

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERETARO

**INTERCAMBIO IONICO DE Ag, Cu Y Zn EN
CLINOPTILOLITA PARA APLICACIONES
BACTERICIDAS**

Tesis que presenta

Diana Ruiz Serrano

**CINVESTAV
IPN
ADQUISICION
DE LIBROS**

Para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Materiales

Director de la Tesis: **Dr. Rafael Ramírez Bon**

**CINVESTAV I.P.N.
SECCION DE INFORMACION
Y DOCUMENTACION**

Santiago de Querétaro, Qro.

Septiembre 2005

CLASIF.: TA404.2-R85 2005
ADQUIS.: U2-058
FECHA: 21-ABRIL-2006
PROCED.: DOW-2006
\$ _____

F. D. 124146-2001

Agradecimientos

A mi asesor de Tesis, Dr. Rafael Ramírez Bon por darme la oportunidad de colaborar en este importante proyecto, por haberme orientado con su experiencia y aprender de ello, brindarme su paciencia y apoyo siempre, Gracias.

A los doctores Yuri V. Vorobiev y Juan Muñoz Saldaña por aportar sus valiosas ideas y poder concluir este trabajo.

Al Dr. Javier Castro Rosas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por haber contribuido con sus ideas, conocimientos y apoyo experimental en el área de microbiología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y el apoyo (beca) para sustentar mis estudios.

Al CONCYTEQ por el apoyo a través del proyecto de Fondos Mixtos Qro – 2003 – co1 10419

A todos los doctores que usaron su valioso tiempo instruyéndome en las clases de la Maestría de Cinvestav, Qro. y a los auxiliares de investigación Rivelino Flores Farias y José Eleazar Urbina Elizalde por su apoyo en la caracterización del material en estudio de la presente Tesis.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Qro., por abrirme las puertas brindándome la oportunidad de realizar mis estudios de maestría permitiendo desarrollarme personal y profesionalmente.

Agradecimientos

A mis padres Francisco Ruiz Estrada y Elvira Serrano Sánchez y a mis hermanos por brindarme su amor, apoyo, cariño y paciencia incondicional.

A mi amado y querido esposo Ranulfo Lara T., por amarme, apoyarme, alentarme y ser un gran ejemplo en mi vida, Gracias mi amor.

A mis amigos José Ángel Cabral M., Sonia Lorena Ramos F., Blanca Yamel Medina A., Israel López B., Oswaldo Enrique Linares R. y Norma Morales H. por brindarme su valiosa amistad, su apoyo y su afecto, Gracias amigos.

Índice

| | |
|--|------|
| Lista de figuras | iv |
| Lista de Tablas | viii |
| Resumen | x |
| I. Introducción | 1 |
| II. Antecedentes | 7 |
| III. Hipótesis | 20 |
| IV. Objetivos | 20 |
| IV.1. Objetivo General | 20 |
| IV.2. Objetivos Particulares | 20 |
| V. Procedimiento Experimental | 21 |
| V.1. Elaboración de Muestras | 21 |
| V.1.1 Materiales | 21 |
| V.1.2 Metodología | 23 |
| V.1.3 Técnicas de Caracterización | 29 |
| V.1.3.1 Difracción de Rayos X | 29 |
| V.1.3.2 SEM (EDS) | 29 |
| V.1.3.3 Determinación de Propiedades Antibacterianas | 29 |
| VI. Resultados Experimentales y Discusiones | 30 |
| VI.1 Caracterización de la Zeolita natural Clinoptilolita | 31 |
| VI.2 Activación de la Zeolita natural Clinoptilolita | 35 |
| VI.3 Intercambio Iónico en la Zeolita natural Clinoptilolita con iones de Ag, Cu y Zn | 45 |
| VI.4 Determinación de Propiedades Antibacterianas | 58 |
| VII. Conclusiones | 67 |
| VII.1 Trabajo futuro | 68 |
| VIII. Bibliografía | 69 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1.1 Estructura cristalina de SiO_4 y de AlO_4 en forma tetraédrica..... | 2 |
| Fig. 1.2 Armazón estructural de Zeolitas sintéticas: a) zeolita F9;NaX y b) Zeolita A4..... | 2 |
| Fig. 1.3 Radios iónicos de algunos elementos químicos en pm..... | 3 |
| Fig. 2.1 Armazón estructural de zeolita natural (Clinoptilolita) y las dimensiones de su ventana α en Å | 8 |
| Fig. 2.2 Zeolita Clinoptilolita..... | 8 |
| Fig. 5.1.1 Autoclave para la esterilización..... | 22 |
| Fig. 5.1.2 Agar Soya Trypticaseina a 45°C..... | 22 |
| Fig. 5.1.3 Vaciado del Agar en cajas petri..... | 22 |
| Fig. 5.1.2.1 Equipo para activar zeolita..... | 24 |
| Fig. 5.1.2.2 Equipo de recuperación de muestra por filtración..... | 25 |
| Fig. 5.1.2.3 Suspensiones de NaCl 0.85% con 2% de zeolita..... | 27 |
| Fig. 5.1.2.4 Inoculación de bacteria de prueba..... | 27 |
| Fig. 5.1.2.5 Diluciones en cajas petri con AST fundido a 44°C | 27 |
| Fig. 5.1.2.6 Incubadora con las cajas petri y muestras de zeolita.. | 27 |
| Fig. 5.1.2.7 Ejemplo de un crecimiento de bacterias en cajas petri..... | 28 |
| Fig. 5.1.2.8 Cuenta colonias..... | 28 |
| Fig. 5.1.2.9 Esquema de la metodología experimental de la zeolita..... | 28 |
| Fig. 6.1.1 Difractograma de rayos X correspondiente a la Zeolita Clinoptilolita (Ficha PDF 791461)..... | 31 |
| Fig. 6.1.2 Imágenes de Microscopio electrónico de barrido de cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita..... | 32 |
| Fig. 6.1.3 Espectro de EDS de Zeolita natural Clinoptilolita..... | 33 |
| Fig. 6.1.4 Gráfico de promedios de porcentajes en peso de la zeolita natural Clinoptilolita..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Fig. 6.2.1 Difractograma de Rayos X correspondiente a la Zeolita activada con NaCl..... | 36 |
| Fig. 6.2.2 Imagen de microscopio electrónico de barrido de iones de sodio embebidos en los cristales de la zeolita Clinoptilolita..... | 37 |
| Fig. 6.2.3 Difractograma de Rayos X correspondiente a la Zeolita activada con NH ₄ Cl..... | 38 |
| Fig. 6.2.4 Imágenes de microscopio electrónico de los cristales de la zeolita Clinoptilolita activada con H ⁺ | 39 |
| Fig. 6.2.5 Difractogramas de Rayos X de la Zeolita natural Clinoptilolita a) Zeolita Pura, b) Zeolita activada con NaCl y c) Zeolita activada con NH ₄ Cl..... | 40 |
| Fig. 6.2.6 Espectro EDS de zeolita activada con NaCl..... | 41 |
| Fig.6.2.7 Espectro EDS de zeolita activada con NH ₄ Cl..... | 42 |
| Fig. 6.2.8 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en la zeolita natural en función del proceso de activación..... | 44 |
| Fig. 6.3.1 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) sin activación alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag ⁺ , c) Zn ⁺⁺ , d) Cu ⁺⁺ , e) Zn ⁺⁺ Ag ⁺ , f) Zn ⁺⁺ Cu ⁺⁺ y g) Cu ⁺⁺ Ag ⁺ | 45 |
| Fig. 6.3.2 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) activada con NaCl alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag ⁺ , c) Zn ⁺⁺ , d) Cu ⁺⁺ , e) Zn ⁺⁺ Ag ⁺ , f) Zn ⁺⁺ Cu ⁺⁺ g) Cu ⁺⁺ Ag ⁺ y h) Ag ⁺ Cu ⁺⁺ Zn ⁺⁺ | 47 |
| Fig. 6.3.3 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) activada con NH ₄ Cl alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag ⁺ , c) Zn ⁺⁺ , d) Cu ⁺⁺ , e) Zn ⁺⁺ Ag ⁺ , f) Zn ⁺⁺ Cu ⁺⁺ g) Cu ⁺⁺ Ag ⁺ | 48 |
| Fig. 6.3.4 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada sin activación en función del Ion metálico introducido..... | 50 |

| | |
|--|----|
| Fig. 6.3.5 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada sin activación en función de los Iones metálicos introducido | 50 |
| Fig. 6.3.6 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NaCl en función de los Iones metálicos introducidos. | 51 |
| Fig. 6.3.7 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NaCl en función de los Iones metálicos introducidos. | 52 |
| Fig. 6.3.8 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NH ₄ Cl en función de los Iones metálicos introducidos. | 53 |
| Fig. 6.3.9 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NH ₄ Cl en función de los Iones metálicos introducidos. | 53 |
| Fig. 6.3.10 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita. | 54 |
| Fig.6.3.11 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Ag. | 55 |
| Fig.6.3.12 Imagen SEM de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Ag. | 56 |
| Fig.6.3.13 Imagen SEM de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Ag | 56 |
| Fig.6.3.14 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Cu y Ag. | 57 |
| Fig.6.3.15 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Zn y Ag. | 58 |
| Fig. 6.4.1 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Escherichia coli</i> de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos. | 59 |

| | |
|---|----|
| Fig. 6.4.2 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Escherichia coli</i> de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos..... | 60 |
| Fig. 6.4.3 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos..... | 61 |
| Fig. 6.4.4 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> de zeolita natural activada alojando en subcavidades a diferentes iones metálicos..... | 62 |
| Fig. 6.4.5 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos..... | 63 |
| Fig. 6.4.6 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> de zeolita natural sin activar alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos | 64 |
| Fig. 6.4.7 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos..... | 65 |
| Fig. 6.4.8 Actividad inhibitoria sobre la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> de zeolita natural sin activar alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos..... | 66 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1.1 Yacimientos de Zeolitas Naturales en México..... | 4 |
| Tabla 6.1.1 Composición química de Zeolita natural Clinoptilolita..... | 34 |
| Tabla 6.2.1 Composición química de Zeolita natural Clinoptilolita con y sin Activación..... | 43 |
| Tabla 6.3.1 Muestras hechas con intercambio iónico en la zeolitas con y sin activar..... | 45 |

Abstract

Zeolites are nanoporous crystalline materials composed by Si, Al and O atoms, which constitute a framework structure of cages interconnected through channels with molecular dimensions. The chemical composition of zeolites includes an amount of cations, which stabilize the electrical charge in the aluminum centered tetrahedral molecules. The number of cations is related directly with the number of these molecules. Most of the applications of zeolites are based on exchange processes to substitute their cations by others more appropriated for specific applications. Clinoptilolite is a natural zeolite very abundant in several states of Mexico. The typical cations in Mexican clinoptilolite are Ca, Fe, Ma, K and Na among others. In this thesis we studied two types of cation exchange processes performed on clinoptilolite from a mine in Sonora, Mexico. Particularly we report on the structural and chemical composition modifications experimented by clinoptilolite as a consequence of cation exchange processes. More over we compared the characterized properties of cation exchanged clinoptilolite with those of natural clinoptilolite.

The second part of this thesis consisted in perform Ag, Cu and Zn cation exchange process with the three clinoptilolite samples obtained in the first part : natural clinoptilolite and exchanged - clinoptilolita through two processes. The samples of clinoptilolite containing Ag, Cu and Zn ions were subjected to studies of DRX and EDS to determine their crystalline structure and chemical composition. Finally, it was carried out a wide study of the modified clinoptilolite antibacterial properties.

Resumen

Las Zeolitas son materiales cristalinos nanoporosos compuestos por átomos de Si, Al y O los cuales constituyen un armazón estructural de cavidades interconectadas a través de canales con dimensiones moleculares. La composición química de las zeolitas incluye una cantidad de cationes los cuales estabilizan la carga eléctrica en las moléculas de aluminio centradas en el tetraedro. El numero de cationes esta relacionado directamente con el número de esas moléculas. La mayoría de las aplicaciones de la zeolita están basadas en procesos de intercambio para sustituir sus cationes por otros mas apropiados para aplicaciones específicas. La Clinoptilolita es una Zeolita natural muy abundante en varios estados de México. Los típicos cationes en la Zeolita Clinoptilolita Mexicana son Ca, Fe, Mg, K y Na entre otros. En esta tesis estudiamos dos tipos de procesos de intercambio de cationes llevados a cabo en la Clinoptilolita de una mina del estado de Sonora, México. Particularmente reportamos las modificaciones de la composición estructural y química experimentada por la Clinoptilolita como consecuencia de los procesos de intercambio cationico. Comparamos determinadas propiedades de la Clinoptilolita con intercambio cationico con aquellas de la Clinoptilolita natural.

La segunda parte de la tesis consistió en llevar a cabo un proceso de intercambio iónico con Ag, Cu y Zn de las tres muestras de Clinoptilolita obtenidas en la primera parte: Clinoptilolita natural y Clinoptilolita activada mediante dos procesos. Las muestras obtenidas de Clinoptilolita con iones de Ag, Cu y Zn fueron sometidas a estudios de DRX y EDS para determinar su estructura cristalina y composición química. Finalmente, se realizó un estudio amplio de las propiedades antibacterianas de la Clinoptilolita modificada con los iones metálicos.

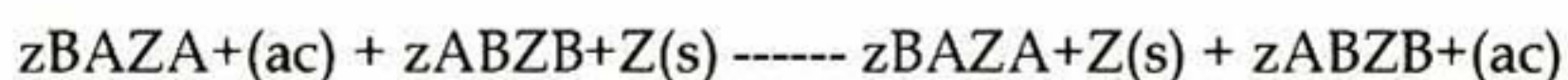
I. Introducción

Las zeolitas fueron descritas por primera vez como grupo de minerales por el mineralogista sueco barón Axel Cronsted en 1756, él observó que al calentarlas con un soplete siseaban y burbujeaban, y las denominó zeolitas por las palabras griegas "zeo", hervir, y "lithos", piedra (1).

Actualmente se sabe que las zeolitas son una familia de minerales Aluminosilicatos hidratados altamente cristalinos, que al deshidratarse desarrollan, en el cristal ideal, una estructura porosa con diámetros de poro mínimos de 3 a 10 ángstrom (2)

Las zeolitas están compuestas por aluminio, silicio, sodio, hidrógeno, y oxígeno. En el enrejado cristalino de una zeolita natural, el Al y el Si ocupan el centro de los tetraedros y los átomos de O los vértices. Como el átomo de Al es trivalente, se genera una carga negativa en exceso por cada átomo de este metal en la red, el cual es compensado con cationes que generalmente son Ca (II), Mg (II), Ba (II), Na (I) y K (I) (2).

Generalmente la difusión inter-cristalina determina la velocidad del proceso. Este proceso se realiza de equivalente a equivalente por lo que el contenido total de iones equivalentes intercambiables permanece constante:



donde z_A^{+} y z_B^{+} son las cargas de los cationes y Z la fase zeolita (2).

En el enrejado cristalino de una Zeolita natural, el Al y el Si ocupan el centro de los tetraedros y los átomos de O en los vértices como se muestra en la fig 1.1.

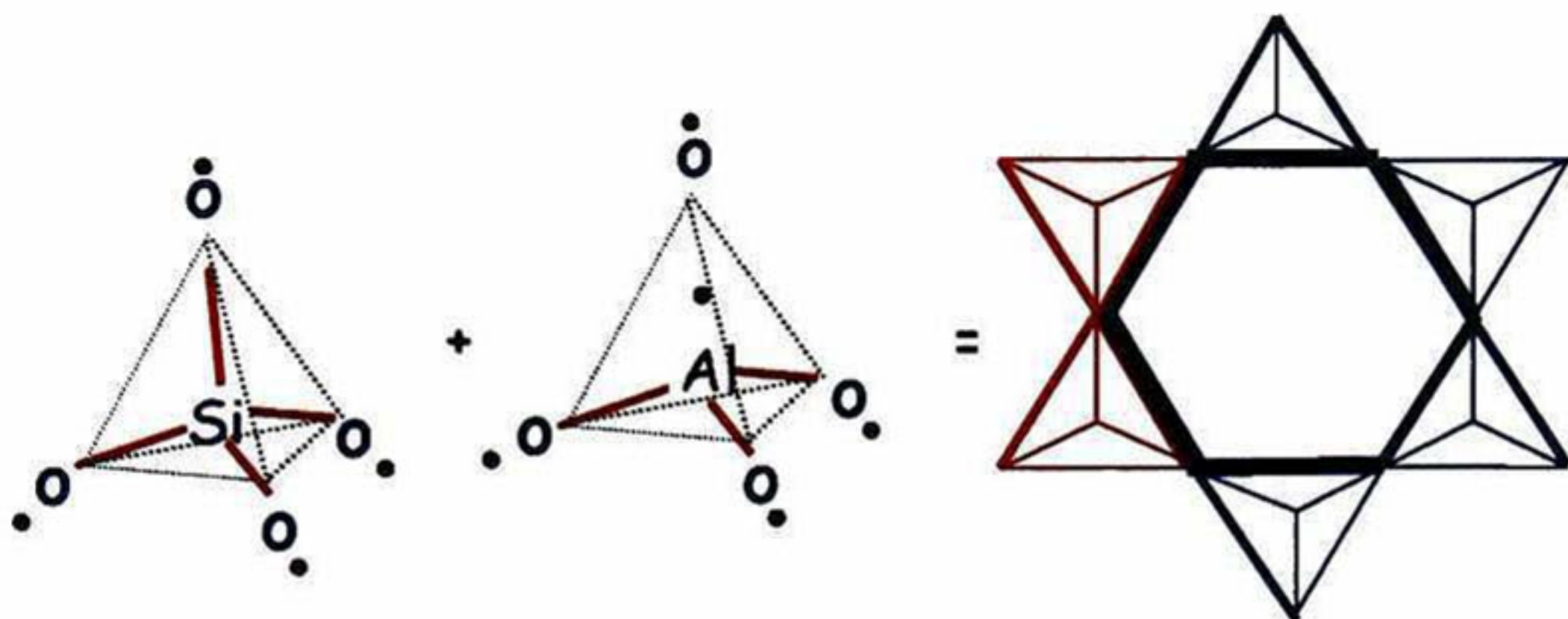


Fig. 1.1 Estructura cristalina de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ y de $[\text{AlO}_4]^{5-}$ en forma tetraédrica

Estos tetraedros son las unidades fundamentales de la estructura de la Zeolita como podemos visualizar en la fig. 1.2

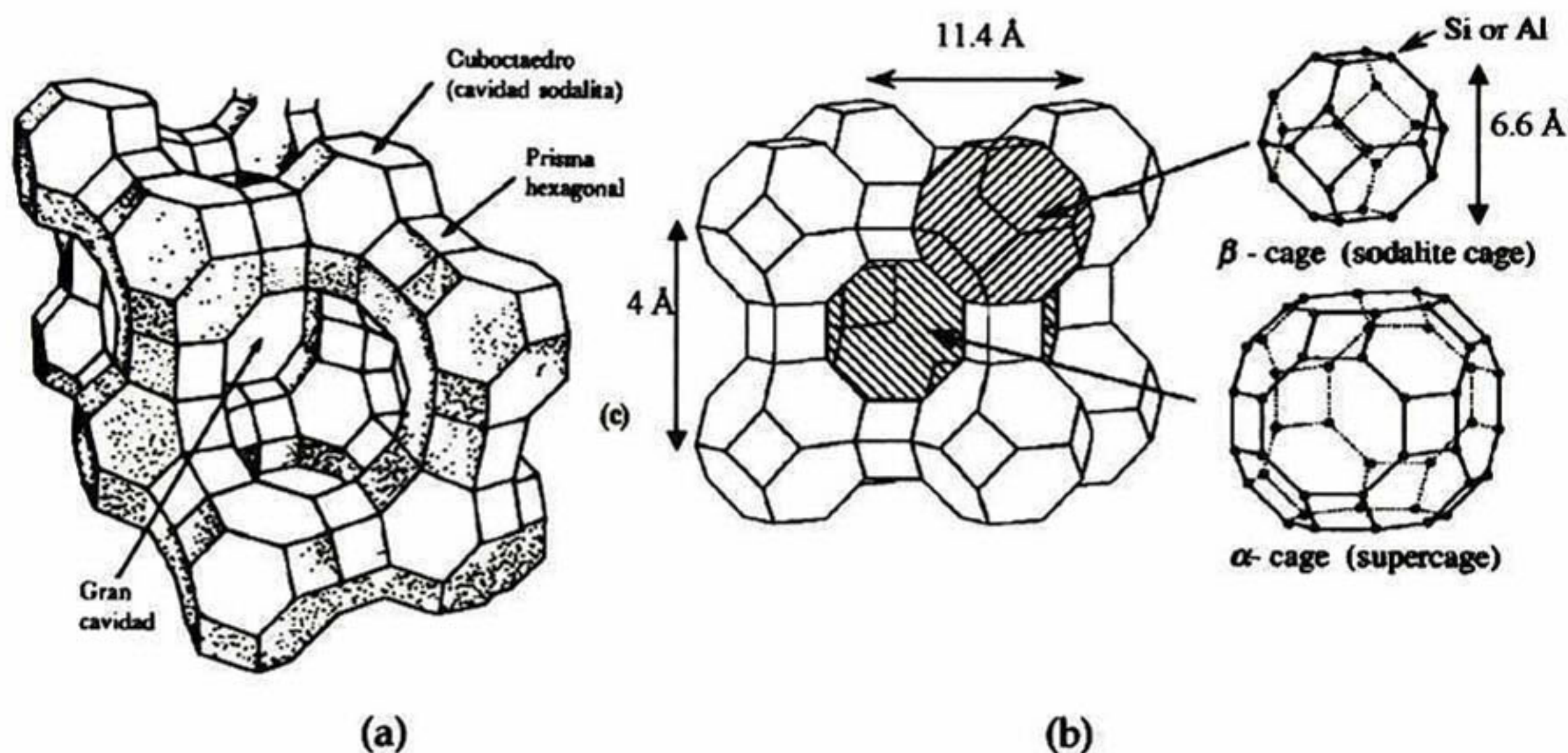


Fig. 1.2 Armazón estructural de Zeolitas sintéticas: a) zeolita F9/NaX y b) Zeolita A4 (3)

Estas estructuras cristalinas dan lugar a la formación de cavidades o jaulas interconectadas por canales de dimensiones nanométricas, el segundo componente son el agua y los cationes metálicos intercambiables, estos últimos son los que hacen a la zeolita un material extraordinariamente útil. (3)

La siguiente figura (Fig.1.3) (4) muestra los radios iónicos de algunos elementos en pm que nos servirán como referencia para la interpretación de algunos resultados de ésta tesis.

