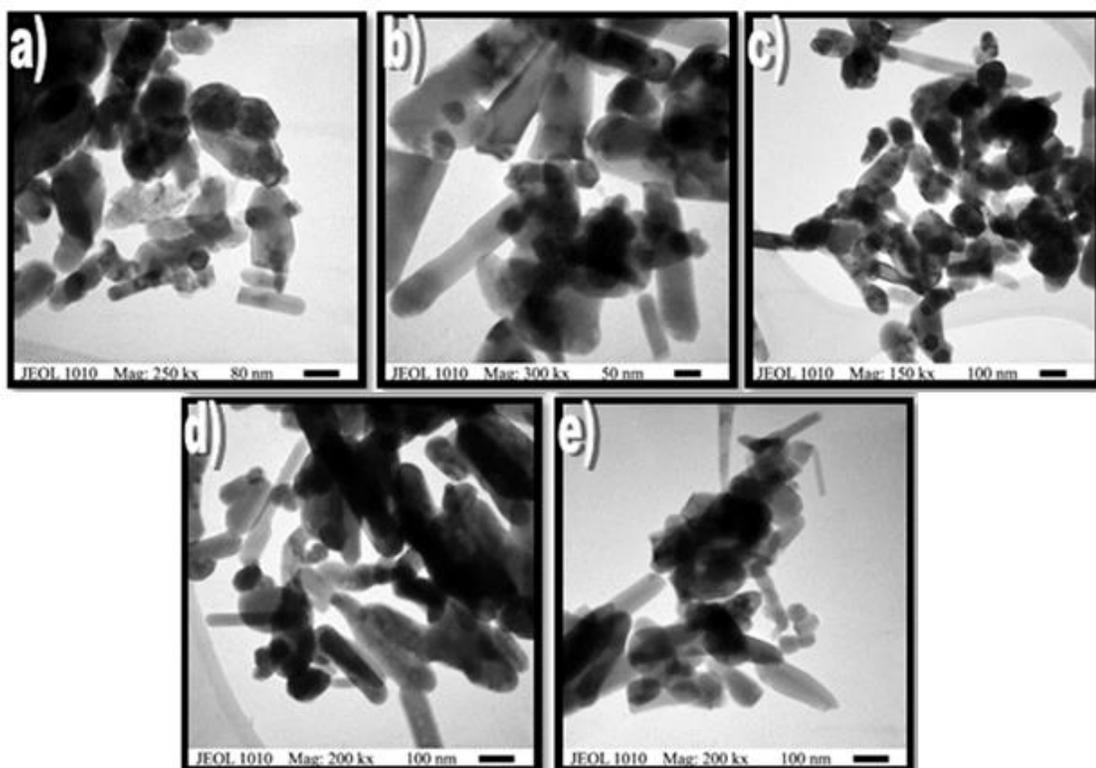


Figura 7.4 Microscopias TEM de materiales, a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%

Los histogramas obtenidas Figura 7.5 (c,e) presentaron formas similares a una curva de distribución normal indicando una mayor homogeneidad en el tamaño de partícula. El Cuadro 7.1 muestra valores de tamaño de partícula consistentes con aquellos obtenidos mediante la ecuación de Scherrer (ecuación 3) utilizado en DRX, en la que se obtuvieron tamaños de partícula de 20, 48, 24, 26 y 23 nm para los tratamientos ZnO, MgO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%, respectivamente, observándose que no existieron diferencias significativas atribuidas a las cantidades de dopante (MgO) utilizados ($p > 0.05$). Esto además indica que el tamaño de NPs en aquellos materiales con dopante, asemejan el tamaño de ZnO por tener ZnO mayoritariamente en su composición. Los tamaños de partícula reportadas para nanopartículas MgO puro según Kumar (2013) se encontraron en el rango de 28-64 nm estas con una naturaleza higroscópica, lo cual es consistente con los valores y propiedades obtenidos del material. Del mismo modo, es consistente el tamaño de ZnO sintetizado mediante el método de coprecipitación el cual mostró tener un tamaño de 20 nm, según lo reportado por Bayathathagari (2013). La determinación de datos normales a través del análisis de normalidad de Shapiro-Wilk, indicó el comportamiento normal de los tamaños de las nanopartículas ZnO, MgO, ZM 1%, y ZM 5%, por otro lado, ZM 3% resultó no normal ($P=0.00220$).