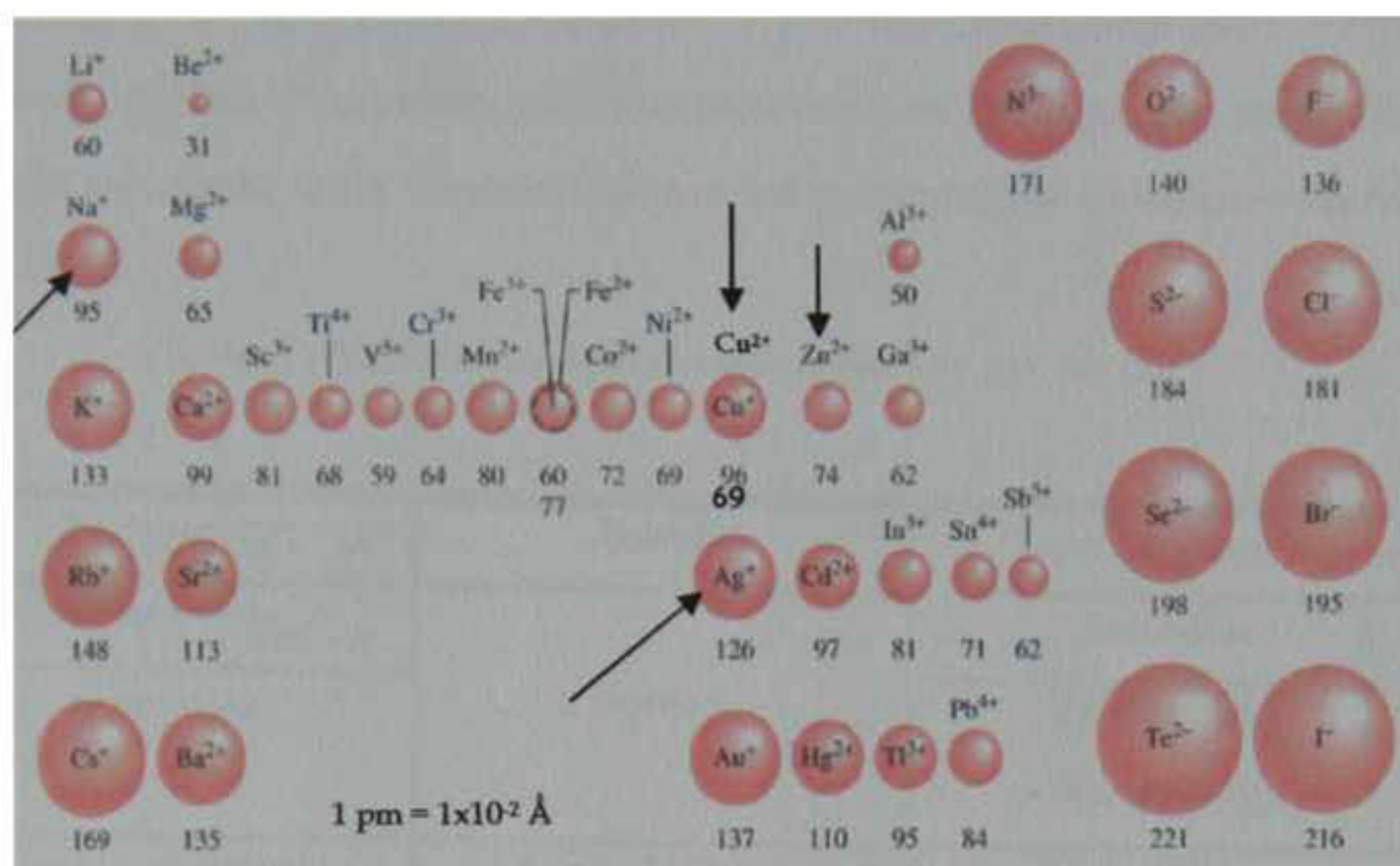


Fig. 1.3 Radios iónicos de algunos elementos químicos dados en pm (4).

El interés y uso se incrementa conforme pasa el tiempo, las zeolitas se descubrieron en 1756 y para 1970 solamente en Londres, se habían registrado 200 patentes y publicado 750 artículos en revistas especializadas. En el periodo comprendido entre 1985 y 1988, estas cifras se elevaron a 700 patentes registradas y 2000 artículos publicados, en ambos casos, el dato es por año (3). Esta propiedad ha permitido la aplicación de las zeolitas en muchas áreas como en mejorar la actividad de los detergentes, también están siendo empleadas actualmente en la separación de hidrocarburos a gran escala para mejorar las propiedades de construcción, en el área de la salud se aplica, entre otras formas, en recubrimientos antibacterianos de mobiliario de hospitales y en pastas dentales.

Existen alrededor de 800 tipos de Zeolitas las cuales son muy abundantes en varios estado de la republica mexicana y pueden clasificarse en 119 tipos de estructura de zeolita diferentes, solo una cuarta parte de ellas son naturales por lo que en la siguiente tabla mencionaremos los yacimientos existentes en México (5).

Tabla 1.1 Yacimientos de Zeolitas Naturales en México (6).

| Yacimiento | Estado | Tipo de Zeolita |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Agua Prieta | Sonora | Erionita |
| Guaymas | | Mordenita Clinoptilolita |
| San Luis Potosí | San Luis Potosí | Clinoptilolita |
| Tlalco | Guerrero | Clinoptilolita |
| Cruillas | Tamaulipas | Mordenita |
| Tepetitlan, Atzinco, Tehuacan | Puebla | Clinoptilolita |
| Tepozteco, Tetela de Ocampo | | Mordenita Clinoptilolita |
| La Olla | Guanajuato | Clinoptilolita |
| Etla, La Magdalena, Hierve el Agua | Oaxaca | Clinoptilolita Mordenita |
| Zacatecas | Zacatecas | Clinoptilolita - Heulandita |
| Viscaíno | Baja California Sur | Clinoptilolita |

En el presente trabajo se logró obtener la Zeolita natural Clinoptilolita con iones metálicos incorporados como Ag, Cu y Zn, con el objetivo principal de obtener materiales con propiedades antibacterianas. Seleccionamos la Zeolita natural Clinoptilolita por su bajo contenido de Aluminio (Si/Al ~6), propiedad que la hace atractiva por su resistencia a pH 's relativamente bajos, del orden de 4, ya que las soluciones fuentes del Ion Cobre, en las concentraciones necesarias en nuestro diseño de experimentos, tiene pH de ese orden [pH del Cu(NO₃)₂ al 0.05M es 4.198]. El primer reto que se debía enfrentar, era reducir el nutrido número de iones presentes en esta Zeolita (Na, K, Ca, Fe y Mg), principalmente el potasio, el cual es el Ion con mayor radio iónico (151 pm). En la búsqueda de buenos resultados, usamos varias soluciones entre otras: NaCl, NH₄Cl, logrando obtener excelentes resultados a concentraciones bajas (0.05M) de estas. Ver detalles en sección VI. El siguiente paso fue obtener en forma estable los iones de Ag, Cu y Zn, donde podemos sugerir que para obtener zeolita con dos o tres de estos iones la síntesis sea primero con Zn, después Cu y al final la Ag para evitar que se formen compuestos de plata los cuales son fotosensibles (3). Los resultados obtenidos son muy satisfactorios ya que se logró reducir el porcentaje en (peso) de los cationes que en forma natural tiene la zeolita, aumentando así los porcentajes de Ag, Cu y Zn, reportados en la literatura y logrando así importantes avances en una de las líneas de investigación de esta unidad.

Las bacterias que elegimos para nuestro estudio son *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y el motivo por el cual las elegimos es debido a que son las bacterias más representativas del grupo que contamina principalmente los alimentos.

La presente tesis consta de: Un resumen del trabajo de tesis, el capítulo I el cual es una breve introducción con el propósito de ubicar el tema. En el capítulo II, se hace una mención un poco más a detalle del intercambio iónico en la Zeolita, de la interacción de los iones Ag, Cu y Zn con algunas bacterias y su aplicación. En el capítulo III se muestra la hipótesis. En el capítulo IV se describen los objetivos. En el capítulo V se describe la preparación de las muestras obtenidas. En el capítulo VI se muestran los resultados obtenidos de la caracterización realizada y finalmente en el capítulo VII se exponen las conclusiones y perspectivas del presente trabajo.

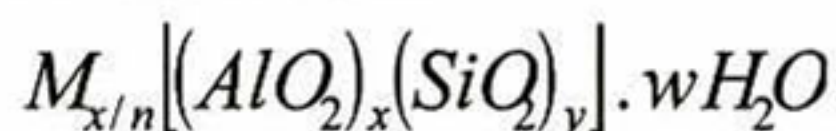
II. Antecedentes

Como ya se había mencionado la Zeolita es un material muy prometedor ya que se ha encontrado que tiene muchas aplicaciones y esto se debe a sus excelentes propiedades.

Según Breck (1974) (5) las zeolitas son caracterizadas por las siguientes propiedades:

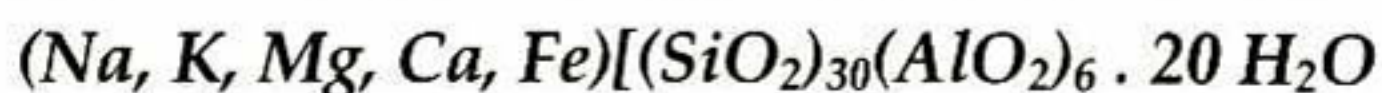
1. Alto grado de hidratación.
2. Baja densidad y un gran volumen de vacíos cuando es deshidratado.
3. La estabilidad de su estructura cristalina cuando se deshidrata.
4. Las propiedades de intercambio del catión.
5. Presenta canales moleculares uniformes clasificados en los cristales deshidratados.
6. Por su habilidad de absorber gases y vapores.
7. Por sus propiedades catalíticas.

Siendo la formula general de las Zeolitas:



Donde "M" son los cationes de valencia "n" los cuales neutralizan la carga negativa del esqueleto estructural, "w" es el numero de moléculas de agua presentes e la estructura, 'y' numero de moléculas tetraédricas de Dióxido de Silicio y 'x' numero de moléculas tetraédricas de Alumina (3).

La Zeolita Natural 'Clinoptilolita' tiene la siguiente formula (3):



Su armazón estructural se presenta en la figura 2.1 (3) y a su derecha se muestra su ventana α (3).

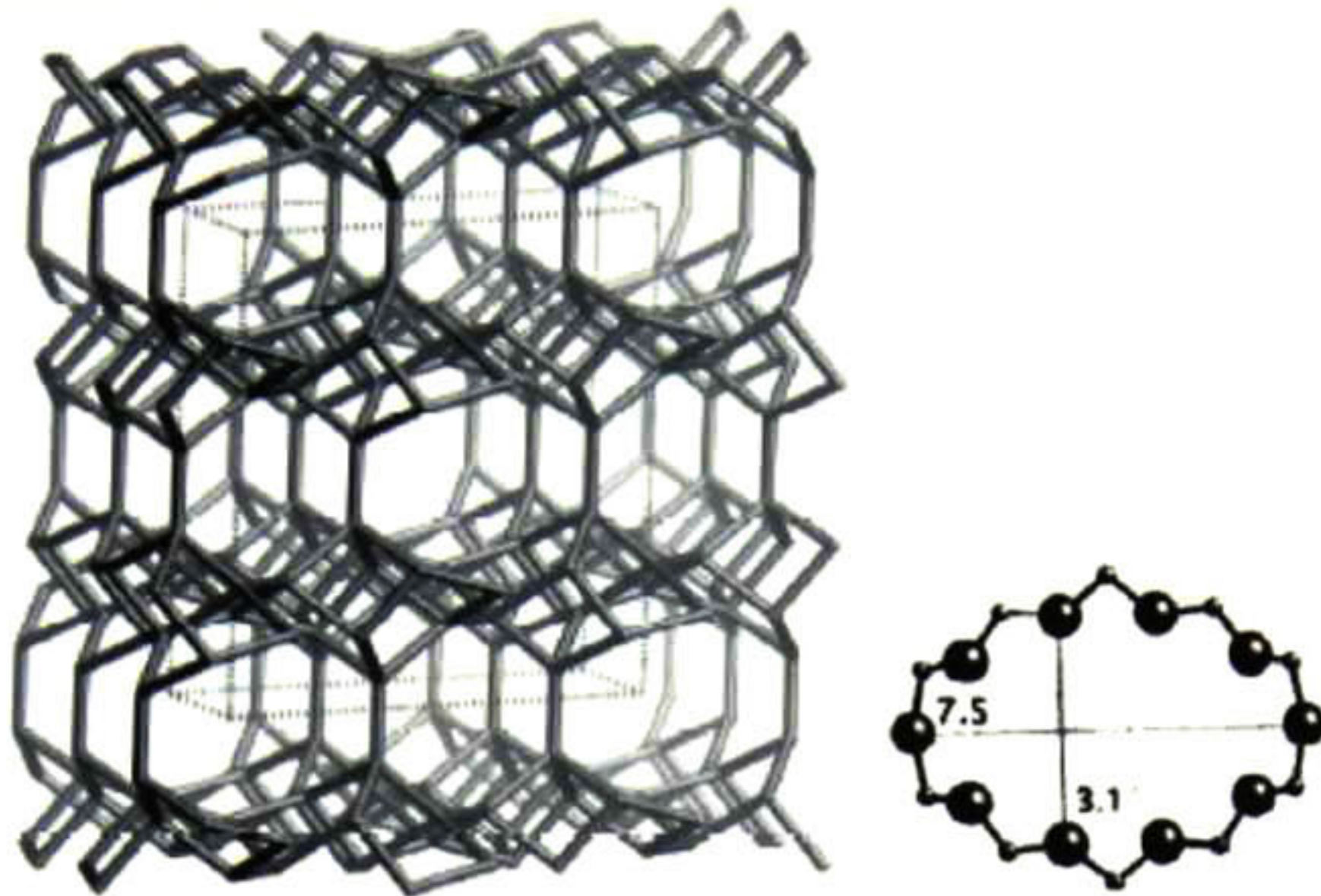


Fig. 2.1 Armazón estructural de zeolita natural (Clinoptilolita) y a su derecha las dimensiones de su ventana α en Å (3).

Para mayor detalle a continuación se muestra una fotografía de un mineral virgen de Zeolita natural Clinoptilolita (7) .



Fig. 2.2 Zeolita Clinoptilolita (7)

Las zeolitas naturales como intercambiadores catiónicos

La propiedad de Intercambio Iónico se ha observado en minerales silicatos cristalinos como arcillas y zeolitas (8). Se considera una *propiedad intrínseca* de estos minerales pues es producto de la sustitución isomórfica de los átomos de silicio de su estructura cristalina por otros átomos. En el caso de las zeolitas esa sustitución ocurre por átomos tetravalentes de aluminio lo que produce una carga neta negativa en la estructura que se compensa por cationes fuera de ellas. Estos cationes son intercambiables de ahí la *propiedad intrínseca* que también es una manifestación de su naturaleza de estructura cristalina micro porosa, pues las dimensiones de sus cavidades y de los cationes que se intercambian determinan el curso del proceso. En 1858 Eichhorne (8) fue el primero que evidenció la capacidad de las zeolitas de intercambiar sus constituyentes catiónicos.

El comportamiento de las zeolitas depende de varios factores que determinan una mayor *selectividad* en las zeolitas a determinados cationes (8):

1. Naturaleza de las especies catiónicas: tamaño, carga iónica, forma.
2. Temperatura
3. Concentración de los cationes en solución.
4. Aniones asociados con los cationes en solución.
5. El solvente (la mayor parte de los intercambios se lleva a cabo en solución acuosa, aunque también algo se hace con solventes orgánicos)
6. Estructura de la zeolita (características estructurales de la zeolita en particular)-topología de la red, densidad de carga de la red.

Todo hasta aquí es atribuible a zeolitas sintéticas y naturales. La gran mayoría de los autores coinciden en la superioridad de las zeolitas naturales atendiendo a:

- bajo costo de extracción y acondicionamiento para el intercambio,

-
- disponibilidad de grandes volúmenes,
 - excelente estabilidad a los procesos químicos y térmicos que permite su reactivación y utilización en varios ciclos.

ZEOLITA MODIFICADA CON EFECTO ANTIBACTERIANO

El tema de utilización de **zeolitas modificadas** con metales de actividad oligodinámica se ha fortalecido en los últimos años. Rodríguez-Fuentes et al. (9) han demostrado la utilidad de algunas formas intercambiadas de la Zeolita Natural Clinoptilolita para la formulación de fármacos, la forma Zn^{2+} ha posibilitado la formulación de antisépticos de espectro amplio pero también la formulación de sistemas de tratamiento de agua para consumo humano que eliminan la carga microbiana patógena.

Rivera Garza M. et. al. reportaron (10) que la *Escherichia coli* es el miembro más predominante del grupo de los coliformes fecales; debido a ello son microorganismos indicadores de la contaminación fecal en el agua y los alimentos. Además la *Escherichia coli* tiene un comportamiento semejante al de los microorganismos patógenos de origen intestinal (como *salmonella* o *vibrio cholerae*), esta característica hace que *E. coli* se incluya como microorganismo modelo del comportamiento de microorganismos patógenos. En los pasados 20 años, varias investigaciones se han realizado referentes al uso de zeolitas sintéticas y naturales: A, X, Y, Z y Clinoptilolita que tienen incorporados iones metálicos (Ag, Cu, Zn, Hg, Sn, Pb, Bi, Cd, Cr, Ti) la cual su función son bactericidas para la desinfección del agua. Ellos hicieron el estudio con dos microorganismos del grupo de los fecales, *E. coli* y *S. faecalis*. Para ello obtuvieron muestras de la zeolita mexicana con diferentes cantidades retenidas de Ag (intercambio iónico), las cuales no mencionan, solo indican que en una escala creciente A, 2A, 5A y 24A, esta última significa la máxima cantidad de plata

retenida en la Zeolita. Concluyeron que para la *E. coli* hay varias relaciones entre la masa de zeolita y el contenido de Ag para obtener un efecto total antibacteriano, por ejemplo después de 2 hrs de contacto entre el agua contaminada con el m.o y la zeolita con Ag, las relaciones masa - contenido de plata que pueden ser usadas son 2.5 mg - 5A, 5.0 mg - 2A y 10 mg - A, mientras que para la *S. faecalis* un efecto antibacteriano total de la zeolita con Ag fue observada solo con la máxima cantidad de Ag (24A). En este caso el efecto total no dependió de la masa del mineral sino del contacto al menos de 2 hrs entre el m.o. y este.

Staphylococcus aureus era el agente más común en infecciones adquiridas en los hospitales entre 1990 y 1996 en Estados Unidos. Bright et. al. (11) reportaron demostraron que las superficies inanimadas contribuyen a las infecciones adquiridas en hospitales por lo que utilizaron una zeolita con propiedades antimicrobianas. La zeolita se utilizó como recubrimiento en las superficies de acero inoxidable conteniendo un 2.5% (w/w) de iones plata y un 14% de iones Zinc teniendo como matriz al aluminosilicato. Es sabido que los iones de plata inhiben las enzimas bacterianas, interfiere con el transporte del electrón y los enlaces de DNA de estas. El Zinc las inhibe tomando los nutrientes e interfiere con la transferencia del protón. Bright et. al. (11) algunas comparaciones de los polvos que contenían plata, plata con cobre o zinc para determinar cual combinación era la que demostraba la mejor actividad contra la bacteria. *Staphylococcus aureus*. El efecto de la combinación de los iones plata/zinc fue el más eficaz.

Ülkü S. et. al. (12), estudiaron las propiedades de intercambio iónico a 25°C entre $Ag^+ - Na^+$, $Zn^{2+} - Na^+$ y $Cu^{2+} - Na^+$ de la Clinoptilolita de Gördes del Oeste de Anatolia en Turquía. La actividad antibacteriana de las muestras de Clinoptilolita con intercambio iónico fue determinada contra los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* para estimar el desarrollo y

crecimiento de los microorganismos. Obtuvieron como resultado que el Intercambio iónico logrado completamente fue para la Plata mientras que para el Zinc y el Cobre solo se logró un intercambio parcial. Ellos observaron que la Clinoptilolita como tal no tiene efecto antibacteriano mientras que la actividad antibacteriana con plata demostró su efectividad por encima del Zinc y el Cobre, con esto ellos llegaron a la conclusión de que la Clinoptilolita con Plata puede ser propuesta como un material antibacteriano a bajo costo.

Existe una diversidad de procedimientos para determinar la actividad antimicrobiana y eficacia de los productos antimicrobianos. Dentro de estos se encuentra el estándar Industrial Japonés (JIS Z 2801) (13) también llamado "guías para los productos antimicrobianos". Este estándar especifica la eficacia antimicrobiana, una parte del funcionamiento considerada ser importante para los productos antimicrobianos y los métodos de prueba (13).

Interacción de los iones Ag, Cu y Zn con las Bacterias

En el medio ambiente los microorganismos se encuentran prácticamente en todos los objetos que se encuentran en él; debido a esto es difícil considerar algún lugar libre de microorganismos. Así en el aire, agua, alimentos y suelo existen microorganismos que aprovechan los nutrientes a su alcance para desarrollarse o sobrevivir. (14, 16,17).

Debido a que en el presente trabajo estaremos utilizando el término **bactericida** a continuación se menciona su significado.

Bactericida o Fungicida: son productos que destruyen (matan) totalmente las bacterias u hongos.

Es importante señalar que la acción antimicrobiana está influenciada por diversos factores, entre ellos tenemos:

a) Tipo de microorganismo. Los agentes antimicrobianos poseen un espectro de acción determinado, así por ejemplo los estreptococos son sensibles a

numerosos antibióticos, en particular a la penicilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol; mientras que las micobacterias no son sensibles a algunos antibióticos como la rifampicina y estreptomina. En general el efecto antimicrobiano por grupo de microorganismos es: bacterias > hongos > virus.

b) Tipo de agente antimicrobiano. El agente puede ser físico o químico.

c) Medio ambiente. Ejemplo pH del medio, etc.

A continuación mencionaremos los agentes físicos y químicos como agentes antimicrobianos (14-17).

Agentes Físicos

1. Temperatura

La acción de la temperatura dependerá del medio ambiente, estado físico-químico de las células y del número de éstas (14, 16,17).

La mayoría de las formas vegetativas son destruidas rápidamente a una temperatura de 100°C cuando se encuentran en solución acuosa, mientras que en un medio deshidratado son mucho más resistentes. La gran mayoría de las formas vegetativas bacterianas son inactivadas cuando son sometidas a temperatura de 50-60°C por 30 minutos. Las formas esporuladas son extremadamente resistentes y requieren temperaturas superiores a los 100°C y un mayor tiempo de exposición. El número de células presentes en el medio a esterilizar también es importante.

2. Radiaciones

El efecto bactericida de las radiaciones es conocido desde hace tiempo (14, 16,17), así por ejemplo se sabe que la radiación solar, o más precisamente las radiaciones ultravioletas, son agentes naturales de esterilización.

A continuación se indican los diferentes tipos (14,16,17):

a) Radiaciones electromagnéticas: las primeras radiaciones conocidas por su actividad son las ultravioletas; éstas son las menos eficaces debido a su gran longitud de onda respecto de los rayos x y γ (se pueden utilizar para esterilizar

bolsas de polietileno o papel, además de otros usos); la región más activa de su espectro se encuentra entre los 2.600 y 2.700 Angstrom.

Los Rayos X y rayos Gama liberan una energía más importante y debido a ello penetran más profundamente. Por su poder de penetración más intenso estas radiaciones son más eficientes, pero sus instalaciones son costosas. Además, la irradiación tiene la desventaja que no puede localizarse en un solo objeto.

Otra desventaja es que las radiaciones ionizantes no sólo destruyen los microorganismos, sino también las sustancias que los rodean.

b) Radiaciones electrónicas: se logran por el efecto termoelectrónico que permite obtener una emisión continua de electrones, además de la aceleración de éstos, bajo el efecto de un campo eléctrico. Estos electrones lanzados a gran velocidad tienen un poder de esterilización idéntico a los rayos gama. Ellos se pueden dirigir a voluntad sobre el objeto a esterilizar, pero su efecto es más débil que el de los rayos gama y su principal defecto es la alteración de las sustancias orgánicas sometidas a su acción.

c) Sonidos: éstos no poseen una utilidad práctica en esterilización; sin embargo, es necesario señalar que los ultrasonidos poseen el poder de matar microorganismos en una suspensión líquida liberando su contenido endocelular; de la misma manera pueden alterar las sustancias químicas en solución. En microbiología se utilizan para extraer constituyentes endocelulares, enzimas, o para hacer preparados de pared celular bacteriana.

El ultrasonido también puede emplearse para limpiar grillas que se utilizan en el microscopio electrónico.

3. Eliminación mecánica

a) Filtración: se utiliza para esterilizar soluciones que posean sustancias termolábiles como por ejemplo proteínas que no soportan altas temperaturas. Consiste en filtrar las soluciones a través de filtros que sólo dejan pasar partículas ultra diminutas. Los filtros son de diversos tipos; los primeros que se utilizaron fueron los filtros Chamberland (de porcelana); hoy día éstos han sido

reemplazados por filtros Seitz, de vidrio fritado, Berkefeld o filtros de diatomeas y membranas de acetato de celulosa llamados también filtros moleculares de porosidad graduada (14-17).

b) Centrifugación: normalmente la centrifugación se realiza a una aceleración de 5.000g y permite separar partículas en suspensión en un medio líquido y tiene la desventaja que no se puede aplicar a grandes cantidades de líquido; además, no permite una eliminación total de los microorganismos (14, 16,17).

Agentes Químicos

No todos los agentes químicos sirven como desinfectantes o como antisépticos; algunos como los cianuros son venenos celulares de alta toxicidad; otros como los antibióticos y sulfamidas poseen una acción terapéutica (14, 16,17).

Su modo de acción está relacionado con (14, 16,17):

a) Oxidación y desnaturalización de las proteínas: los agentes oxidantes como el H_2O_2 y sus derivados halogenados, oxidan los grupos -SH (sulfhidrilos) libres de las enzimas y los alteran irreversiblemente.

Los metales pesados como el mercurio y sus derivados orgánicos e inorgánicos se combinan con estos grupos -SH inactivándolos.

Los alcoholes poseen una acción similar al calor coagulando las proteínas.

b) Alteración de la membrana citoplasmática: un gran número de agentes bactericidas actúan directamente sobre la membrana citoplasmática que juega un rol importante en la permeabilidad selectiva de los nutrientes. Debido a que esta membrana no es otra cosa que una barrera lipoproteica, los agentes liposolubles son los más activos; tales son los compuestos fenólicos, jabones y sobre todo los detergentes. Estos últimos gracias a sus grupos hidrosolubles y liposolubles se fijan sobre la membrana lipídica de la bacteria y sobre el medio acuoso circundante. Ellos modifican y desnaturalizan la estructura de la membrana suprimiendo así sus funciones vitales de permeabilidad.

c) Acción sobre el metabolismo: numerosas sustancias químicas son bactericidas o bacteriostáticas por inhibición enzimática, así tenemos que ciertos cianuros y los fluoruros son verdaderos venenos respiratorios inutilizables como antisépticos.

Los colorantes no presentan la toxicidad antes indicada, así por ejemplo los colorantes básicos (azul de metileno, violeta de genciana) reaccionan con los ácidos nucleicos de la bacteria, principalmente con los ribonucleicos que están presentes en abundancia en el citoplasma; estas combinaciones inactivan todas las funciones de la bacteria.

Otros agentes son los mutagénicos (acridinas y sus derivados) y los quelatéricos (14, 16,17).

1. Oxidantes

a) Agua oxigenada: ésta y todos los compuestos que dan origen a ella (perboratos y persulfatos alcalinos) son antisépticos eficaces.

b) Cloro y sus derivados: el cloro bajo su forma gaseosa o diversas combinaciones químicas, es un antiséptico muy utilizado; al respecto es necesario señalar que bajo su forma gaseosa es un producto peligroso y delicado de manejar. Sus compuestos líquidos como los hipocloritos y cloraminas son los más difundidos.

Todos los compuestos clorados siguen un mecanismo semejante de acción formando el ácido hipocloroso; en esta reacción el oxígeno es liberado dando así un intenso poder oxidante que destruye instantáneamente a la mayor parte de los microorganismos que entran en contacto con él. Las formas esporuladas son más resistentes y para su inactivación se necesitan dosis 100 veces más elevadas que las normales.

La acción de estos compuestos clorados está relacionada con el pH del medio.

c) Yodo: es uno de los primeros compuestos que se utilizó como desinfectante; siendo principalmente de acción bactericida y fungicida. Es poco

soluble en agua pero fácilmente soluble en alcohol o en soluciones acuosas de yoduro de potasio.

2. Alcoholes

El alcohol etílico en concentraciones de 50-70% es uno de los más utilizados; posee un efecto bactericida pero no ejerce una acción sobre las formas esporuladas. El alcohol metílico es menos activo pero más nocivo.

Los alcoholes superiores como los propílicos, butílicos y amílicos tienen un poder mayor pero su baja solubilidad al agua limita su uso.

3. Metales pesados y sus sales

Ciertos metales tienen un efecto bactericida, este poder ejercido a dosis ínfimas se llama oligodinámico y se puede explicar por una pobre ionización del metal y por la afinidad de estos iones con las proteínas celulares.

La plata bajo su forma metálica ha sido uno de los elementos más utilizados. Las sales de metales pesados son más eficaces y muy utilizadas; las más comunes son las sales de Ag, Hg, Cu y Zn. Todas inactivan la célula precipitando las enzimas o combinándose con sus grupos -SH (sulfhidrilos); esto explica a su vez la actividad y toxicidad que ejercen tanto sobre las células del hospedante como sobre las células bacterianas.

Por lo que se acaba de mencionar los iones Ag, Cu y Zn tienen la acción bactericida que estamos buscando, basándose en esto para su aplicación e introducción en la Zeolita.

Para el aislamiento, estudio y clasificación de los microorganismos, es necesario utilizar un medio de cultivo en el que dispongan de las sustancias orgánicas e inorgánicas necesarias indispensables para el normal desarrollo de su metabolismo. En estos medios, los microorganismos además de poder multiplicarse, pueden manifestar características de crecimiento y propiedades bioquímicas; aspectos de gran importancia para su clasificación. Estos preparados estériles que poseen los elementos necesarios para el desarrollo de un

microorganismo, se denominan medios de cultivos, los que según su estado físico, pueden ser líquidos o sólidos (14, 16,17).

1. Características que deben poseer los medios de cultivos (14, 16,17):

Contener sustancias nutritivas como: proteínas, azúcares, minerales y vitaminas.

Tener un pH adecuado.

Estar esterilizados.

- Estar protegidos de posibles contaminaciones.

2. Ventajas al utilizar los medios de cultivos:

Permiten el aislamiento de un microorganismo a partir de un sustrato natural (suelo, agua, plantas, aire, excrementos, pus, etc.).

- Permiten la identificación del microorganismo, según las características de crecimiento, morfología celular, propiedades tintoriales y reacciones bioquímicas.

- Conservación durante meses y años de las cepas identificadas (cepario).

Obtención de células de microorganismos patógenos o de sus toxinas para la elaboración de productos biológicos (vacunas, antitoxinas, etc.).

3. Clasificación de los Medios de Cultivos

La clasificación de los medios de cultivos generalmente se basa en tres de sus principales aspectos (14, 16,17):

A. Según su composición química

Medios sintéticos de composición definida. Se preparan en base a sustancias químicas definidas. Se utilizan para el estudio del metabolismo bacteriano o para el cultivo de los microorganismos autótrofos.

Medios naturales de composición indefinida. Son aquellos que se preparan en base a sustancias que se extraen de tejido animal, o vegetal y cuya composición no es conocida exactamente. A este grupo de medios pertenece la mayoría (agua peptonada, caldo común, leche, extracto de suelo, miel diluida, etc.).

B. Según su estado físico

En general los medios de cultivos desde el punto de vista físico pueden clasificarse en líquidos y sólidos.

La multiplicación bacteriana en los medios de cultivos líquidos se manifiesta generalmente por el enturbiamiento de éste, en tanto que en los medios de cultivos sólidos la multiplicación bacteriana se manifiesta por una formación macroscópica denominada colonia bacteriana, que es el resultado de la multiplicación de una sola célula bacteriana.

Los medios de cultivos sólidos se obtienen agregando un agente solidificante como el agar o gelatina, a un medio líquido.

C. Según su utilización

Medios de cultivos básicos. Se caracterizan por ser pobres en material nutritivo, de manera que su uso es muy restringido, constituyen la base para la preparación de otros medios. Como ejemplo pueden citarse el caldo peptonado y el agar-agar corriente.

III. Hipótesis

La característica estructural importante de las Zeolitas son las **cavidades o poros**, siendo estas de dimensiones nanométricas que pueden intercambiar cationes dentro de sus cavidades.

Las Zeolitas modificadas con iones de Ag, Cu y Zn tienen propiedades antibacterianas.

IV. Objetivo General

Desarrollar un procedimiento de incorporación de iones metálicos en Zeolita Natural Clinoptilolita y evaluar el efecto antibacteriano de Zeolitas modificadas.

Objetivos Específicos

- Determinar la composición química y estructural de la Zeolita natural Clinoptilolita.
- Intercambiar los cationes que tiene de manera natural la zeolita por otros mas apropiados para el posterior intercambio iónico.
- Obtener Cu, Ag y Zn en estado iónico y forma estable en la Zeolita Natural.
- Determinar las propiedades antibacterianas de la Zeolita modificada.

V. Procedimiento Experimental

V.1 Elaboración de Muestras

En este capítulo se describirá como se elaboraron las muestras desde los materiales como la zeolita natural utilizada, el medio de cultivo utilizado en los estudios microbiológicos y una breve introducción de ellos, los métodos que utilizamos para llegar de la zeolita natural a la zeolita modificada y las evaluaciones de actividad antimicrobiana.

V.1.1 Materiales

Zeolita

Para obtener la Zeolita modificada se utilizó la Zeolita natural Clinoptilolita con formula: $(Na, K, Mg, Ca, Fe)[(SiO_2)_{30}(AlO_2)_6 \cdot 20 H_2O$ del yacimiento existente en el Estado de Sonora, su armazón estructural se presentó en el Capítulo II.

Reactivos

Los reactivos que utilizamos para el intercambio iónico en la zeolita natural y obtener la zeolita modificada son sales de los iones Ag, Cu y Zn como $AgNO_3$, $Cu(NO_3)_2$ y $ZnCl_2$ respectivamente.

Medios de Cultivo

En este estudio empleamos el **Agar Soya Trypticaseina (AST) (15)**. Este agar se emplea para el cultivo de muchos tipos de bacterias, ya que el contenido de soya y caseína permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico.

Rehidratar 40 gr. del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 min. para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave que se presenta en la Fig. 5.1.1 a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 min. Enfriar aproximadamente a

45° C, en un baño maría (Fig. 5.1.2) y vaciarlos en cajas petri estériles (Fig.5.1.3). Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la UAEH.



Fig. 5.1.1 Autoclave para la esterilización (Lab. de Biotecnología).



Fig. 5.1.2 Agar Soya Trypticaseina en baño maría a 45°C



Fig 5.1.3 Vista del Lab. de Biotecnología de la UAEH en donde se muestra el proceso de vaciado del Agar en cajas petri

V.1.2 Metodología

En este subcapítulo se presentan cuatro etapas que se utilizaron para obtener una zeolita modificada partiendo de una Zeolita natural en polvo el cual tuvo un tamaño de partícula no homogéneo, además de que también se menciona el método utilizado para determinar las propiedades antibacterianas de la Zeolita modificada.

Etapas I. Tamizado

Este paso fue con el propósito de separar la Zeolita en polvo por tamaños de partícula. Para realizar un buen tamizado de la zeolita y que existiera una buena separación del tamaño de grano se hacen tamizados de 150 gr. durante 10 min., pasando por las mallas 150, 200 y 325 mesh. El polvo utilizado fue el que quedó entre las mallas 150 y 200 por lo que tienen un tamaño en el rango de 7.4 a 10 μm .

Etapas II. Hidratación

Esta etapa fue con el fin de tener una zeolita estable para evitar que su deshidratación interfiera con la activación de la misma. Para hidratar la zeolita se utilizó una relación de 20 ml H₂O/ 10 gr. Zeolita con agitación de 10 min.

Para obtener la zeolita modificada se siguió el método utilizado por Mario Flores Acosta M. y Ramírez Bon R. el cual consiste en: activación de la zeolita e intercambio del ion metálico (3).

Etapas III. Activación de la zeolita

Esta acción se realizó con el fin de liberar espacio dentro de la cavidad de la zeolita (3) al intercambiar parte de los iones Na por un H⁺. En esta etapa se realiza el intercambio iónico entre el Na⁺ de la unidad sodalita y el Ion NH₄, poniendo la zeolita a reflujo en una solución de NH₄NO₃ al 0.5M (100 gr. de Zeolita/ 460 ml de sol.) durante 5 horas con agitación mecánica (400 Rev./min.), posteriormente se separó el NH₄NO₃ de la zeolita por filtración y se lavó colocando la zeolita en un recipiente con 0.5 lt de agua desionizada y agitación

magnética durante 10 minutos. Finalmente se separó la zeolita del agua por filtrado en un embudo buchner colocado en un matraz kitazato al que se le hace un vacío primario. Con esto conseguimos el sistema: zeolita- NH_4^+ , el NH_4 se descompone en $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ (el NH_3 es un gas que se evapora) y finalmente nos queda: *zeolita- H^+* . Después de esta etapa se tiene una zeolita activada. En la figura 5.1.2.1 se muestra el equipo para la activación y en la figura 5.1.2.2 se muestra el dispositivo para el filtrado. Esta activación se realizó también con una solución de NaCl 0.5M como ya se había mencionado en el Capítulo II para obtener el sistema: *zeolita - Na^+* (3). Después de esto la muestra se secó a no más de 30°C para evitar algún cambio en la Zeolita (3).

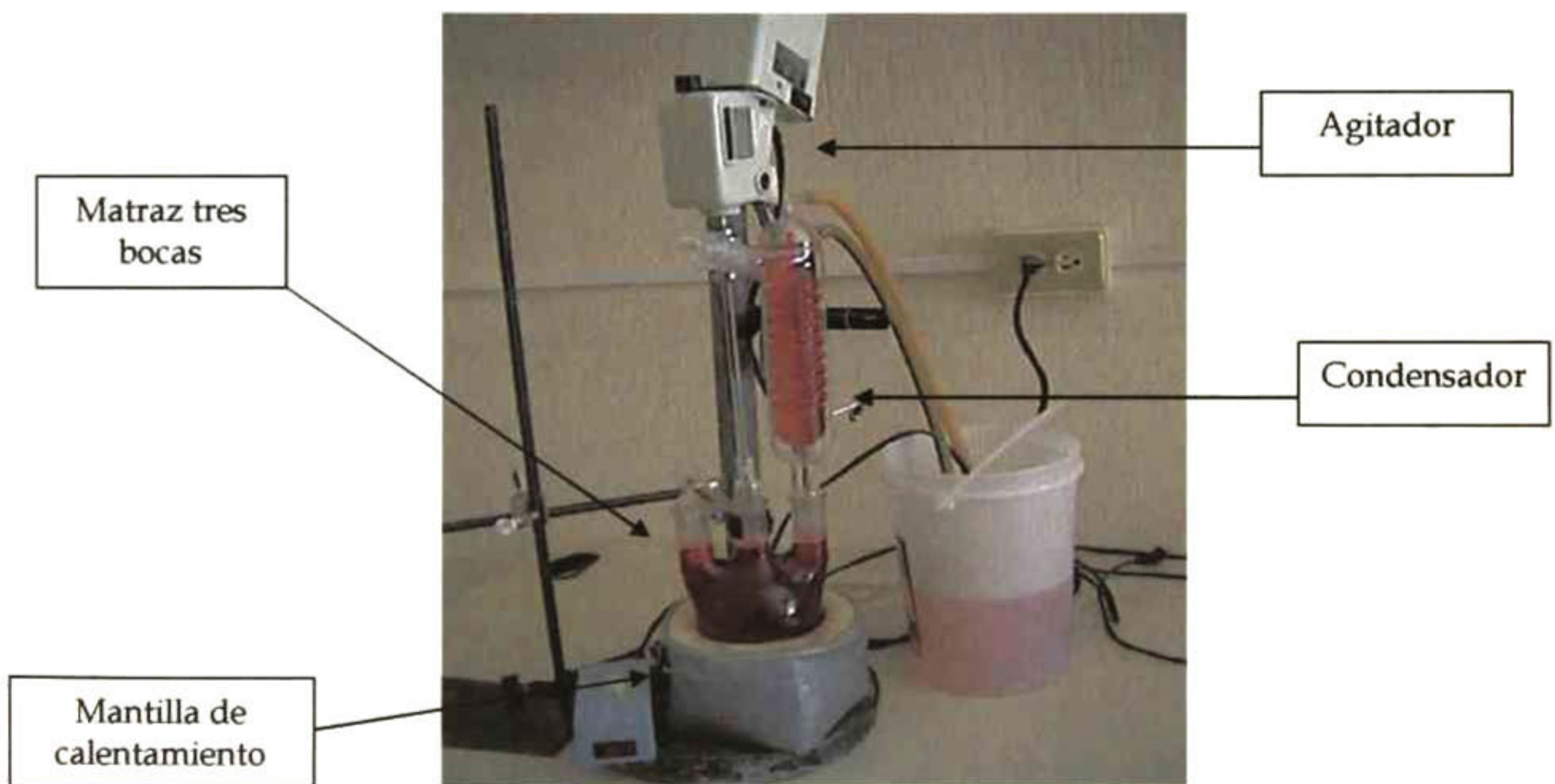


Fig. 5.1.2.1 Equipo para activar zeolita



Fig. 5.1.2.2 Equipo de recuperación de muestra por filtración

Etapa IV. Intercambio del Ion Metálico (Cación)

Una vez que tenemos el sistema *zeolita-H⁺* o *zeolita-Na⁺* se llevó a cabo el intercambio iónico entre el Na^+H^+ y el Ion metálico, esto se consigue aprovechando la propiedad intrínseca de las zeolitas de intercambiar cationes por otros de igual o diferente tamaño y carga. Para esto se puso la zeolita activada en la solución de una sal del Ion metálico a incorporar, siempre y cuando esta sal fuera soluble en agua, como Nitrato de Plata, Nitrato de Cobre, Sulfato de Zinc, etc. La zeolita en la solución se colocó en baño maría a $50^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, posteriormente se lavó exhaustivamente con agua desionizada para eliminar el Ion metálico localizado en forma residual fuera de las cavidades de la zeolita. En esta etapa obtuvimos el sistema: zeolita-cación, donde el catión se encuentra formando enlaces con el oxígeno de una molécula de AlO_2 de la estructura de la zeolita y con el oxígeno del agua en la zeolita (3).