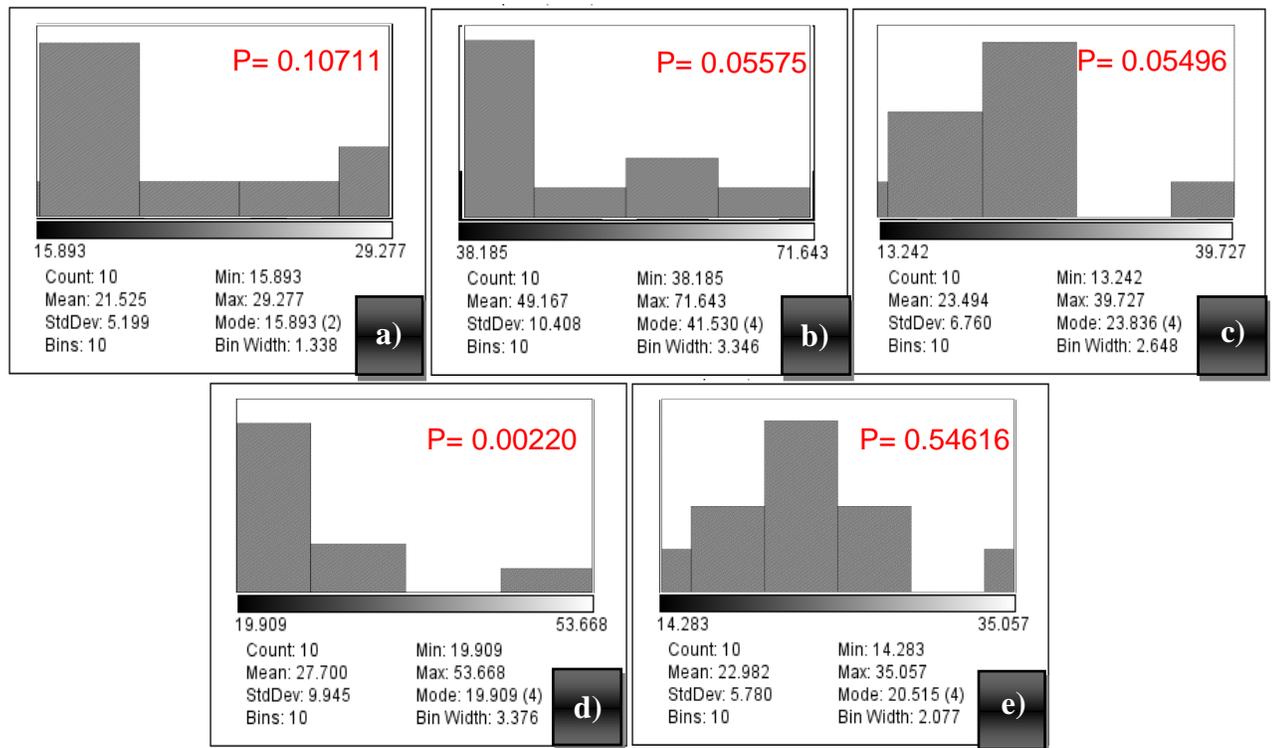


Figura 7.5 Histogramas de distribución de tamaños de partícula de los materiales sintetizados a) ZnO, b) MgO c) ZM 1%, d) ZM 3%, e) ZM 5%

Cuadro 7.1 Promedio de tamaño de partícula de nanomateriales

Material	Promedio de tamaño de partícula (nm)
ZnO	21± 5 a
MgO	49± 10 b
ZM 1%	24± 6 a
ZM 3%	27± 9 a
ZM 5%	22± 5 a

*Letras diferentes indican diferencias significativas. ZM 1%: ZnO-MgO 1%, ZM 3%: ZnO-MgO 3%, ZM 5%: ZnO-MgO 5%

7.2 Actividad antimicrobiana

Las técnicas de antibiogramas por difusión han sido normalizadas para microorganismos de crecimiento rápido. Se evaluó la actividad antimicrobiana de dos hidróxidos dobles laminares ZnO, MgO, ZM 1%, ZM 3%, y ZM 5%. Utilizando también un control positivo (ampicilina 50 µg/ml) y negativo (Agua). En este antibiograma fueron utilizados como cepas causantes de ETAs, las bacterias patógenas *Escherichia Coli* (ATCC 8939), *Enterococcus Faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus Aureus* (ATCC 33862), *Salmonella paratyphi A* (ATCC 9150), y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) en todos los casos (Cuadro 7.2). Se realizó la prueba de actividad antimicrobiana por triplicado.

Cuadro 7.2 Antibiograma con sensidiscos de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.

Material	Cepas Control				
	<i>S. paratyphi A</i> (ATCC 9150)	<i>E. Faecalis</i> (ATCC 19433)	<i>S. Aureus</i> (ATCC 33862)	<i>L.Monocytogene</i> s (ATCC 15313)	<i>E. coli</i> (ATCC 8939)

El cuadro 7.3 muestra que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos comparado con el control positivo. Los óxidos mixtos (ZM 1, 3, y 5%) mostraron actividades antibacterianas significativas tanto contra bacterias Gram positivos como Gram negativos, *E. coli*, *S. paratyphi*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, y *E. Faecalis* aunque el efecto antibacteriano varió dependiendo del tipo de microorganismo. El material ZM1% mostró tener una actividad antimicrobiana significativa para *S. paratyphi*, *S. aureus* y *E. Faecalis*. Por otro lado, el halo de inhibición más alto fue encontrado en *E. Faecalis* (24 mm) con el material ZM 1%, y el más bajo en *E. coli* (14 mm) con ZM 5%. Es importante mencionar que se encontró un halo de inhibición de 19 mm con el material ZM 3% en *S. aureus*, mientras que en ZM 1% se observó un halo de inhibición notablemente menor (10

mm) con la misma cepa. El cuadro 7.4 muestra los resultados obtenidos en la prueba de actividad antimicrobiana de las formulaciones de materiales mediante el método Kirby Bauer, realizando la medición e interpretación de los halos de inhibición según las normas NCCLS, las cuales son consistentes con los resultados obtenidos en el análisis estadístico.

Cuadro 7.3 Actividad antimicrobiana con valores de halos de inhibición (mm) de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.

Material	Código	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>S. parathyphi</i> (mm)	<i>E. Faecalis</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>L. monocytogenes</i> (mm)
Ampicilina (C+)	C	19 ± 1 ^a	16 ± 0.5 ^{ab}	17 ± 0.5 ^{ab}	13 ± 1.15 ^a	20 ± 1 ^a
ZnO	Z	15 ± 2.5 ^{ab}	13 ± 3.05 ^a	13 ± 2.08 ^a	15 ± 2.3 ^a	15 ± 0.5 ^b
ZM 1%	ZM1	10 ± 0.5 ^b	21 ± 1.73 ^b	24 ± 1.73 ^b	18 ± 0.5 ^a	22 ± 1.15 ^a
ZM 3%	ZM3	19 ± 4.5 ^a	15 ± 3.055 ^a	18 ± 6.4 ^{ab}	15 ± 2.6 ^a	22 ± 2.08 ^a
ZM 5%	ZM5	17 ± 1.15 ^a	17 ± 1.15 ^{ab}	16 ± 2.6 ^{ab}	14 ± 0 ^a	20 ± 1.15 ^a

Los valores equivalen a el promedio de determinaciones hechas por triplicado más desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. Se aplicó un one way ANOVA/Tukey test ($p < 0.05$); mientras que comparaciones de promedios para todos los grupos mediante Kruskal-Wallis/Multiple fueron aplicados en *E. coli*, *E. Faecalis* ($p < 0.05$).

Cuadro 7.4 Actividad antimicrobiana con valores de halos de inhibición (mm) de ZnO, ZM 1%, ZM 3%, ZM 5%.

Material	Cepas				
	A	B	C	D	E
1: ZnO	I	I	I	I	I
2: ZM 1%	R	S	S	S	S
3: ZM 3%	S	S	S	I	S
4: ZM 5%	S	S	I	I	S
5: +	S	S	S	S	S
6: -	R	R	R	R	R

A: *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862), B: *Salmonella paratyphi* A (ATCC 9150), C: *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), D: *Escherichia coli* (ATCC 8939), E: *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). R: Resistente, I: Intermedio, y S: Susceptible.