Determinación de Propiedades Antibacterianas

Se trabajó con las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Se evaluó el efecto de zeolita natural y zeolita modificada con los siguientes iones Ag, Cu y Zn. Cada una de las muestras de zeolita se colocó de manera independiente en tubos de ensaye conteniendo una solución de NaCl al 0.85% (5 ml). Cada muestra de zeolita se agregó en una concentración de 2% en peso (Fig. 5.1.2.3). Esta mezcla fue inoculada con 0.5 ml de la bacteria de prueba con una concentración de 1×10^4 bacterias/ml (Fig. 5.1.2.4). La suspensión se dejó a temperatura ambiente por 7 hrs. agitando cada 30 min. Periódicamente se tomaron alícuotas de 1 ml y se realizaron diluciones decimales empleando tubos con 9 ml de solución de NaCl al 0.85%. Un ml de cada dilución fue colocado en una caja de petri estéril, y a estas cajas se les agregó Agar soya Trypticaseina fundido y a una temperatura de 44°C (Fig. 5.1.2.5). Se dejó solidificar el medio de cultivo y posteriormente las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs. (Fig. 5.1.2.6).

Una vez crecidas las bacterias en las cajas petri (Fig. 5.1.2.7) se hizo el conteo de ellas con ayuda de un cuenta colonias (Fig. 5.1.2.8) (14-15).

El Método para la preparación del Agar Soya Trypticaseina se mencionó en el capítulo anterior. Cuando se va a realizar el cultivo se agrega al agar 750 µl del antibiótico **rifampicina** por cada 500 ml de Agar esto con el fin de evitar contaminación de otro tipo de m.o., haciendo que solo crezca la bacteria de interés (solo la inoculada) y además se pueda hacer un conteo de colonias con mas precisión (14-15).



Fig. 5.1.2.3 En esta imagen los tubos de ensaye contienen la sol. NaCl al 0.85% con una conc. 2% de zeolita e inoculada con la bacteria



Fig. 5.1.2.4 Imagen en la cual se esta inoculando la bacteria de prueba



Fig. 5.1.2.5 Diluciones colocadas en cajas petri estériles, a las que se les agregó Agar soya Trypticaseina fundido y a una temperatura de 44°C



Fig. 5.1.2.6 Incubadora con las cajas petri que contienen el cultivo de Zeolita.

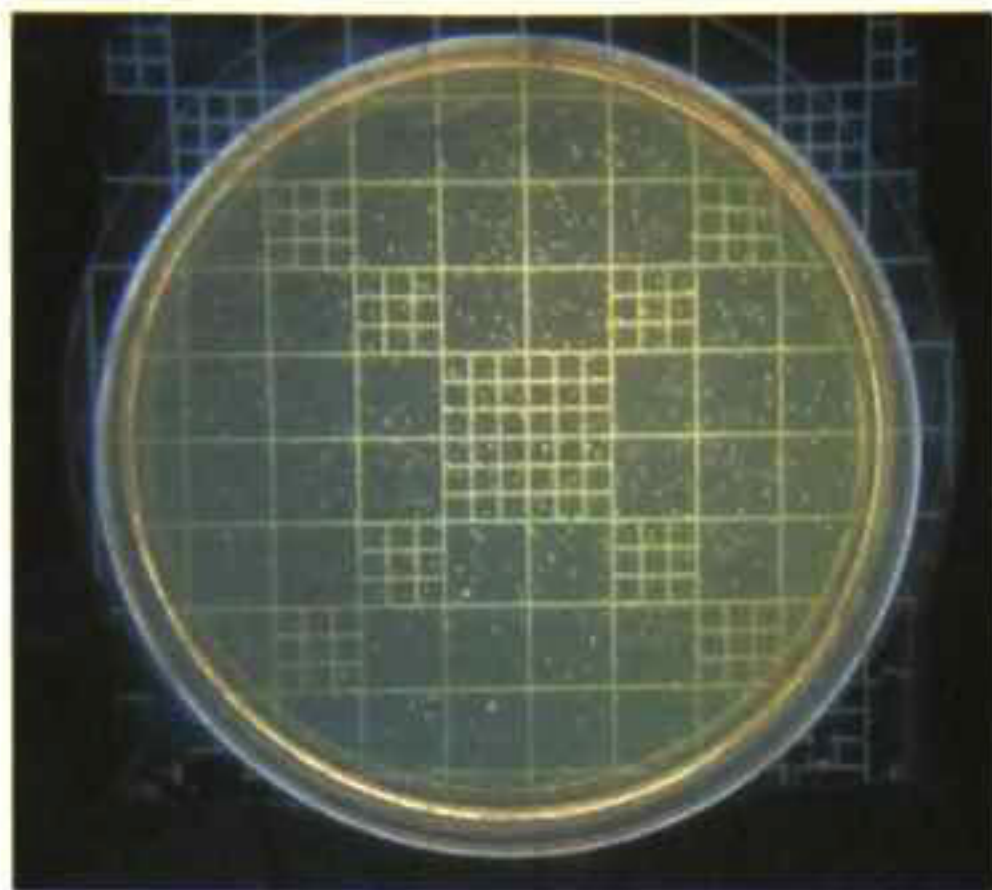


Fig. 5.1.27 Ejemplo del crecimiento de las bacterias de prueba en los medios de cultivo.



Fig. 5.1.28 Imagen en la que se observa el cuenta colonias utilizado.

En el siguiente esquema se muestra el diagrama de bloques de la metodología experimental en el que se muestran los pasos generales que siguieron las muestras en estudio y las técnicas de caracterización que se emplearon para determinar sus propiedades estructurales, químicas y bactericidas.

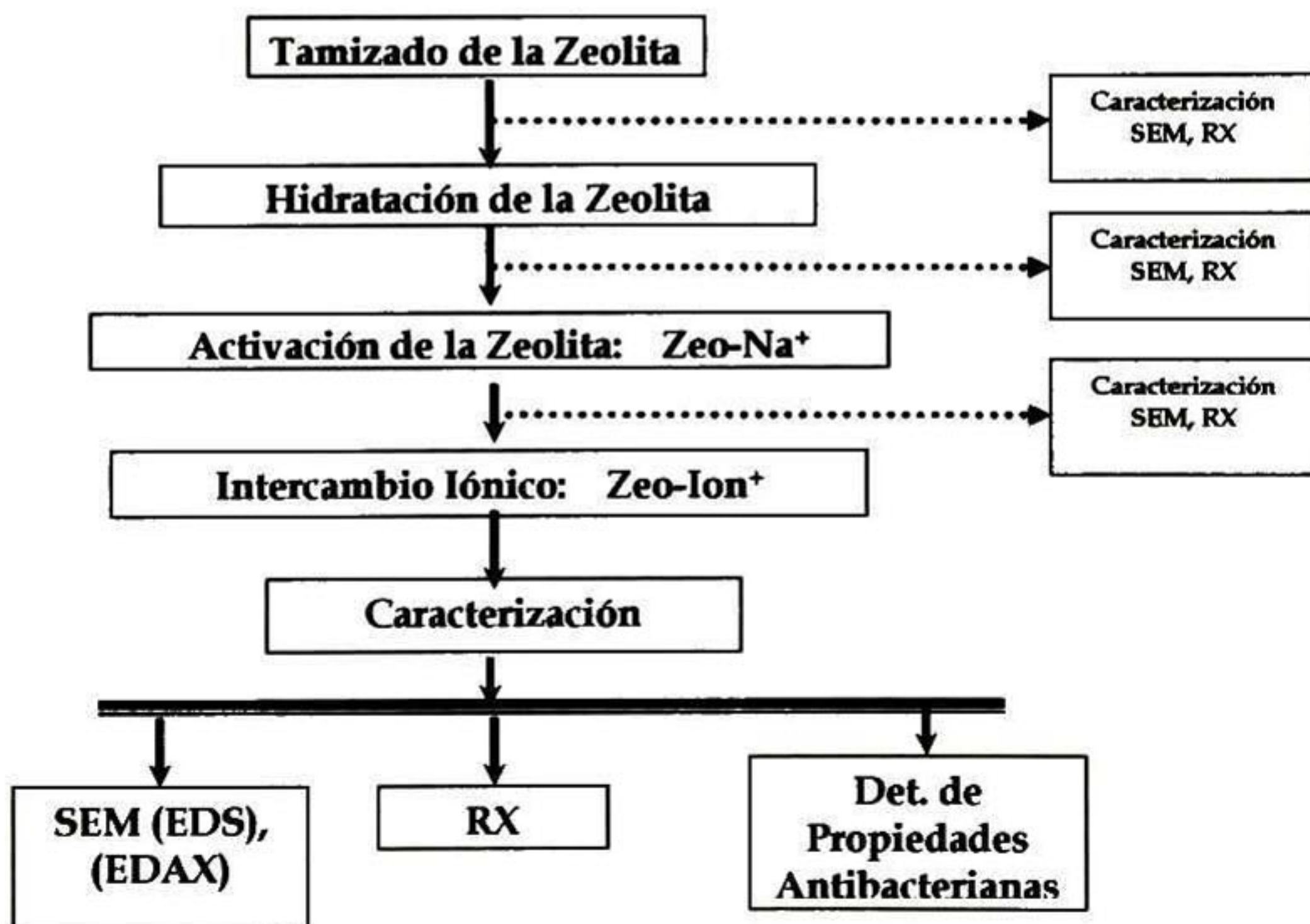


Fig. 5.1.29 Esquema metodología experimental de las muestras de zeolita.

V.1.3 Técnicas de Caracterización

V.1.3.1 Difracción de Rayos X

La estructura cristalina de las muestras fueron estudiadas usando un Difractómetro de Rayos X de la Marca Rigaku modelo D-MAX-2100. Esta técnica nos proporciona cualitativamente el grado de cristalinidad de la Zeolita modificada con respecto a la zeolita natural (Clinoptilolita). Las muestras de Zeolita modificada utilizadas para esta caracterización fueron simplemente los polvos.

V.1.3.2 SEM Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los cristales de Zeolita y los porcentajes en peso de sus iones fueron caracterizados en un Microscopio Electrónico de Barrido (Marca Philips ESEM Modelo XL30) con Microsonda de Análisis Químico elemental de Rayos X (EDS). Esta técnica nos dio información sobre la composición química, es decir del porcentaje en peso del Ion metálico en la Zeolita modificada. Para determinación del porcentaje en peso de los iones se utilizaron las muestras de zeolita en forma de pastillas es decir compactamos cierta cantidad de polvo aplicando 2 Ton de presión sobre una área de 78.53 mm².

En cuanto a las imágenes, es decir para poder observar la morfología de las partículas se hizo un depósito de oro sobre algunas de las muestras en polvo de las Zeolitas.

V.1.3.3 Determinación de Propiedades Antibacterianas con una Técnica de Siembra de m.o. (microorganismos)

Con esta técnica ya descrita en el subcapítulo V.1.2 se realizaron los estudios microbiológicos a la Zeolita modificada y natural.

VI. Resultados Experimentales y Discusiones

El primer paso para obtener la zeolita modificada es la activación de la Zeolita. Este paso consiste en propiciar el intercambio iónico dentro de las cavidades de la Zeolita natural Clinoptilolita entre los iones que posee por naturaleza, por otros de igual o diferente tamaño y carga, para posteriormente continuar con el intercambio iónico de Ag, Cu y Zn con los iones de la zeolita. Después de estos pasos es necesaria la caracterización de las muestras obtenidas para verificar si se ha alcanzado el objetivo que se busca. Esta tarea se inicia eligiendo las técnicas de menor costo en tiempo y uso de equipo. Una prueba muy útil, es la difracción de rayos X, para caracterizar la red cristalina de la zeolita natural y de la zeolita modificada monitoreando sus posibles cambios estructurales. Otra de estas caracterizaciones es la Microscopia Electrónica de Barrido en la cual hicimos un análisis químico cuantitativo y cualitativo de los elementos contenidos en la zeolita antes y después de modificarla, además de la observación de su morfología a nivel microscópico.

VI.1 Caracterización de la Zeolita natural Clinoptilolita

Para obtener las muestras de Zeolita modificada se usó la Zeolita natural Clinoptilolita con fórmula $(\text{Na}, \text{K}, \text{Mg}, \text{Ca}, \text{Fe})[(\text{SiO}_2)_{30}(\text{AlO}_2)_6] \cdot 20\text{H}_2\text{O}$ proveniente de un yacimiento que se encuentra en el estado de Sonora y que tiene un bajo costo. Las muestras en estudio provinieron de la zeolita con tamaño de malla 150 mesh.

En la figura 6.1.1 se muestra la ficha PDF 791461 del espectro de difracción de rayos X en donde el eje horizontal es la variación en 2θ en grados y el eje vertical la intensidad en unidades arbitrarias. En él se indican los picos de difracción principales en fase monoclinica identificados con los planos cristalinos (1,3,1), (0,2,0), (0,6,0), (-2,2,2), localizados a 19.04, 9.8, 29.96 y 26.04 respectivamente correspondientes a la Zeolita natural Clinoptilolita, alojando en sus cavidades K^{1+} , Na^{1+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} .

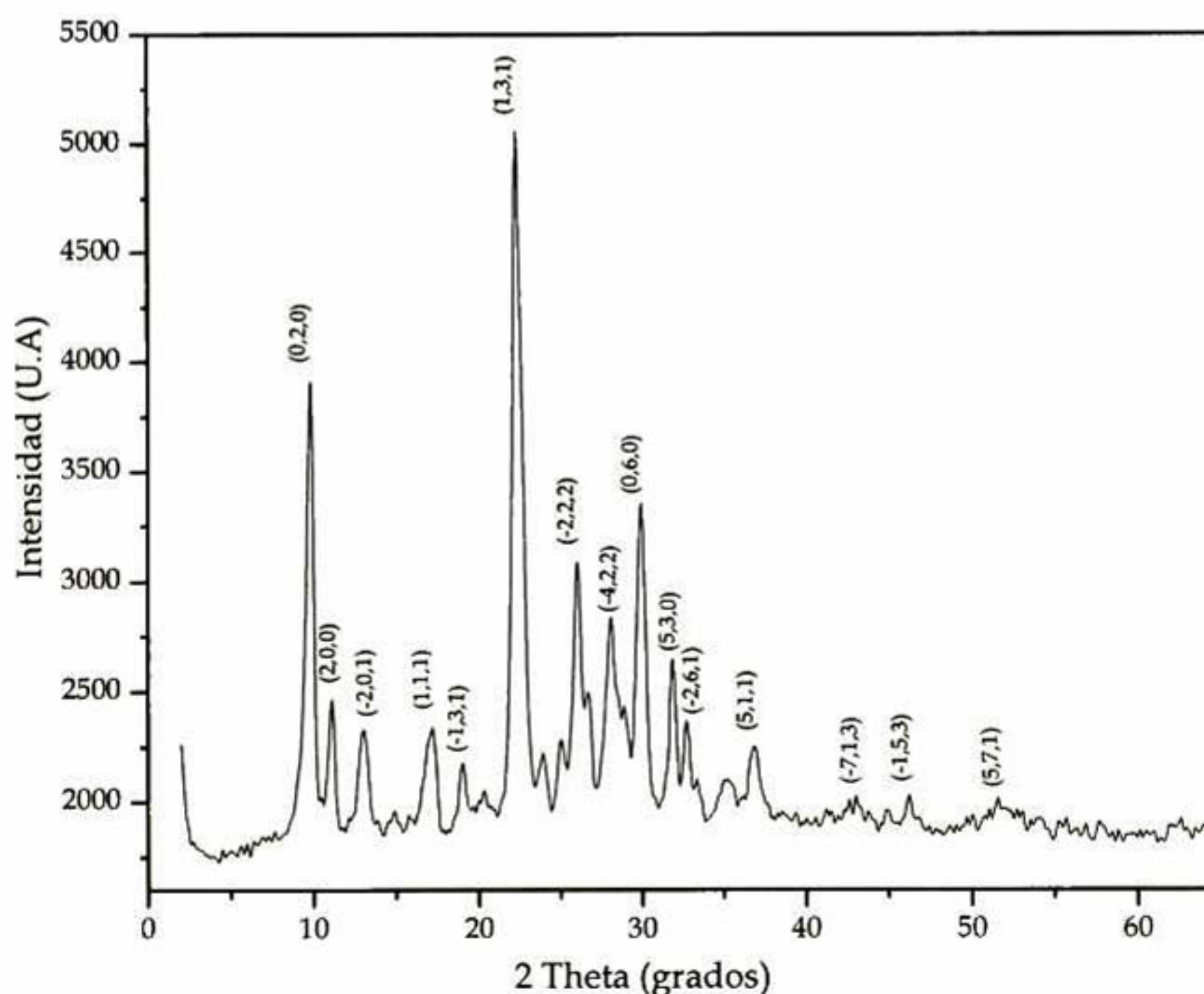


Fig. 6.1.1 Difractograma de rayos X correspondiente a la Zeolita Clinoptilolita (Ficha PDF 791461)

A continuación (Fig. 6.1.2) se muestran dos de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de Barrido, en las cuales podemos observar cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita con tamaño de partícula de entre 1 y 5 μm y una forma estructural laminar de las cuales algunas de ellas están fracturadas, lo cual esto es típico de la morfología de la zeolita.

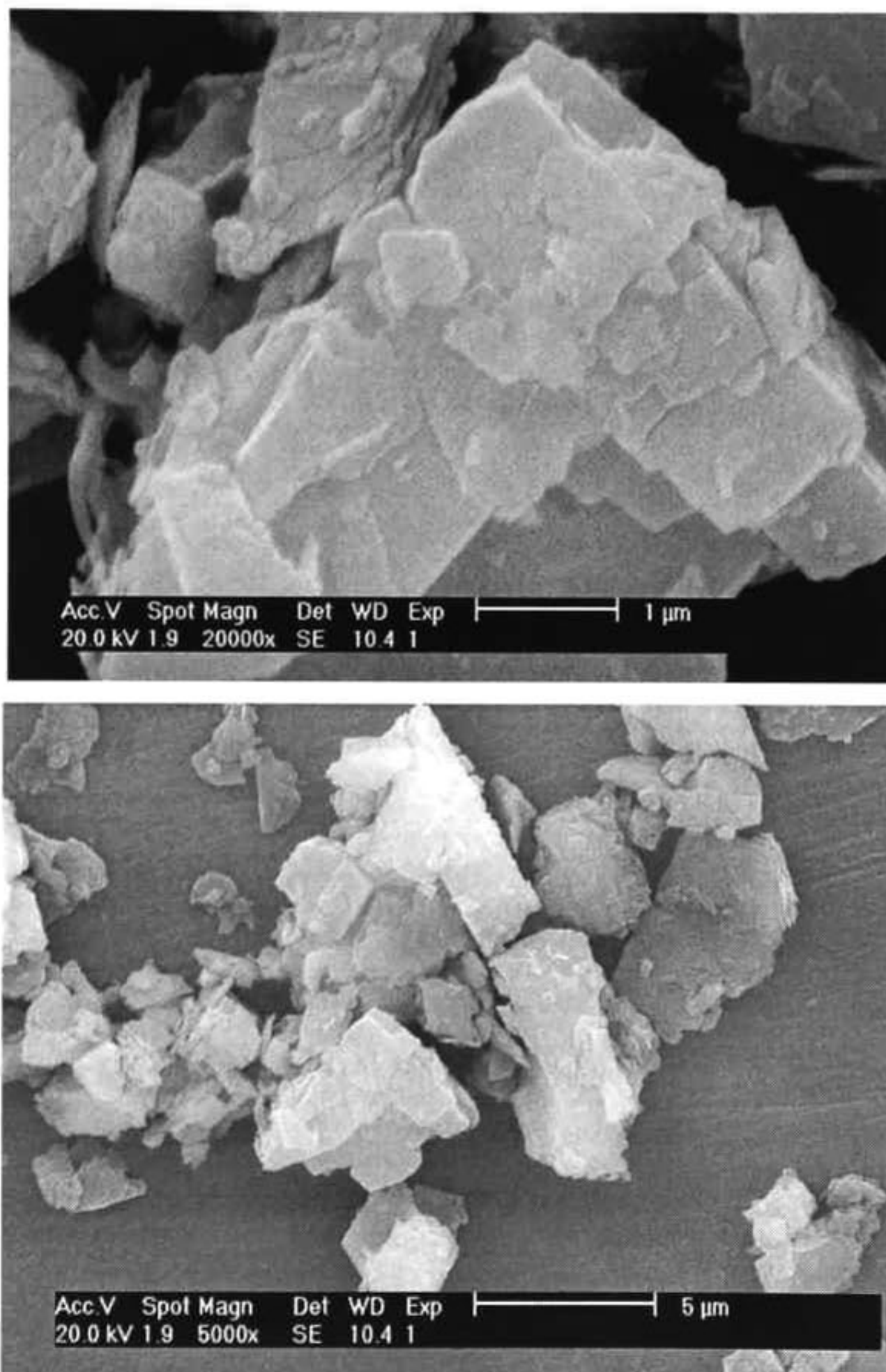


Fig. 6.1.2 Imágenes de Microscopio electrónico de barrido de cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita

El siguiente espectro de EDS (Fig. 6.1.3) muestra los porcentajes en peso de los cationes de la Zeolita natural Clinoptilolita.