Se ha reportado el efecto antimicrobiano de nanopartículas ZnO en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, y *Staphylococcus epidermidis*, Santhoshkumar (2017) propuso que se puede atribuir este efecto a el exceso de Zn^{2+} generando una alteración del metabolismo celular, o también a la generación de muerte celular. En el caso de los óxidos mixtos en específico se argumenta que pudiera existir reemplazo de los iones de Zn^{2+} por iones de Mg^{2+} en la estructura cristalina del ZnO, asociado a el mayor radio iónico (0.60Å) del Zinc en comparación con el Magnesio (0.57Å) (Rouchdi, 2017; Yousefi, 2013). Una cantidad menor de dopante (ZM 1%) resultó más efectivo para generar un efecto antimicrobiano mayor, debido a que el reemplazo de iones Zn^{2+} por iones de Mg^{2+} , permitió un cambio en la conformación de la nanopartícula sin perder la estructura característica de la sal mayoritaria. Está reportado que las nanopartículas de óxidos mixtos ejercen un daño en la membrana celular, mediante la unión de éstas a la membrana celular, mostrándose en bacterias patógenas tales como *Escherichia coli O157:H7*, y *Salmonella paratyphi A*, esto causa un derrame del contenido intracelular lo que deriva en la muerte de las células bacterianas (Jin, 2011). Estos mecanismos crean un potencial alto para su posible uso como agente antimicrobiano, ya que los resultados muestran mayor susceptibilidad en los valores de halos de inhibición en el tratamiento ZM 1% en comparación con el control (ampicilina), el cual es el estándar para inhibición microbiana en este método, y es utilizado por su uso en enfermedades infecciosas. El efecto de inhibición de ZM1% notablemente menor en la cepa *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) en comparación con ZM 3%, aun cuando ZM 1% tiene el efecto de inhibición más alto en *Enterococcus faecalis* (Gram positivo), podría deberse a la especie de bacterias y a la variación de la envoltura celular de bacteriana (cargas electrostáticas superficiales y fisiología-morfología celular). Esto coincide con lo reportado por Anaya-Esparza et al. (2019) con óxidos mixtos de TiO₂-ZnO-MgO, donde se menciona que las bacterias pueden cambiar las cargas electrostáticas en las moléculas superficiales mediante la expresión de algunos productos génicos, su mecanismo consiste en promover la adición de aminoácidos (por ejemplo, Lysol-fosfatidilglicerol) en su estructura. Lo cual a su vez proporciona un efecto protector contra los compuestos catiónicos disminuyendo el efecto antimicrobiano de los óxidos mixtos en las bacterias.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los óxidos mixtos a base de ZnO (ZnO-MgO) se sintetizaron exitosamente mediante el método de microondas, los cuales presentaron un tamaño nanométrico con forma aglomerada en cubos o semi-globulares de una manera mayoritariamente uniforme. Las propiedades texturales de los óxidos mixtos cambiaron en función a la concentración de dopante (MgO), a pesar de ello, se preservaron las características del ZnO independientemente del dopante añadido.

Además, se presentó un efecto antimicrobiano de parte de los óxidos mixtos (ZnO-MgO) en contra de, *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella paratyphi A*, y *Listeria monocytogenes*, mostrando su efectividad en bacterias tanto Gram negativas como positivas, dependiente de la concentración del dopante y el tipo de microorganismo resultando ZM 1% la más efectiva. Una cantidad menor de dopante (ZM 1%) resultó más efectivo para generar un efecto antimicrobiano mayor, debido a que el reemplazo de iones Zn^{2+} por iones de Mg^{2+} , permitió un cambio en la conformación de la nanopartícula sin perder la estructura característica de la sal mayoritaria.

Es posible que actúen los óxidos mixtos por dos mecanismos, en la primera permitiendo una formación excesiva de especies reactivos de oxígeno (ROS), las cuales llevan a el estrés oxidativo y por último a daño celular. Otra posibilidad se encuentra dentro el tamaño nanométrico que exhibe este material, ya que permite una mayor proporción de átomos o moléculas las cuales se exhiben en la superficie en lugar del interior del material, ejerciendo daño a la membrana celular, mediante la unión de estas a la membrana celular, finalmente causando derrame del contenido intracelular.

Se sugiere para futuros estudios, probar el mecanismo de acción de ZM 1% en bacterias para determinar el mecanismo específico del material.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Ahmad, J. D., Sourabh Alarifi, Saud Al-Khedhairi, Abdulaziz A. Musarrat, Javed. (2012). Use of β -galactosidase (lacZ) gene α -complementation as a novel approach for assessment of titanium oxide nanoparticles induced mutagenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(2), 246-252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.06.002>
- Al-Bedairy, M. A., Hassan. (2018). Environmentally Friendly Preparation of Zinc Oxide, Study Catalytic Performance of Photodegradation by Sunlight for Rhodamine B Dye. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 13. <https://doi.org/10.29333/ejac/101785>
- Anaya-Esparza, L. M., González-Silva, N., Yahia, E. M., González-Vargas, O. A., Montalvo-González, E., & Pérez-Larios, A. (2019). Effect of TiO₂-ZnO-MgO Mixed Oxide on Microbial Growth and Toxicity against *Artemia salina*. *Nanomaterials (Basel)*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/nano9070992>
- Anaya-Esparza, L. M. M.-G., Efigenia González-Silva, Napoleón Méndez-Robles, María D. Romero-Toledo, Rafael Yahia, Elhadi M. Pérez-Larios, Alejandro. (2019). Synthesis and Characterization of TiO₂-ZnO-MgO Mixed Oxide and Their Antibacterial Activity. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(5), 698. <https://doi.org/10.3390/ma12050698>
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonné, F., & Joly, B. (2002). In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol*, 153(2), 75-80. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01291-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01291-8)
- Ashok, C. V., Rao K Shilpa, Chakra CH. (2015). Synthesis and Characterization of MgO/TiO₂ Nanocomposites. *Journal of nanomedicine and nanotechnology*, 6(6), 1-5. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000329>
- Bai, Y., Yu, H., Li, Z., Amal, R., Lu, G. Q., & Wang, L. (2012). In Situ Growth of a ZnO Nanowire Network within a TiO₂ Nanoparticle Film for Enhanced Dye-Sensitized Solar Cell Performance. *Journal of Applied Physics*, 112(12), 124301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201201992>
- Sankarankutty, K. M. (2014). Biosensors and their applications for ensuring food safety. *Global Journal of Pathology and Microbiology*, 2(1), 15-21.
- Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K., Han, Y.-K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1201-1214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011>

- Banerjee, T., Shelby, T., & Santra, S. . (2017). How can nanosensors detect bacterial contamination before it ever reaches the dinner table? *Future microbiology* 12, 97-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0202>
- Bayathathagari, s. r. R., S. Nandanapalli, Koteeswara Reddy. (2013). Physical and magnetic properties of (Co, Ag) doped ZnO nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 24. <https://doi.org/10.1007/s10854-013-1545-z>
- Becker, K.; Von Eiff, C. (2011). *Manual of Clinical Microbiology* (10 ed., Vol. 1). ASM Press.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch Toxicol*, 87(7), 1181-1200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>
- Buzulukov Iu, P. Arianova, E.A. V.F. Demin, I.V. Safenkova, I.V. Gmshinskii, V.A. Tutel'ian. (2014). Bioaccumulation of silver and gold nanoparticles in organs and tissues of rats by neutron activation analysis. *Serie biologica*, 286-295.
- Choi, O. D., Kathy Kanjun Kim, Nam-Jung Ross, Louis Surampalli, Rao Y. Hu, Zhiqiang. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42(12), 3066-3074. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.021>
- Christobel, J. G. (2016). Vibrational Spectroscopy of ZnO- ZnS Nanoparticles. *International Journal of Science and Research*, 5(6), 2228-2230.
- Claude, P. C., R. Paul, Ross Maria, Saarela Ken, Flemming, Hansen Dimitris ,Charalampopoulouse (2015). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- D. Krishna, V. W., Kai Su, Diqing Cheeran, Maxim C.J Wang, Jian-ping Perez, Andres. (2018). Nanotechnology: Review of concepts and potential applications of sensing platforms in food safety. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.025>
- Das, S. S., Vimal. (2016). Synthesis and Characterization of ZnO–MgO Nanocomposite by Co-precipitation Method. *Smart Science*, 4, 1-6. <https://doi.org/10.1080/23080477.2016.1260425>
- Dastjerdi, R., & Montazer, M. (2010). A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79(1), 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.029>