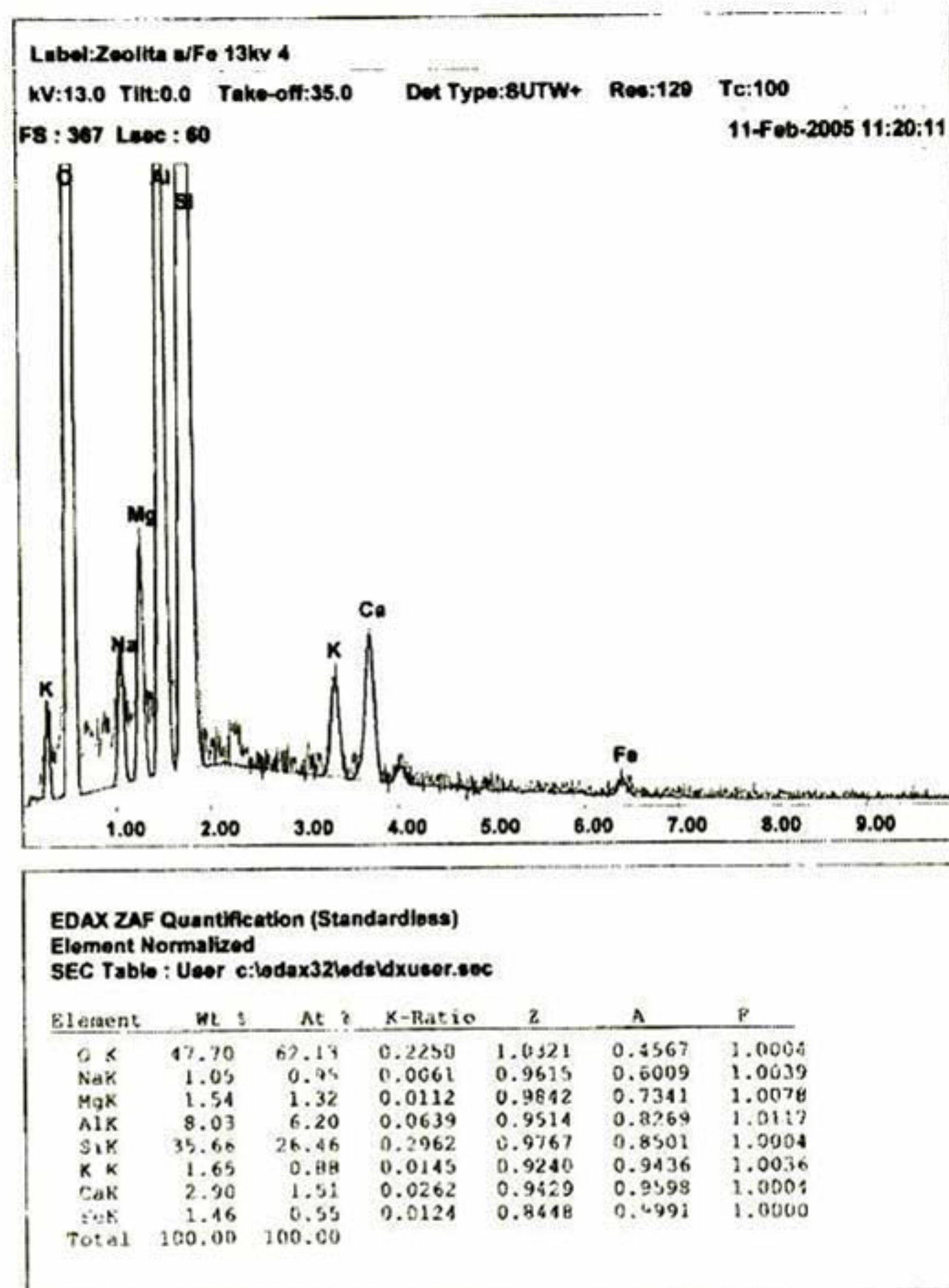


Fig. 6.1.3 Espectro EDS de la Zeolita natural Clinoptilolita.

En la siguiente tabla (Tabla 6.1.1) se pueden apreciar los porcentajes en peso de los iones de la muestra de zeolita natural que provienen de los espectros EDS (Fig. 6.1.3). Estos se determinaron en tres diferentes puntos de las pastillas para calcular un promedio de ellos y comparar estos porcentajes con las muestras de zeolita activada y modificada.

Tabla 6.1.1 Composición química de Zeolita natural Clinoptilolita.

| <i>Ion</i> | <i>%Wt</i> |
|------------|------------|
| Ca | 3.01667 |
| K | 1.71333 |
| Fe | 1.68667 |
| Mg | 1.51333 |
| Na | 1.02333 |
| O | 47.55333 |
| Al | 8.12667 |
| Si | 35.36333 |

El siguiente gráfico (Fig. 6.1.4) muestra los promedios de los porcentajes en peso de los iones de la zeolita natural en base a la tabla anterior, en el cual podemos observar que el que se encuentra en mayor porcentaje en peso es el Calcio con aproximadamente un 3% y por el lado contrario el de menor porcentaje en peso es el Sodio con 1%, mientras que el K y Fe con 1.75% y Mg con 1.5% lo cual nos indica que la zeolita por naturaleza tiene un 9% en peso de iones naturales que nos indica que aun cuando se someta a un proceso de intercambio iónico no podemos superar esta cantidad en la cual la naturaleza logró en quizás millones de años.

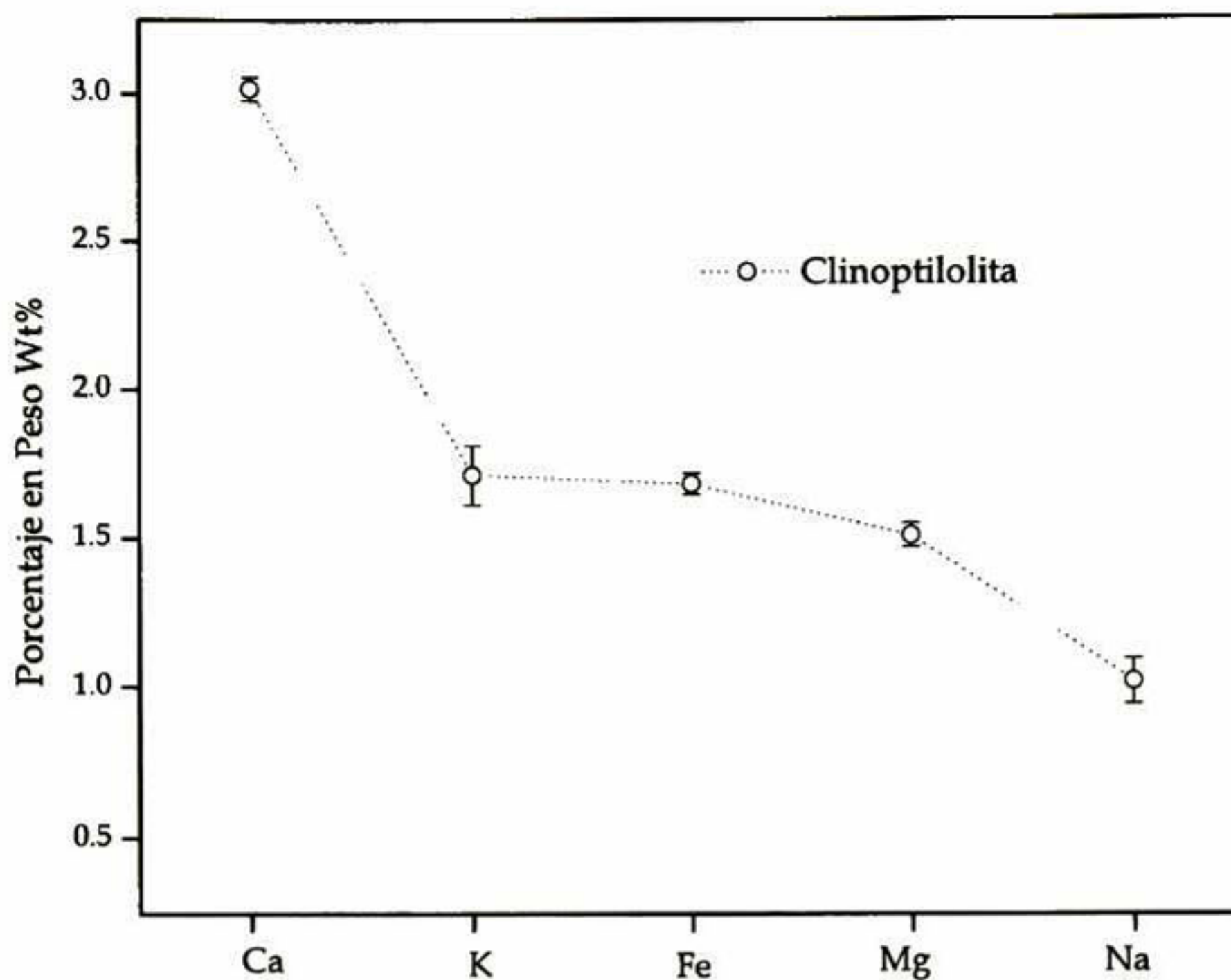


Fig. 6.1.4 Gráfico de promedios de porcentajes en peso de la zeolita natural clinoptilolita

VI.2 Activación de la Zeolita natural Clinoptilolita

Se hizo la caracterización de tres tipos de muestra:

- A. Zeolita sin activar (Zeolita natural)
- B. Zeolita activada con NaCl
- C. Zeolita activada con NH_4Cl

Caracterización Muestra A

La caracterización de ésta se mostró en el subcapítulo anterior. Obtenidas las muestras en polvo las caracterizamos en RX para obtener los difractogramas y observar su grado de cristalinidad con el proceso de activación, así como las imágenes en SEM de las muestras.

Caracterización Muestra B

A continuación se muestra (Fig. 6.2.1) el difractograma, en el cual se indican los principales picos de difracción de esta.

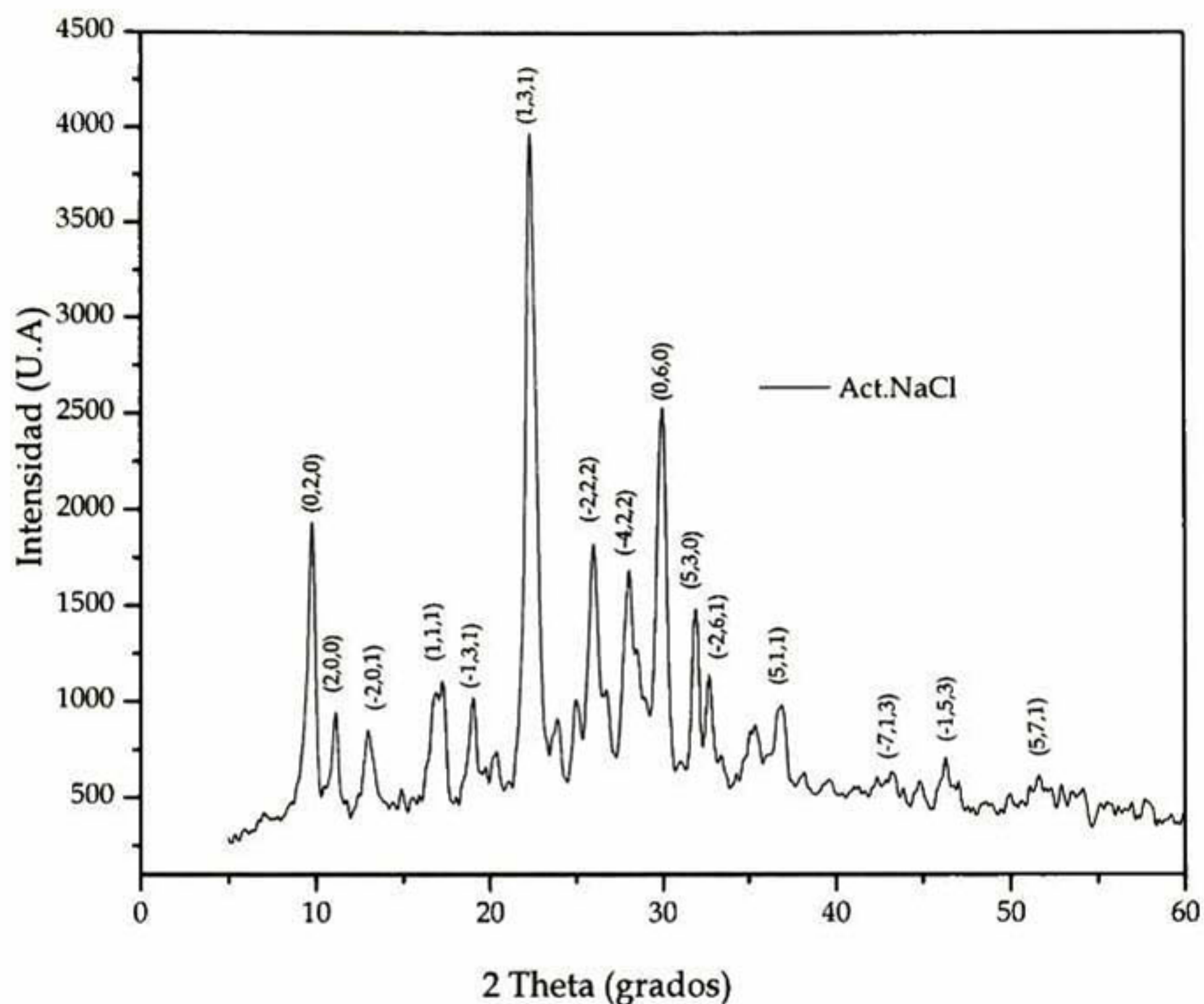


Fig. 6.2.1 Difractograma de rayos X correspondiente a la Zeolita activada con NaCl

Por lo que se observa en la figura anterior (Fig. (6.2.1)), la cristalinidad de la zeolita no se ha destruido como consecuencia del proceso de activación y no aparecen picos de difracción correspondientes al NaCl, ni a otro material que pudiera haberse formado como consecuencia del proceso.

La fig. 6.2.2 muestra la imagen obtenida en el microscopio electrónico de Barrido, en la que podemos observar cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita activada con NaCl sin variación en el tamaño de partícula entre 1 y 5 μm y una forma estructural laminar en la que podemos apreciar rugosidad como consecuencia del tratamiento alcalino producido por la activación.

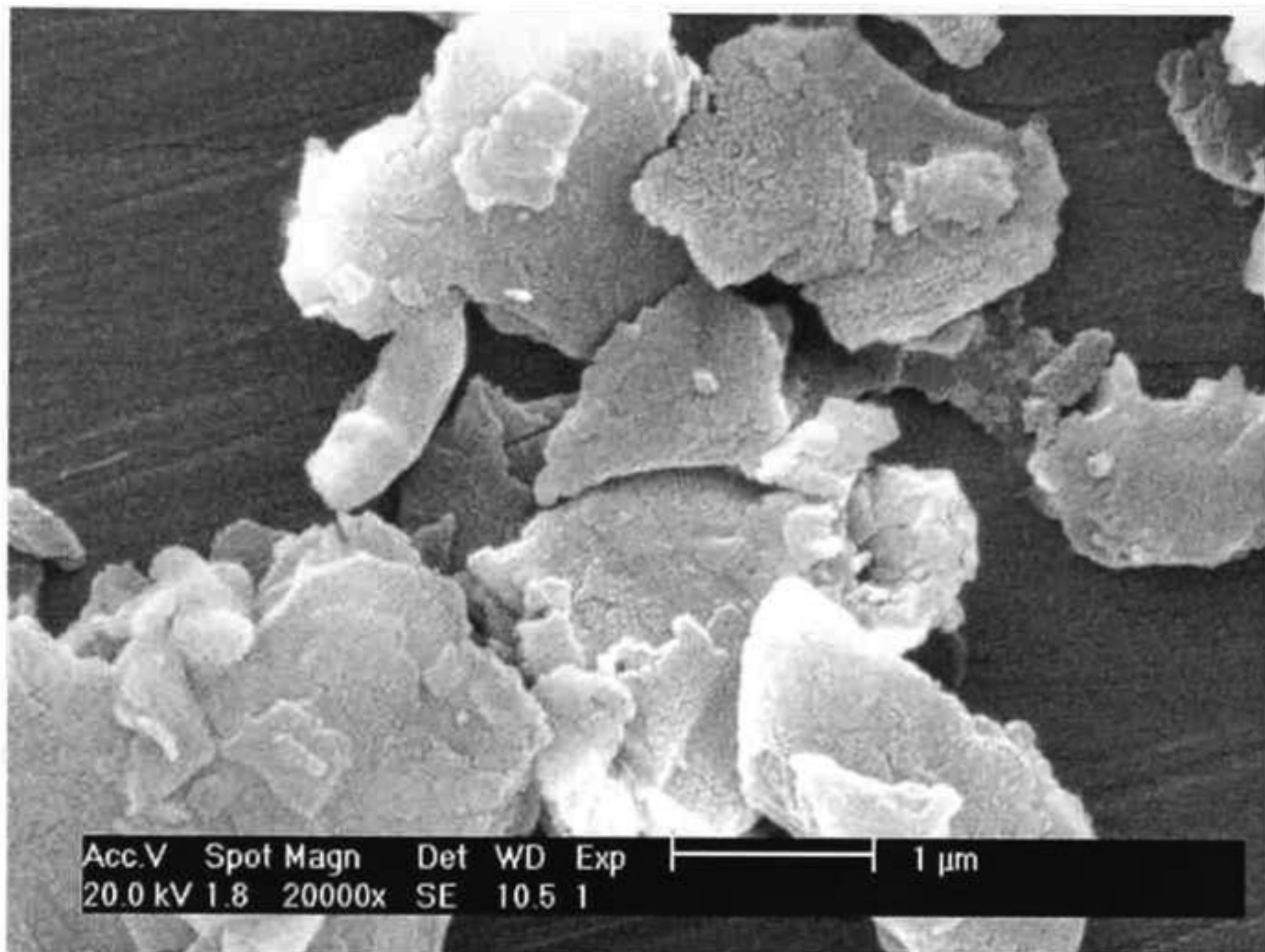


Fig. 6.2.2 Imagen de microscopio electrónico de barrido de los cristales de la zeolita Clinoptilolita activada con NaCl.

Caracterización Muestra C

La siguiente figura (Fig 6.2.3.) muestra el difractograma correspondiente a la Zeolita activada con NH_4Cl en el que todos los picos de difracción que aparecen están identificados en la zeolita en fase monoclinica. Los índices corresponden a los planos cristalinos de los picos y en el cual se observa que se conserva la cristalinidad, en otras palabras la cristalinidad de la zeolita no se ha destruido como consecuencia del proceso de activación y no aparecen picos de difracción correspondientes al NH_4Cl , ni a otro material que pudiera haberse formado como consecuencia del proceso.

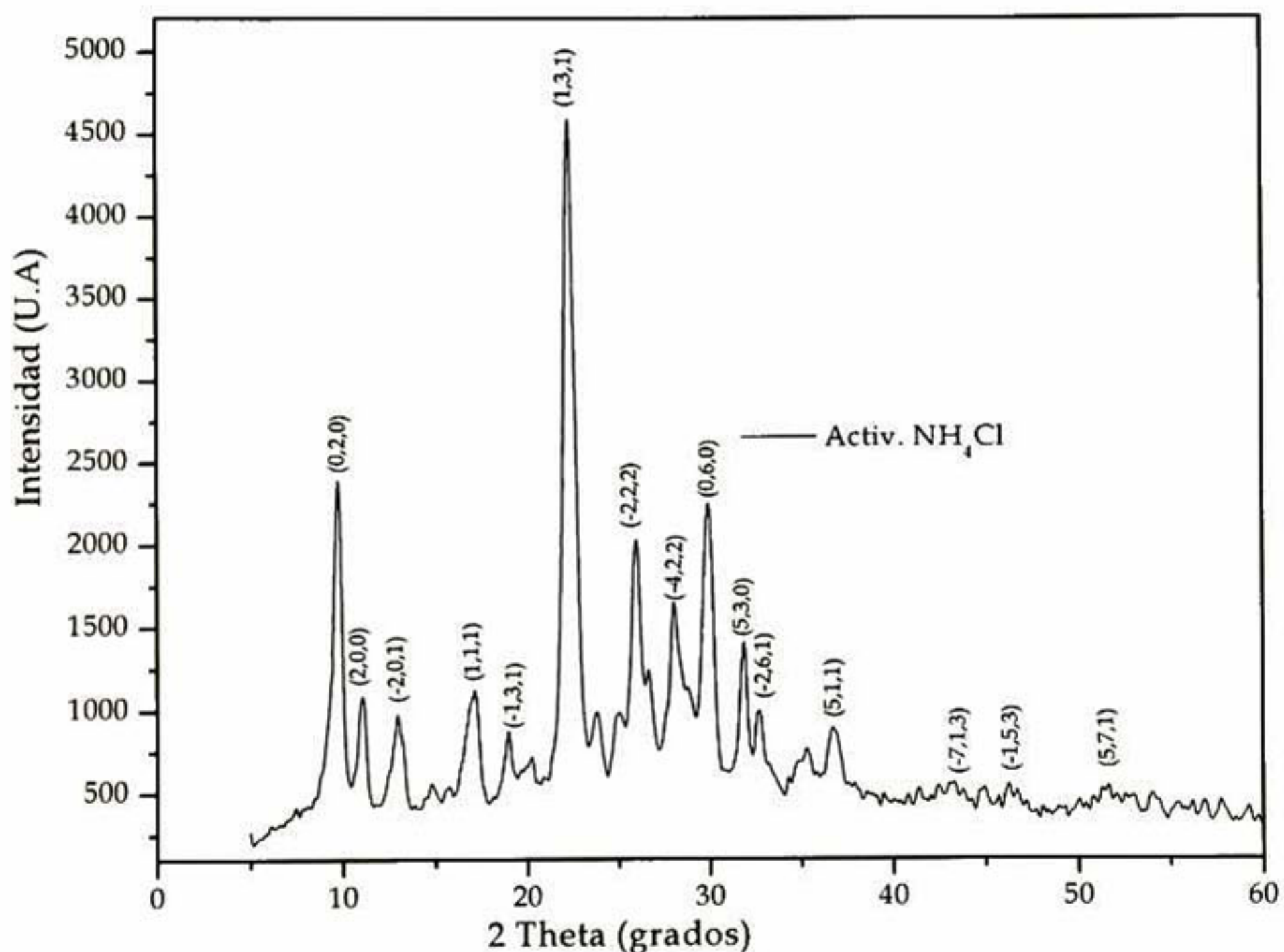


Fig. 6.2.3 Difractograma de rayos X correspondiente a la Zeolita activada con NH_4Cl

La Fig. 6.2.4 muestra la imagen obtenida en el microscopio electrónico de Barrido, en la que podemos observar cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita activada con NH_4Cl con tamaño de partícula que no varía con respecto a la zeolita natural y una forma estructural laminar, en esta imagen no podemos

apreciar los protones H^+ del NH_4Cl debido a las pequeñas dimensiones de las mismas y a la resolución del equipo.