- Dizaj, S. M. L., F. Barzegar-Jalali, M. Zarrintan, M. H. Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 44, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>
- Environmental Decision Memo for Food Contact Notification No. 1569; U.S.FDA, (2015).
- Fan, G., Li, F., Evans, D. G., & Duan, X. (2014). Catalytic applications of layered double hydroxides: recent advances and perspectives [10.1039/C4CS00160E]. *Chemical Society Reviews*, 43(20), 7040-7066. <https://doi.org/10.1039/C4CS00160E>
- Foster, T. J. G., Joan A. . (2015). Chapter 37 - Staphylococcus aureus. *Molecular Medical Microbiology (Second edition)*, 2, 655-674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00037-8>
- Fu, P. P. X., Qingsu Hwang, Huey-Min Ray, Paresh C. Yu, Hongtao. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 64-75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
- Gao, X. L., Ximeng & Wu, Dajun & Qian, Bin & Kui, Kou & Pan, Zhenghui & Pang, Yajun & Miao, Linqing & Wang, John. . (2019). Significant Role of Al in Ternary Layered Double Hydroxides for Enhancing Electrochemical Performance of Flexible Asymmetric Supercapacitor. *Advanced Functional Materials*, 29. <https://doi.org/903879>. 10.1002/adfm.201903879
- Goodsell, D. S. (2009). Escherichia coli. 37(6), 325-332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.20345>
- Gupta, A. E., H. Burak Hatton, T. Alan Doyle, Patrick S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications [10.1039/C5SM02958A]. *Soft Matter*, 12(11), 2826-2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- He, X. H., Huey-Min. (2016). Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 671-681. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.001>
- Hoffmann, S. M., B Batz, MB. . (2015, Tuesday, May 12, 2015). *Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States*. . Washington: US Department of Agriculture Economic Research Service. Retrieved April 15 from <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=43987>External Link
- Hotze, E. M. P., T. Lowry, G. V. (2010). Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *J Environ Qual*, 39(6), 1909-1924. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0462>
- Jin, T. H., Yiping. (2011). Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), 6877-6885. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0595-5>

- Kayani, Z. I., Maryam Riaz, Saira Zia, Rehana Naseem, Shahzad (2015). "Fabrication and properties of zinc oxide thin film prepared by sol-gel dip coating method." *MATERIALS SCIENCE-POLAND* **33** <https://doi.org/10.1515/msp-2015-0085>
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, *15*(6), 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Khan, S. T., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A. A. (2016). Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *146*, 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.046>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., & Cho, M. H. (2012). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, *3*, 95-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kumar, R. S., Ashwani Kumar Kishore, N. (2013). Preparation and Characterization of MgO Nanoparticles by Co-Precipitation Method.
- Laipan, M., Yu, J., Zhu, R., Zhu, J., Smith, A. T., He, H., . . . Sun, L. (2020). Functionalized layered double hydroxides for innovative applications [10.1039/C9MH01494B]. *Materials Horizons*, *7*(3), 715-745. <https://doi.org/10.1039/C9MH01494B>
- Le Minor, L., & Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. *37*(4), 465-468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-465>
- Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *22*(4), e13186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cmi.13186>
- Li, K. Z., Xiaonan K. Hammer, Brian Du, Songyan Chen, Yongsheng. (2013). Nanoparticles Inhibit DNA Replication by Binding to DNA: Modeling and Experimental Validation. *ACS Nano*, *7*(11), 9664-9674. <https://doi.org/10.1021/nn402472k>
- Liu, G., Lao, R., Xu, L., Xu, Q., Li, L., Zhang, M., Song, S. (2011). Detection of single-nucleotide polymorphism on *uidA* gene of *Escherichia coli* by a multiplexed electrochemical DNA biosensor with oligonucleotide-incorporated nonfouling surface. *Sensors (Basel)*, *11*(8), 8018-8027. <https://doi.org/10.3390/s110808018>
- Lu, Z. R., Kaifeng Li, Ju Yang, Hao Chen, Rong. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *24*(6), 1465-1471. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>

- Maqusood, A., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A. M., Karuppiyah, P., & Al-Dhabi, N. A. (2014). Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 637858. <https://doi.org/10.1155/2014/637858>
- McLauchlin, J. R., Catherine E. D. (2015). *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-29). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00547>
- Minor, T. L., A Klontz, K Brown, B, Nardinelli, C Zorn, D. (2015). The Per Case and Total Annual Costs of Foodborne Illness in the United States. *Risk Analysis*, 35, 1125–1139. <https://doi.org/5> <https://doi.org/10.1111/risa.12316>
- Moraru, C., Huang, Q., Takhistov, P., Dogan, H., & Kokini, J. (2009). CHAPTER 21 - Food Nanotechnology: Current Developments and Future Prospects. In G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, & P. Colonna (Eds.), *Global Issues in Food Science and Technology* (pp. 369-399). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00021-1>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. . (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 2346–2353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Nguyen, N.-Y. T. G., Nathaniel Wetteland, Cheyann Lee Rosario, Romeo Liu, Huinan. (2018). Antimicrobial Activities and Mechanisms of Magnesium Oxide Nanoparticles (nMgO) against Pathogenic Bacteria, Yeasts, and Biofilms. *Scientific Reports*, 8(1), 16260. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34567-5>
- O'Bryan, C. A. C., Philip G. Ricke, Steven C. (2018). Chapter 6 - Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens. In S. C. Ricke, G. G. Atungulu, C. E. Rainwater, & S. H. Park (Eds.), *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 99-115). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00006-3>
- Park, H.-J. P., Soomin Roh, Jinkyu Kim, Sujin Choi, Kyunghee Yi, Jongheop Kim, Younghun Yoon, Jeyong. (2013). Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(2), 614-619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.09.013>
- Pathakoti, K. M., Manjunath Hwang, Huey-Min. (2017). Nanostructures: Current uses and future applications in food science. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 245-253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.02.004>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>

- Pitout, J. D. D. (2011). *Escherichia Coli*. In *Molecular Techniques for the Study of Hospital-Acquired Infection* (pp. 179-192).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118063842.ch11>
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. E. (2015). *Salmonella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-1).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01166>
- Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., Gamboa, M. d. M., & Arias, M. L. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses %J Archivos Latinoamericanos de Nutrición. *60*, 179-183.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222010000200011&nrm=iso
- Rouchdi, M. S., E. Fares, B. Hassanain, N. Mzerd, A. (2017). Synthesis and characteristics of Mg doped ZnO thin films: Experimental and ab-initio study. *Results in Physics*, *7*, 620-627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.01.023>
- Rubab, M., Shahbaz, H. M., Olaimat, A. N., & Oh, D.-H. (2018). Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*, *105*, 49-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.023>
- Sankarankutty, K. M. (2014). Biosensors and their Applications for Ensuring Food Safety. *Global Journal of Pathology and Microbiology*, *2*, 15-21.
- Santhoshkumar, J., Kumar, S., Venkat Rajeshkumar, S. (2017). Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. *Resource-Efficient Technologies*, *3*(4), 459-465.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.05.001>
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V. Widdowson, MA Roy, SL, et al. . (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging infectious diseases*, *17*, 7-15.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot*, *75*(1), 123-131. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-11-058>
- Schleifer, K.-H., & Bell, J. A. (2015). *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-43).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00569>
- Sharif, M. K. J., Komal Nasir, Ayesha. (2018). Chapter 15 - Foodborne Illness: Threats and Control. In A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), *Foodborne Diseases* (pp. 501-523). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00015-4>

- Shi, X.-H. B., Jin-Jin Zhang, Li Sun, Zhi-Peng Jia, Dian-Zeng Xu, Guan-Cheng. (2017). Preparation and exceptional adsorption performance of porous MgO derived from a metal-organic framework. *RSC Adv.*, 7, 16189-16195. <https://doi.org/10.1039/C7RA00526A>
- Silvestre, C. D., Donatella Cimmino, Sossio. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36(12), 1766-1782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003>
- Singh, T., Shukla, S., Kumar, P., Wahla, V., Bajpai, V. K., & Rather, I. A. (2017). Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview [Mini Review]. 8(1501). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01501>
- Sirelkhatim, A. M., Shahrom Seeni, Azman Kaus, Noor Haida Mohd. (2016). Preferential cytotoxicity of ZnO nanoparticle towards cervical cancer cells induced by ROS-mediated apoptosis and cell cycle arrest for cancer therapy. 18, 219. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3531-x>
- Stanković, M., Gabrovska, M., Krstić, J., Tzvetkov, P., Shopska, M., Tsacheva, T., . . . Jovanović, D. (2009). Effect of silver modification on structure and catalytic performance of Ni-Mg/diatomite catalysts for edible oil hydrogenation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 297(1), 54-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcata.2008.09.004>
- Sun, S. P., Zeng, X., & Lemley, A. T. (2013). Nano-magnetite catalyzed heterogeneous Fenton-like degradation of emerging contaminants carbamazepine and ibuprofen in aqueous suspensions and montmorillonite clay slurries at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, 371, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.01.027>
- Švec, P., & Devriese, L. A. (2015). Enterococcus. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-25). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00600>
- Talebian, N., Amininezhad, S. M., & Doudi, M. (2013). Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. *J Photochem Photobiol B*, 120, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.01.004>
- Tang, Z.-X. L., Bin-Feng. (2014). MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity %J Brazilian Journal of Chemical Engineering. 31, 591-601. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322014000300002&nrm=iso
- Vandebriel, R., De Jong, W. (2012). A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl.*, 5: , 61-71.