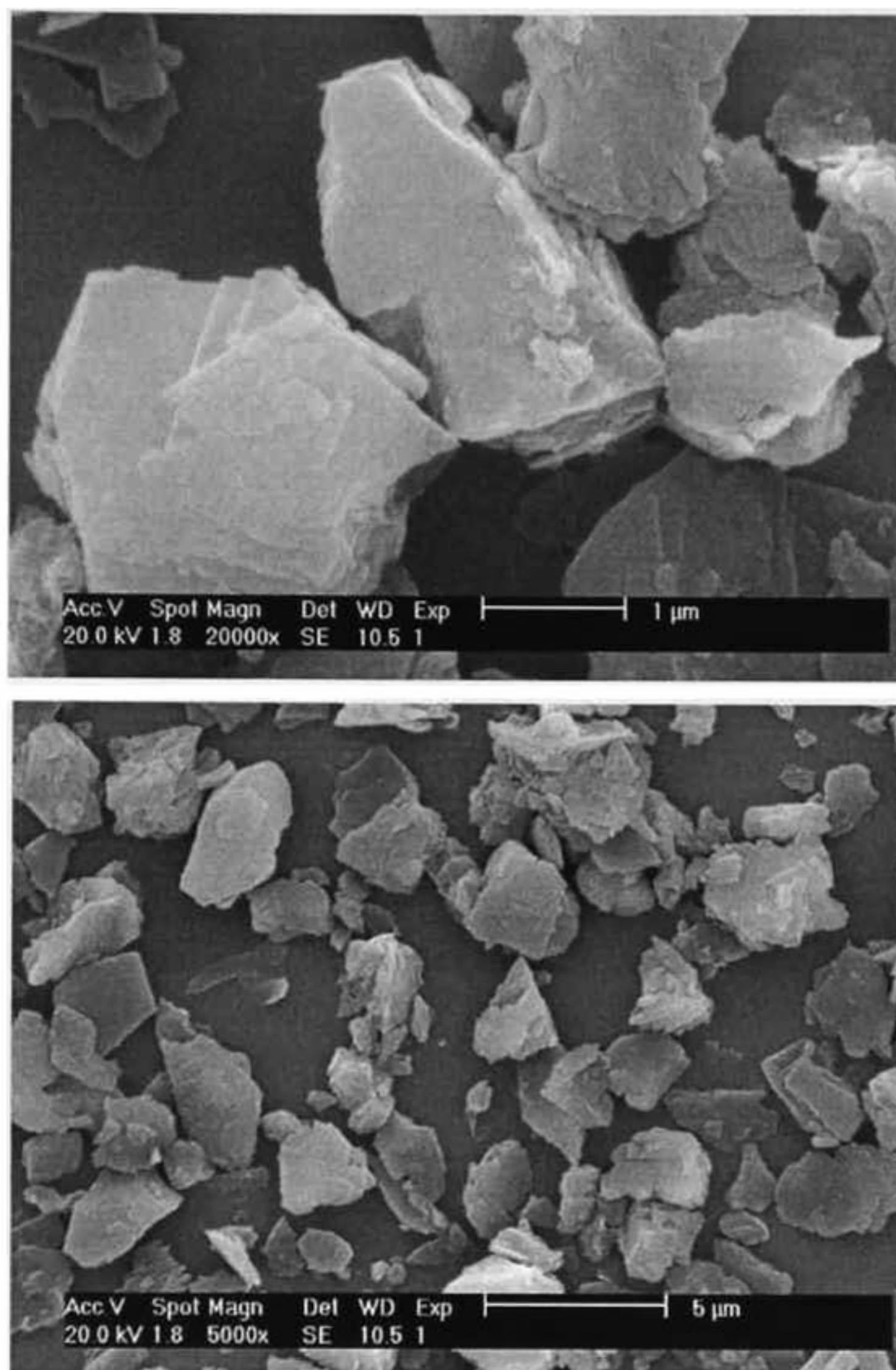


Fig. 6.2.4 Imágenes de microscopio electrónico de los cristales de la zeolita Clinoptilolita activada con H^+

Caracterización muestras A, B y C

Por otro lado para apreciar con mayor claridad los picos de difracción entre las muestras A, B y C, en esta siguiente figura (Fig 6.2.5) se han desplazado arbitrariamente las gráficas en sentido vertical. En ella podemos apreciar que no

hay disminución en intensidad de los picos de difracción y no existe corrimiento hacia menores o mayores ángulos en el pico mas intenso ni en otro de menor intensidad, del patrón de difracción de la zeolita natural, ni en los casos de las Zeolitas activadas.

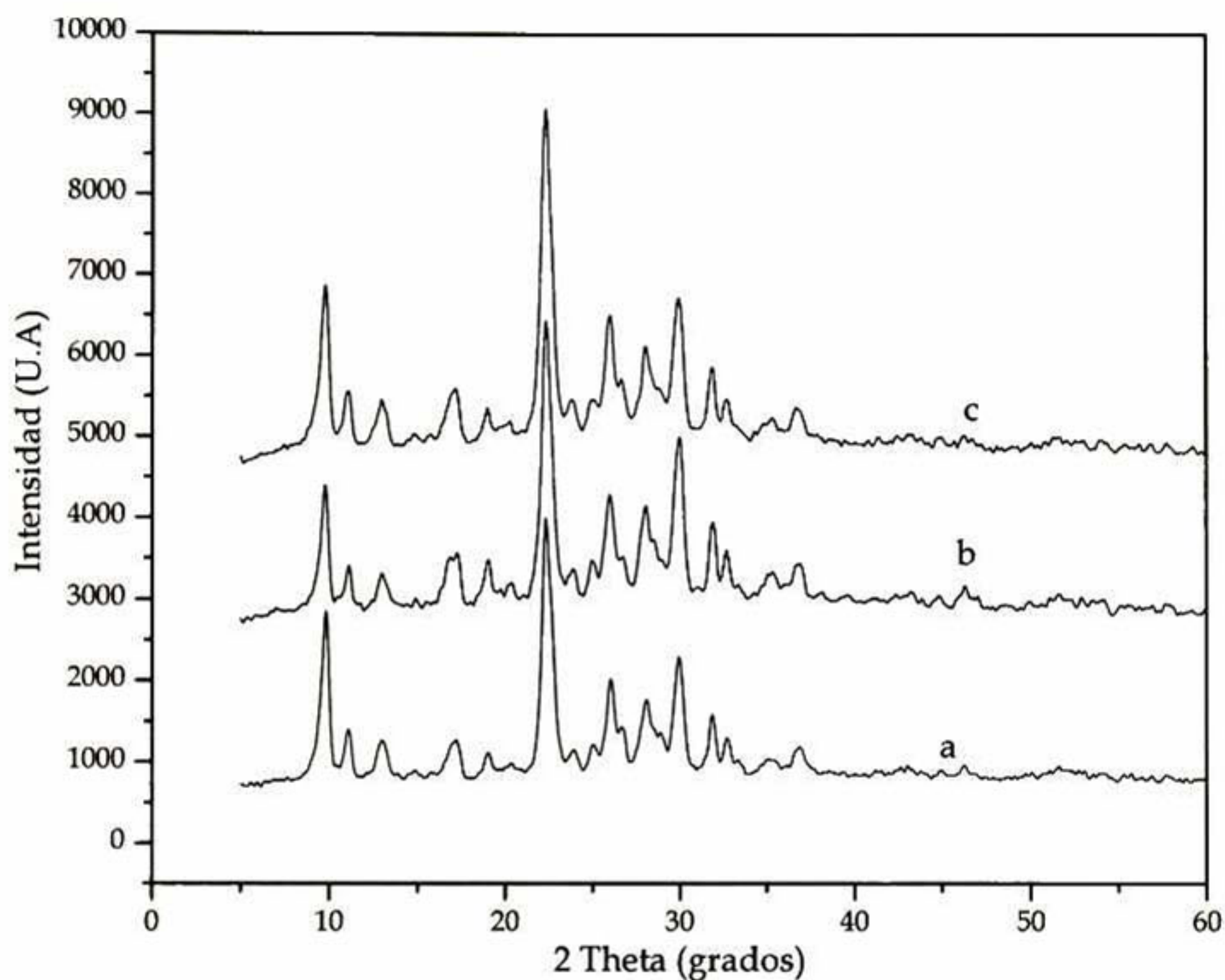


Fig. 6.2.5 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural Clinoptilolita a) Zeolita Pura, b) Zeolita activada con NaCl y c) Zeolita activada con NH₄Cl

El siguiente espectro de EDS (Fig. 6.2.6) muestra los porcentajes en peso de los cationes de la muestra B (Clinoptilolita activada con NaCl).

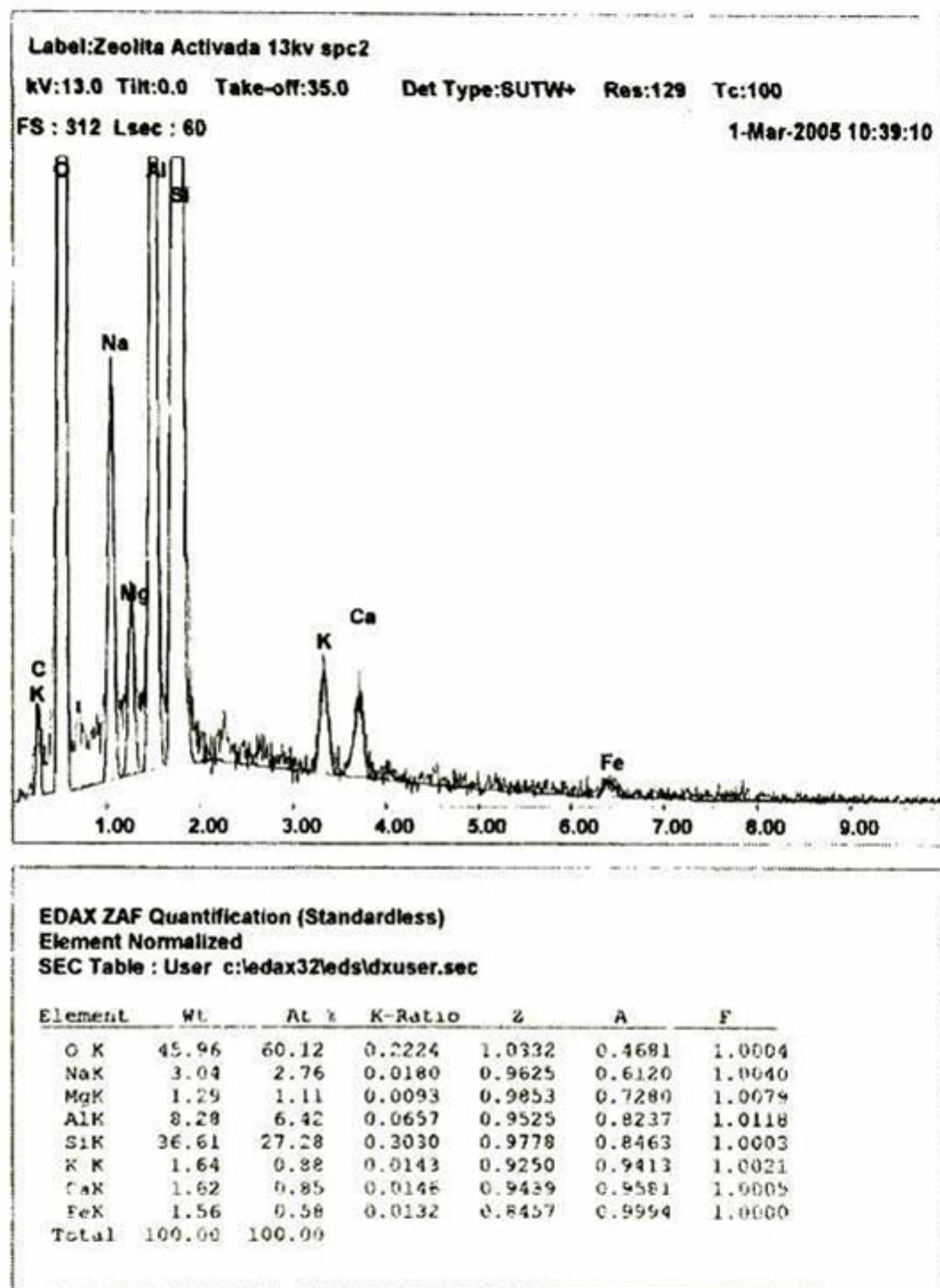


Fig. 6.2.6 Espectro EDS de Zeolita Activada con NaCl

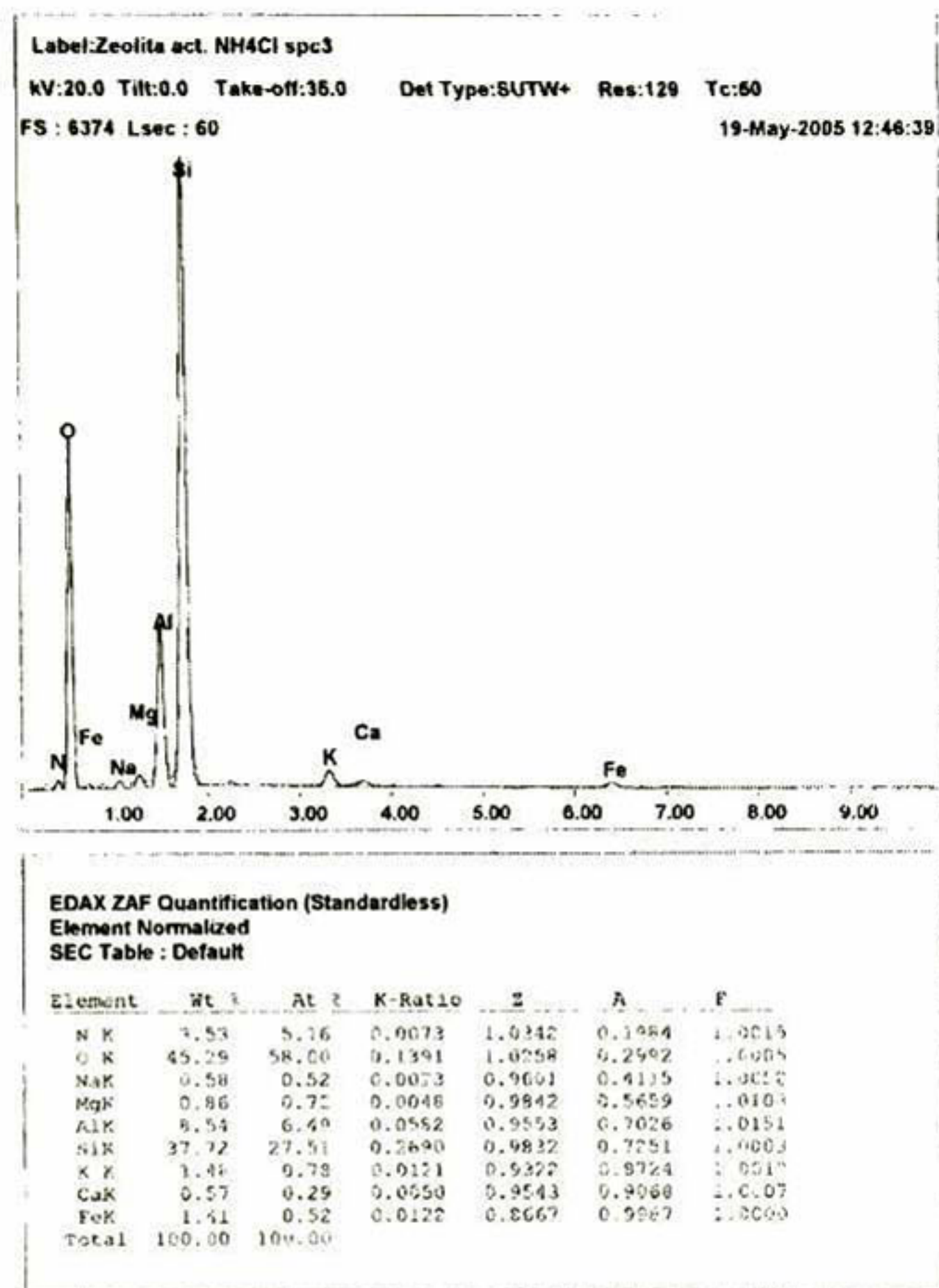


Fig. 6.2.7 Espectro EDS de Zeolita activada con NH₄Cl

Con los anteriores espectros (Fig. 6.1.2, Fig. 6.2.6, Fig. 6.2.7) pudimos determinar la composición química de las tres muestras A, B y C que fueron polvo con un color beige característico de la zeolita natural, hicimos pastillas de cada una de ellas para su caracterización en SEM (EDS) en tres diferentes puntos de las pastillas y así obtener un promedio del porcentaje en peso de la composición química de cada uno de los elementos contenidos en las muestras, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 6.2.1 Composición química de Zeolita natural Clinoptilolita con y sin Activación

| <i>Ion</i> | <i>Zeolita sin Activar %Wt</i> | <i>Zeolita act. con NaCl %Wt</i> | <i>Zeolita act. con NH₄Cl %Wt</i> |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|--|
| Ca | 3.01667 | 1.67333 | 0.56667 |
| K | 1.71333 | 1.72667 | 1.46333 |
| Fe | 1.68667 | 1.7 | 1.37 |
| Mg | 1.51333 | 1.28333 | 0.86667 |
| Na | 1.02333 | 2.89333 | 0.62 |
| O | 47.55333 | 45.95 | 45.55 |
| Al | 8.12667 | 8.36 | 8.48667 |
| Si | 35.36333 | 36.41 | 37.5 |

El siguiente gráfico (Fig. 6.2.8) muestra los porcentajes en peso obtenidos en SEM (EDS) de estas tres muestras. Cabe mencionar que no se grafican los elementos base de la zeolita como el Oxígeno, Aluminio y Silicio ya que sus porcentajes en peso no cambian aún con la activación como se mostró en la Tabla 6.2.1.

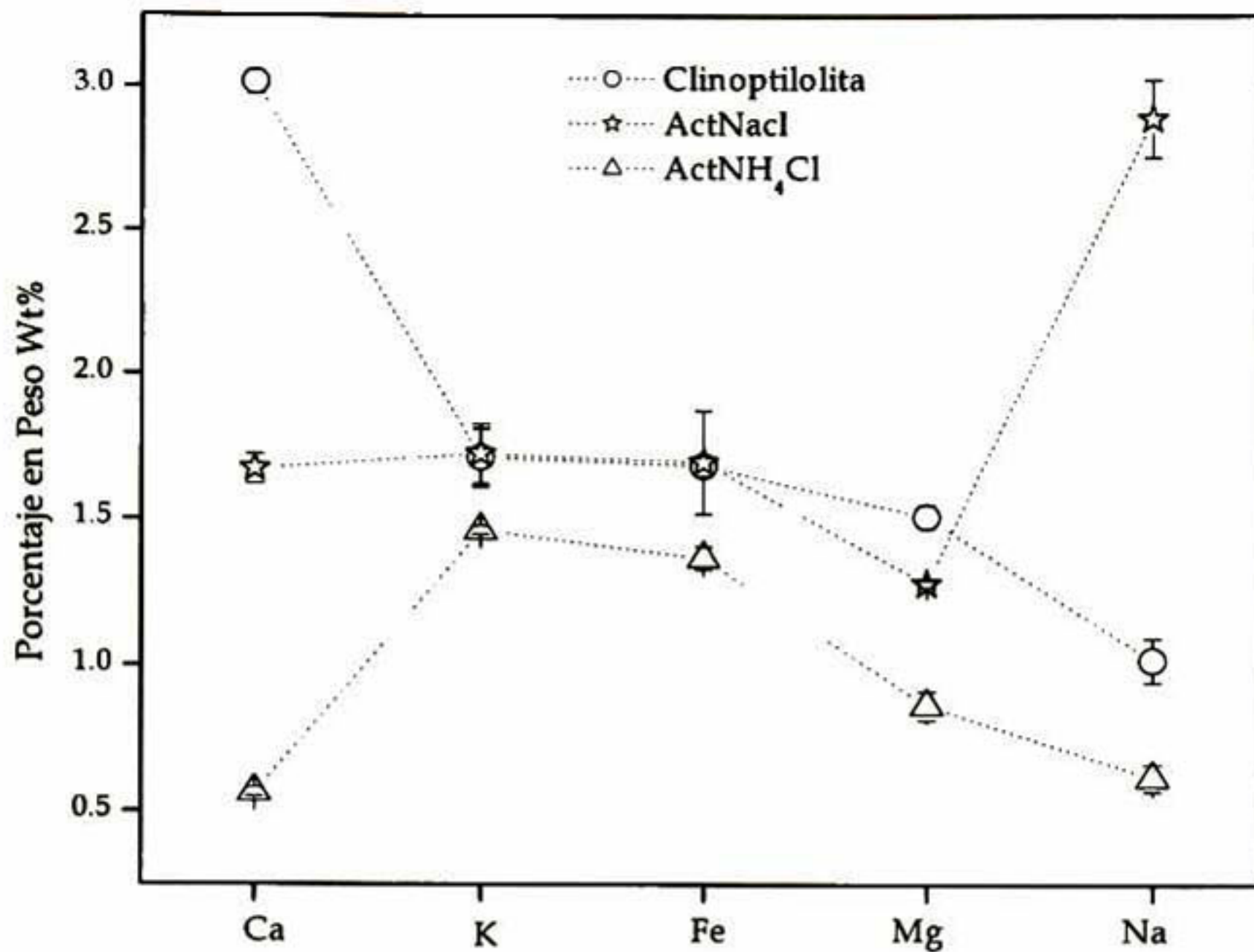


Fig. 6.2.8 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en la zeolita natural en función del proceso de activación.

En este gráfico (Fig. 6.2.8) se puede apreciar como el proceso de activación con NaCl disminuye el porcentaje de Ca en aproximadamente 1.3 % en peso. Por otro lado el porcentaje de Na aumenta de 1% hasta un casi 3%, esto quiere decir que los iones de Sodio se intercambiaron por el Calcio y por cierto porcentaje de Magnesio cumpliéndose así el objetivo del proceso de activación que es precisamente sustituir el mayor porcentaje en peso de los iones que tiene por naturaleza la zeolita por los iones Na⁺. En la activación con NH₄Cl el porcentaje en peso de los iones como el Calcio disminuyen en un 2.5%, así como el K, Fe y Na disminuyen en aproximadamente un 0.3 %, y Mg en un 0.7%. Podemos decir que los protones (H⁺) han ocupado las cavidades que desocuparon los iones de la zeolita, comprobando que este proceso de activación redujo un mayor porcentaje en peso de los iones de la zeolita natural por los

protones inclusive al K y Fe los cuales su disminución ya se mencionó. Concluyendo que de los dos procesos de activación el último es mas efectivo.

Sin embargo, cabe aclarar que en la activación con Na^+ el aumento de su porcentaje en peso fue bastante visible mientras que en la activación con H^+ no lo fué ya que este porcentaje en peso no puede ser medido con el equipo SEM (DSC) por lo tanto no se graficó.

VI.3 Intercambio Iónico en la Zeolita natural Clinoptilolita con iones Ag, Cu y Zn

Una vez activada la Zeolita propiciamos el intercambio iónico con Ag, Cu y Zn obteniendo tres series de muestras las cuales son polvos y tienen un color beige característico de la zeolita natural pura. Estas se muestran en la siguiente tabla 6.3.1.

Tabla 6.3.1 Muestras hechas con intercambio iónico en la zeolitas con y sin activar.

| <i>Intercambio Iónico con</i> | <i>Zeolita S/Act.</i> | <i>Zeolita Act. (NaCl) Na^+</i> | <i>Zeolita Act. (NH₄Cl) H^+</i> |
|---|-----------------------|---|--|
| Ag^+ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Cu^{++} | ✓ | ✓ | ✓ |
| Zn^{++} | ✓ | ✓ | ✓ |
| $\text{Zn}^{++} \text{Ag}^+$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| $\text{Zn}^{++} \text{Cu}^{++}$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| $\text{Cu}^{++} \text{Ag}^+$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| $\text{Zn}^{++} \text{Cu}^{++} \text{Ag}^+$ | | ✓ | |

Caracterización Difracción de Rayos X

En la figura 6.3.1 se muestra el espectro de difracción de rayos X correspondientes a una serie de muestras de zeolita natural modificada sin activación alojando en sus cavidades Ag^+ , Zn^{++} , Cu^{++}

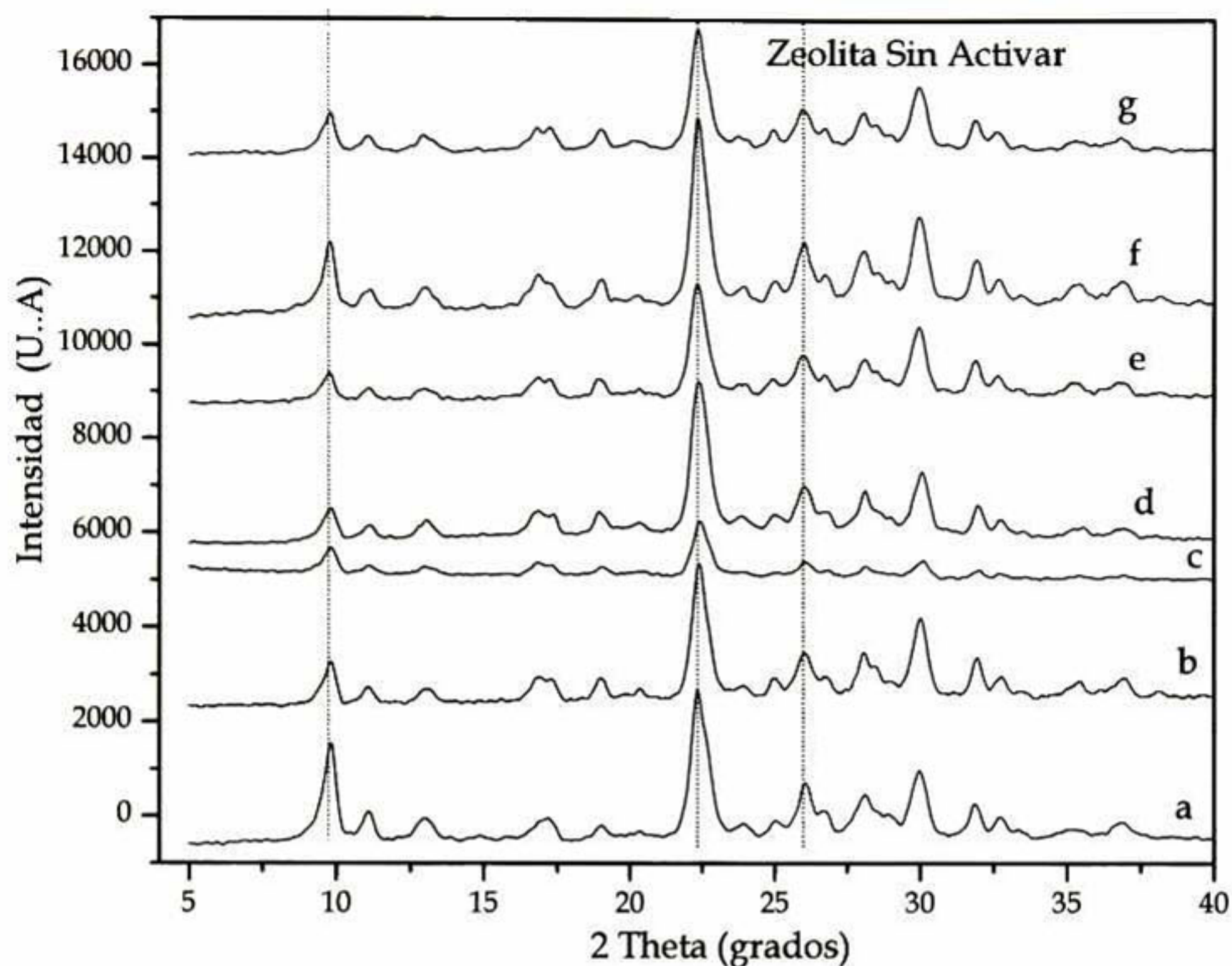


Fig. 6.3.1 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) sin activación alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag^+ , c) Zn^{++} , d) Cu^{++} , e) $\text{Zn}^{++}\text{Ag}^+$, f) $\text{Zn}^{++}\text{Cu}^{++}$ y g) $\text{Cu}^{++}\text{Ag}^+$

Para mayor claridad se han desplazado las graficas, arbitrariamente en sentido vertical. En estos difractogramas (Fig. 6.3.1) observamos una reducción en la intensidad de todos los picos del espectro *c* del Zn^{++} del pico principal en aproximadamente $2\theta = 22.4^\circ$. Lo mismo podemos ver en el pico en aproximadamente $2\theta = 9.8$ de los espectros *b* (Ag^+), *d* (Cu^{++}), *e* ($\text{Zn}^{++}\text{Ag}^+$) y *g* ($\text{Cu}^{++}\text{Ag}^+$). Los picos de difracción en aproximadamente $2\theta = 17^\circ$ en todos los espectros en comparación con *a* (zeolita natural) se modifican dividiéndose en dos picos, probablemente se deban a la tensión dada por la interacción de los iones metálicos con la estructura cristalina de la zeolita, además de que este comportamiento podría ser producido por una combinación de las propiedades del Ion metálico, tales como radio iónico (Fig. 1.3), valencia, electronegatividad, etc.

En la figura 6.3.2 se muestra el difractograma de rayos X correspondientes a una serie de muestras de zeolita natural modificada **activada** con NaCl alojando en sus cavidades alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag^+ , c) Zn^{++} , d) Cu^{++} , e) $Zn^{++}Ag^+$, f) $Zn^{++}Cu^{++}$ g) $Cu^{++}Ag^+$ y h) $Ag^+Cu^{++}Zn^{++}$

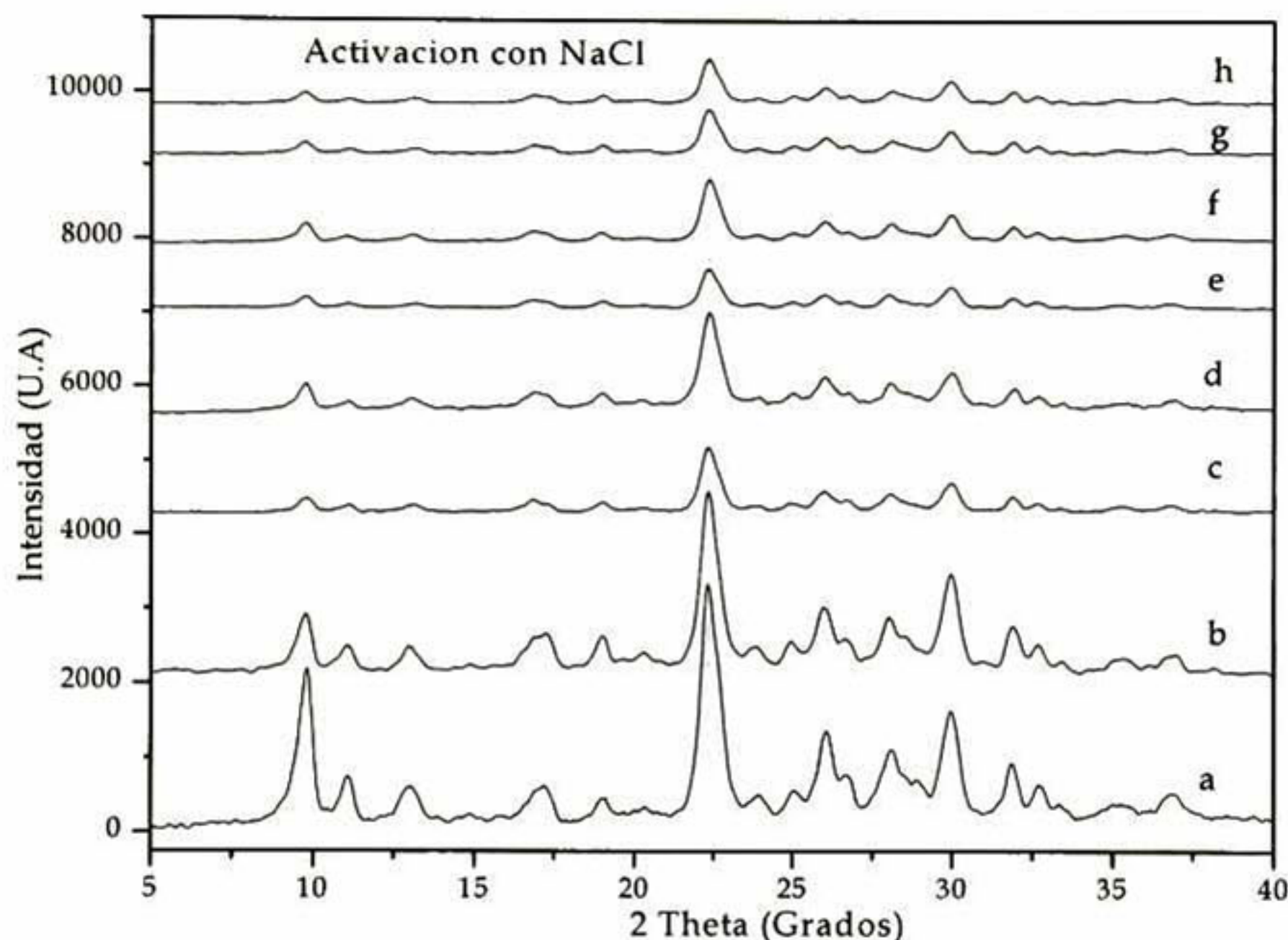


Fig. 6.3.2 Difractogramas de difracción de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) activada con NaCl alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag^+ , c) Zn^{++} , d) Cu^{++} , e) $Zn^{++}Ag^+$, f) $Zn^{++}Cu^{++}$ g) $Cu^{++}Ag^+$ y h) $Ag^+Cu^{++}Zn^{++}$

En estos difractogramas (Fig. 6.3.2) podemos apreciar en forma cualitativa los picos de difracción correspondientes a la zeolita activada con NaCl. En estos difractogramas, excepto para *b* (Ag^+) se observa una reducción en la intensidad de los picos de difracción de los difractogramas correspondientes a las muestras de Zn^{++} , Cu^{++} , $Zn^{++}Ag^+$, $Zn^{++}Cu^{++}$, $Cu^{++}Ag^+$ y $Ag^+Cu^{++}Zn^{++}$. Dichos picos se encuentran en $2\theta = 9.8, 11.08, 13, 17.16, 19.04, 22.32, 26.04, 28.08, 29.96, 31.88, 32.72, 36.88, 43, 46.24$ y 51.6 debido a una diferencia en la magnitud de la distancia de los planos cristalinos reduciendo el número de longitudes de onda

originando una disminución en la intensidad de la radiación medida en el detector.

En la figura 6.3.3 se muestra el espectro de difracción de rayos X correspondientes a una serie de muestras de zeolita natural modificada activada con NH_4Cl alojando en sus cavidades Ag^+ , Zn^{++} , Cu^{++} .

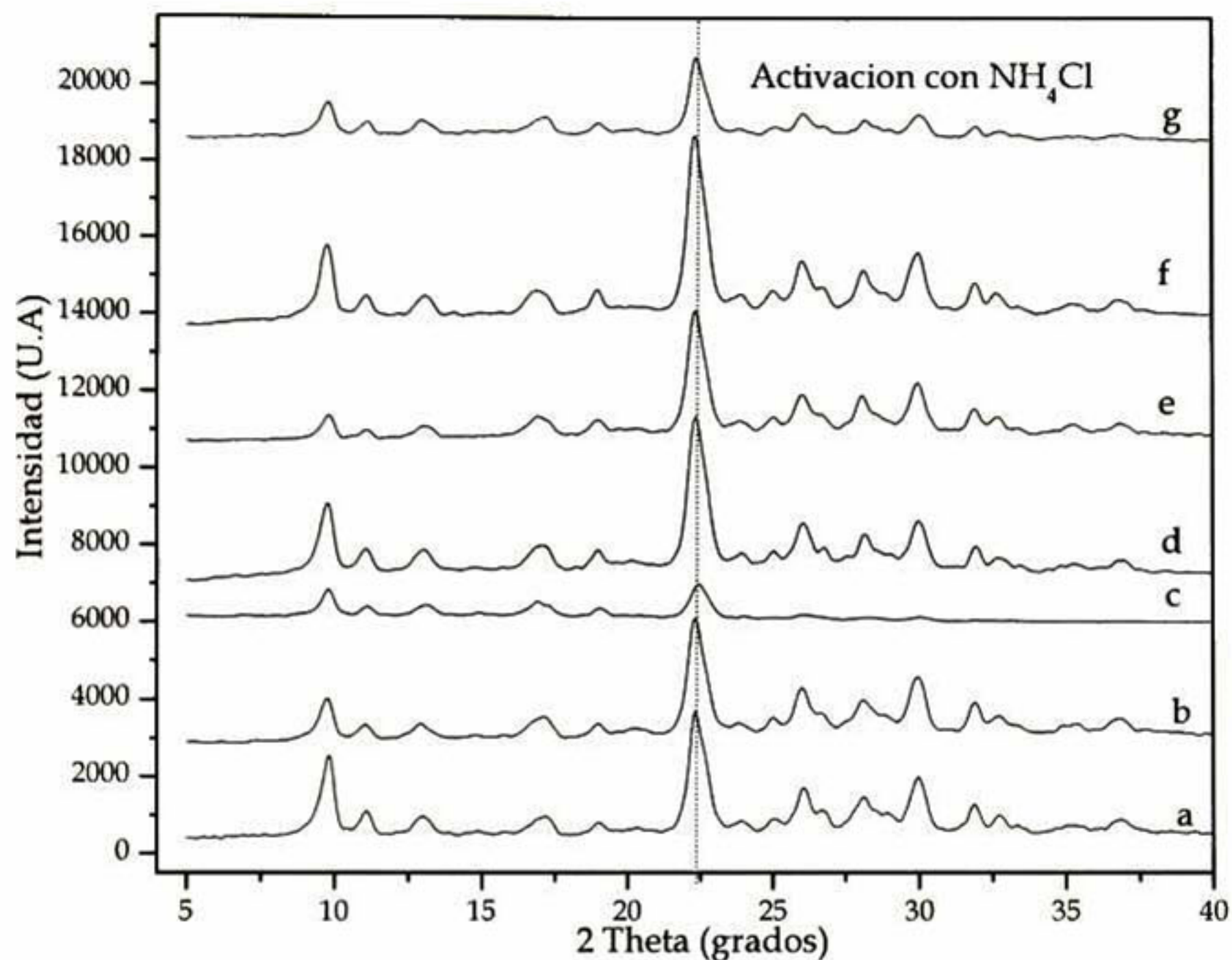


Fig. 6.3.3 Difractogramas de rayos X correspondientes a la Zeolita natural (Clinoptilolita) activada con NH_4Cl alojando los siguientes diferentes iones a) zeolita natural(pura), b) Ag^+ , c) Zn^{++} , d) Cu^{++} , e) $\text{Zn}^{++}\text{Ag}^+$, f) $\text{Zn}^{++}\text{Cu}^{++}$ g) $\text{Cu}^{++}\text{Ag}^+$

En estos difractogramas (Fig. 6.3.3) de rayos X pudimos apreciar en forma cualitativa los planos cristalinos de la zeolita con (NH_4Cl). En los que se observa en forma una reducción en la intensidad de los picos de difracción de los espectros c (Zn^{++}) y g ($\text{Cu}^{++}\text{Ag}^+$). Se sabe que cuando se obtienen los espectros de difracción de un cristal en todas las orientaciones posibles, se obtienen las distancias interplanares de todos los posibles planos cristalinos de la estructura del cristal. Por lo que ésta sucesión numérica esta determinada por la geometría

de la estructura. Concluyendo con esto que nuevamente puede ser una reducción del número de longitudes de onda por cambios en las distancias de los planos cristalinos, que son las que interfieren constructivamente aumentando la intensidad de los picos.

Caracterización SEM (EDS)

Como ya hemos mencionado en el caso de zeolitas naturales es absolutamente necesario el proceso de activación debido a la gran diversidad de iones presentes en las mismas. En los siguientes gráficos el eje horizontal (X) tenemos el tipo de iones presentes removibles e intercambiables y en el eje vertical (Y) la concentración en porcentaje (en peso). La gráfica de la figura 6.3.4 presenta los resultados de la composición química de una serie de muestras en la que se han alojado iones metálicos en las cavidades de la **zeolita natural (Clinoptilolita) sin activar**. En esta se presentan los resultados correspondientes de cada muestra las cuales fueron elaboradas con soluciones de AgNO_3 0.01M la cual se realizó en un medio en completa oscuridad, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.05 M y ZnCl_2 0.1 M respectivamente con agitación magnética a 50°C , así como las correspondientes a las muestras elaboradas en dos etapas en el gráfico 6.3.5; la primera etapa es idéntica a las muestras ya mencionadas, y la segunda etapa consiste en colocarlas en las mismas soluciones dependiendo del tipo de combinación de iones. En el siguiente gráfico (Fig 6.3.4) (valores provenientes de espectros EDS realizados en SEM) observamos que la muestra de zeolita intercambiada con Ag, el porcentaje de iones introducidos fue de 3% en peso. Por otro lado la muestra de zeolita-Cu y zeolita-Zn se intercambiaron en un 1.5 % en peso aproximadamente. En la figura 6.3.5 se observa que cuando la zeolita se somete a las dos etapas de intercambio es decir cuando se pretenden introducir dos iones en la misma muestra, el porcentaje de intercambio varía ya que en este los iones compiten por ocupar las cavidades de la zeolita (Fig. 2.1). Tal es el caso de la muestra de Clinoptilolita con ZnAg donde la plata se introduce en

aproximadamente un 5.5% es decir un 2.5% mas que la muestra de Clinoptilolita con Ag, caso contrario sucede con el Zn y el Cu en la que sus porcentajes disminuyen cuando se introducen a la zeolita con otro de los iones metálicos.