- Vital, P. G., Dimasuay, K. G. B., Widmer, K. W., & Rivera, W. L. (2014). Microbiological Quality of Fresh Produce from Open Air Markets and Supermarkets in the Philippines. *The Scientific World Journal*, 2014, 219534. <https://doi.org/10.1155/2014/219534>
- Von Moos, N. S., Vera I. (2014). Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 8(6), 605-630. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>
- Wan, J., Lacey, S. D., Dai, J., Bao, W., Fuhrer, M. S., & Hu, L. (2016). Tuning two-dimensional nanomaterials by intercalation: materials, properties and applications [10.1039/C5CS00758E]. *Chemical Society Reviews*, 45(24), 6742-6765. <https://doi.org/10.1039/C5CS00758E>
- Wang, T. L., Xu Zhang, Xiaosheng Dong, Jinxiang. (2021). Rapid Synthesis of Asymmetric Methyl-Alkyl Carbonates Catalyzed by α -KMgPO₄ in a Sealed-Vessel Reactor Monowave 50. *11*(4), 499. <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/4/499>
- Wu, H. Y., Jun-Jie Wamer, Wayne G. Zeng, Mingyong Lo, Y. Martin. (2014). Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 86-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.007>
- Xi, A. B., Geoffrey D. (2014). Centrifugation-based assay for examining nanoparticle–lipid membrane binding and disruption [10.1039/C3AN01601C]. *Analyst*, 139(5), 973-981. <https://doi.org/10.1039/C3AN01601C>
- Yamamoto, O. O., Toshiaki Alvarez, Kelly Fukuda, Masayuki. (2010). Antibacterial characteristics of CaCO₃–MgO composites. *Materials Science and Engineering: B*, 173(1), 208-212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mseb.2009.12.007>
- Yousefi, R. Z., A. Khorsand Jamali-Sheini, Farid. (2013). Growth, X-ray peak broadening studies, and optical properties of Mg-doped ZnO nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 16(3), 771-777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mssp.2012.12.025>
- Yu, J. W., Qiang O'Hare, Dermot Sun, Luyi. (2017). Preparation of two dimensional layered double hydroxide nanosheets and their applications [10.1039/C7CS00318H]. *Chemical Society Reviews*, 46(19), 5950-5974. <https://doi.org/10.1039/C7CS00318H>
- Zaidi, B. B., Slimen Ullah, Muhammad Hadjoudja, Bouzid Guerraoui, amal Gagui, Souheyla Houaidji, N. Chouial, B. Shekhar, Chander. (2019). Investigation on Synthesis of MgO Powder by Liquid Phase method. *Metallofizika i novešhie tekhnologii*, 41, 1121–1126. <https://doi.org/10.15407/mfint.41.08.1121>
- Zhang, Z. Z., J. Du, X. (2019). Electrochemical Biosensors for Detection of Foodborne Pathogens. *Micromachines (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/mi10040222>

Zhu, J. S., Rakesh & Wei, Suying & Chen, Daniel & Haldolaarachchige, Neel & Luo, Zhiping & Gomes, Andrew & Young, D. & Guo, Zhanhu. . (2012). Magnetic Graphene Nanoplatelet Composites toward Arsenic Removal. . *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 1. <https://doi.org/10.1149/2.010201jss>.