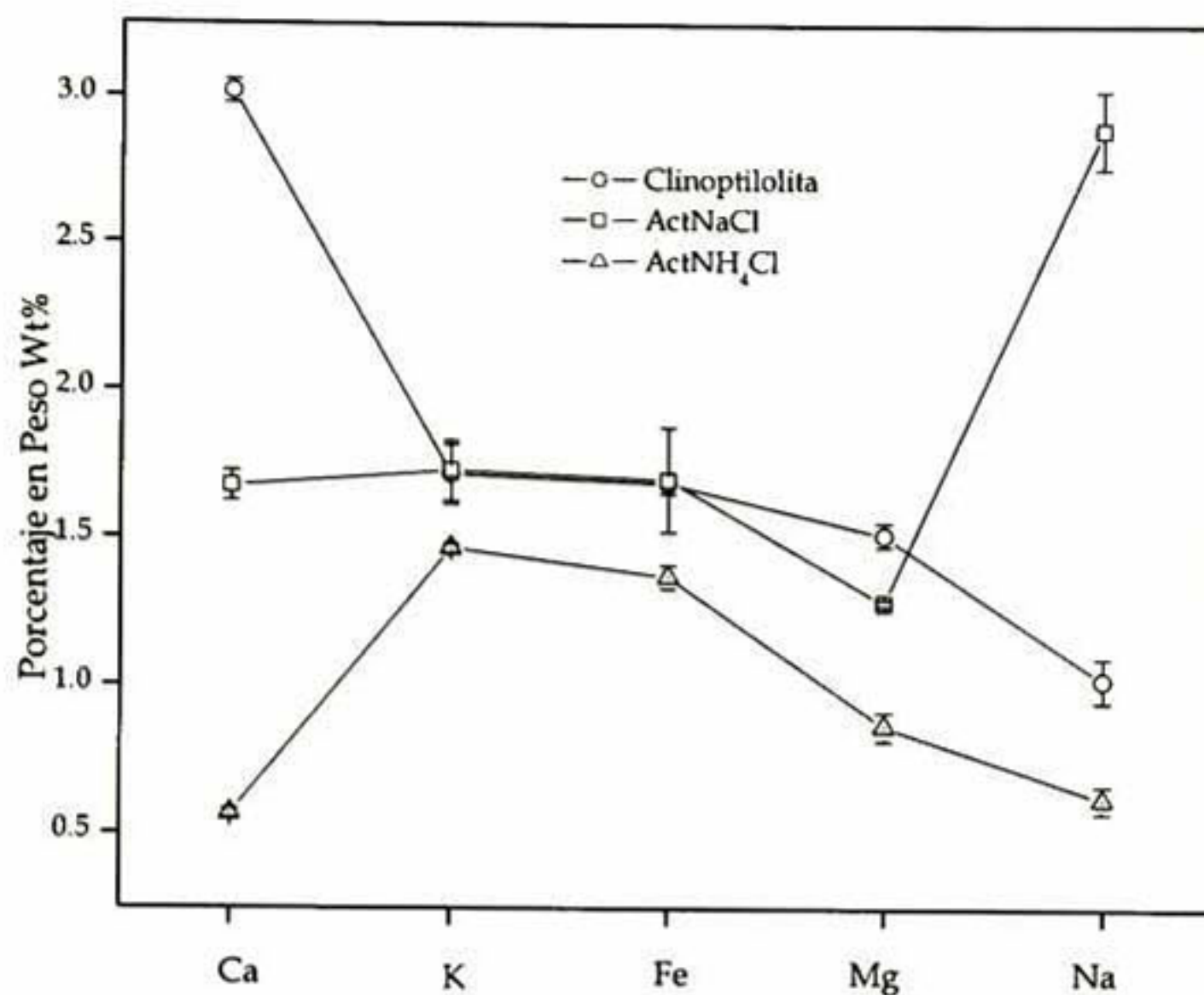


Fig. 6.3.4 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada sin activación en función del Ion metálico introducido

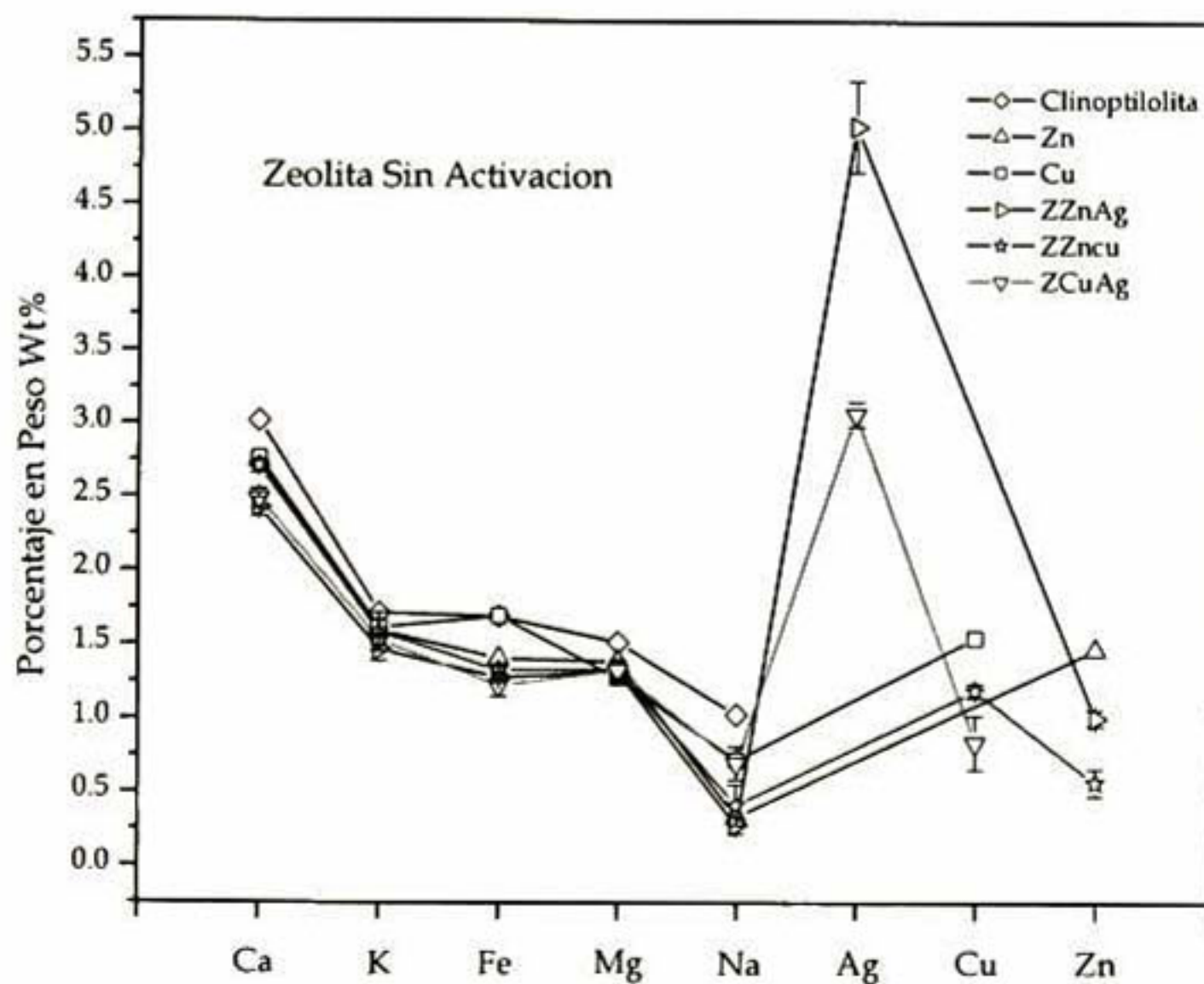


Fig. 6.3.5 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada sin activación en función de los Iones metálicos introducidos.

La siguiente Fig. 6.3.6 muestra los iones introducidos en la **Zeolita activada** con NaCl. En ella podemos apreciar como en la zeolita-Ag hay una reducción de Na de aproximadamente un 1% y Fe de un 0.5%, y un intercambio de Ag 4% en peso. El Na sale de las cavidades de la zeolita dando la oportunidad a los iones de entrar en sus cavidades afirmando con esto que la activación de la zeolita no es un paso inútil. Los iones Zn y Cu se intercambiaron en un 2.5 y un 2% respectivamente, reduciendo 1.5% en peso de iones Na. Por otra parte ZnCuAg siendo un triple intercambio iónico, los iones Na salieron en un porcentaje que cayó desde un 3% a un 0.5% aproximadamente.

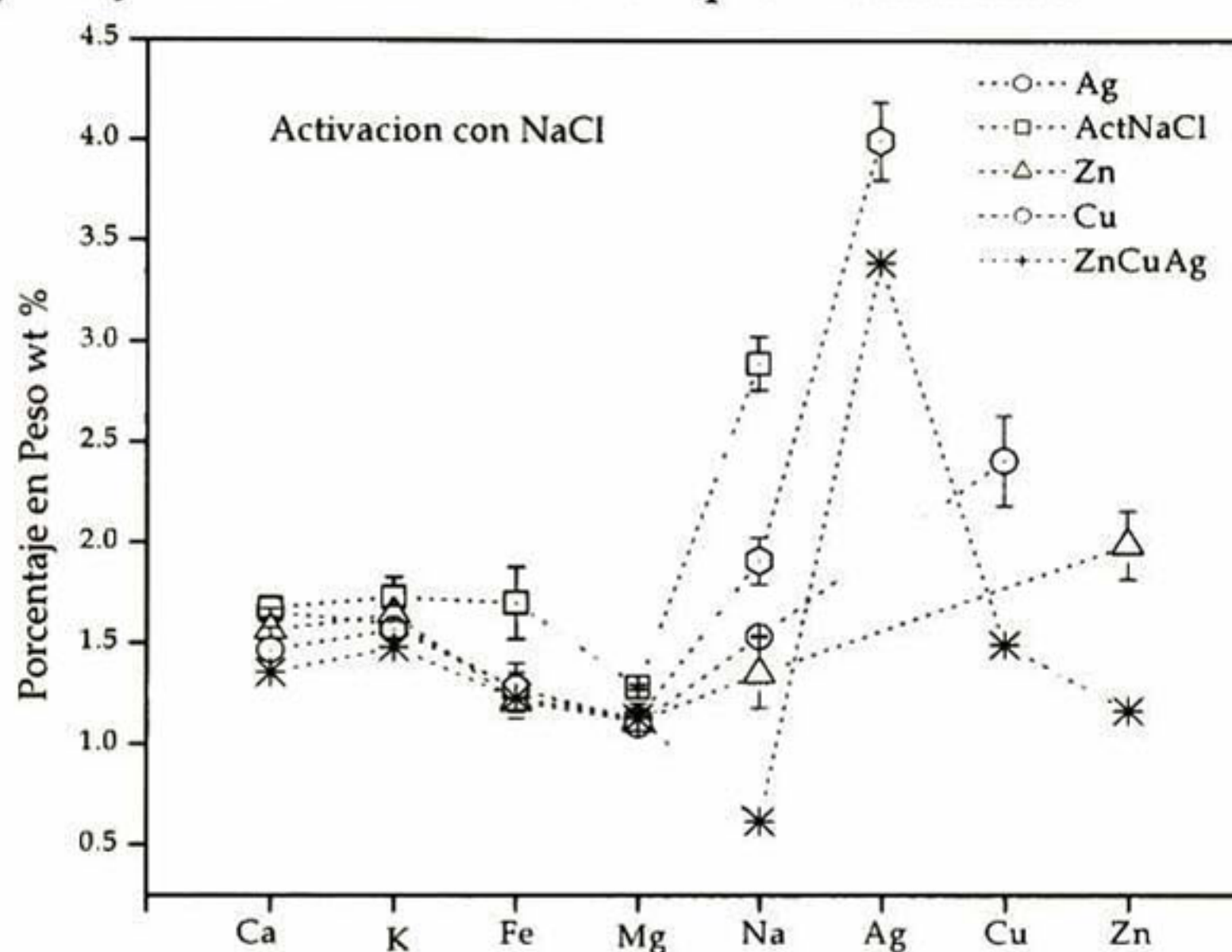


Fig. 6.3.6 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NaCl en función de los Iones metálicos introducidos.

A continuación se muestra otro gráfico (fig 6.3.7) de la misma serie de muestras solo que ahora es el caso de los iones combinados. Los iones Ag se intercambiaron un 3.5% en las cavidades de la Zeolita aun cuando esta presente otro metal como el Zn o el Cu. Por otra parte estos iones se intercambian un 2% y 3.2% en peso respectivamente. Los iones naturales de la zeolita redujeron su porcentaje en peso (hecho que se hace mas visible en los iones de Na) al ser

sometidos a una activación (NaCl) y posteriormente a un intercambio iónico metálico.

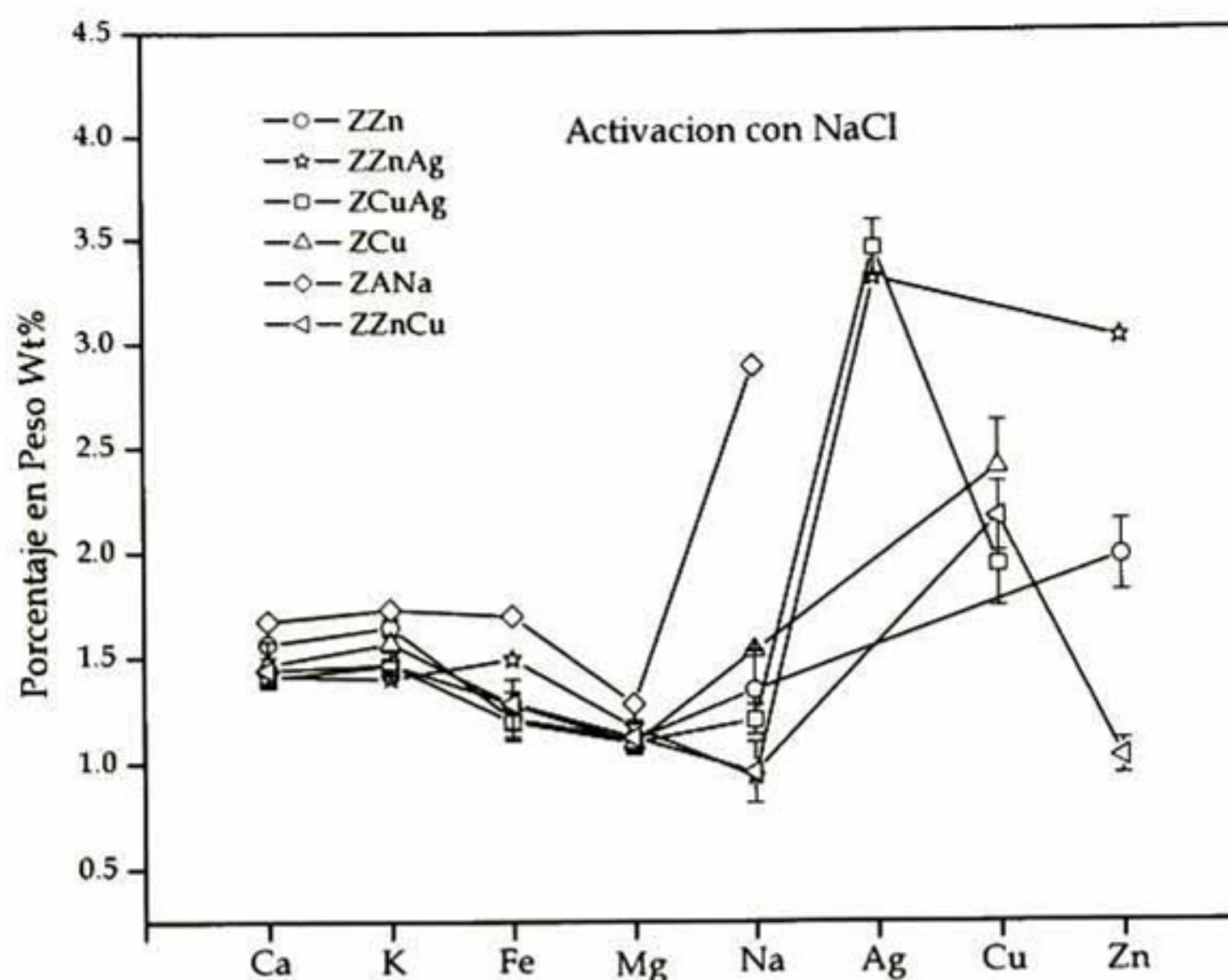


Fig. 6.3.7 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NaCl en función de los Iones metálicos introducidos.

Como pudimos apreciar en los anteriores gráficos en todos los casos se logró disminuir un gran porcentaje en peso de los iones naturales en la zeolita.

La tercera serie de muestras fueron las **activadas** con NH_4Cl que fué el caso en el que se logró una reducción mayor en los iones naturales de la zeolita. Nuevamente se observa que la Ag logra introducirse en mayor porcentaje en peso (figura 6.3.8) a la zeolita con 3.75%. Por otra parte el Zn en aproximadamente 3% y Cu 2.25%. En la figura 6.3.9 aún cuando se encuentran presentes los otros iones metálicos, los iones Ag se intercambian un 3.75% en peso. El cobre logra un mínimo de 2% y un máximo de 2.75% y por ultimo el Zn logra un mínimo de 1.5% y máximo de 3%,

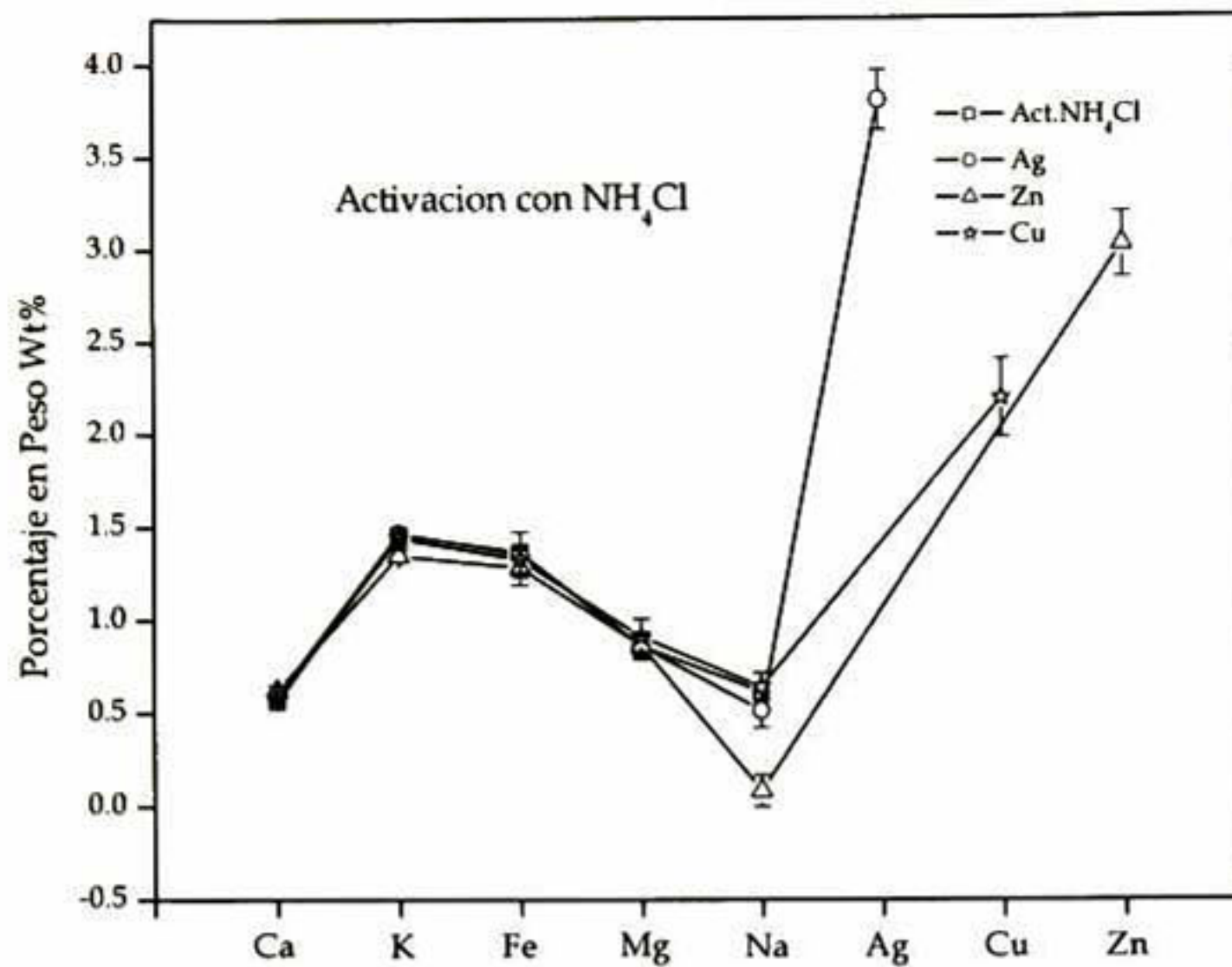


Fig. 6.3.8 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NH₄Cl en función de los iones metálicos introducidos.

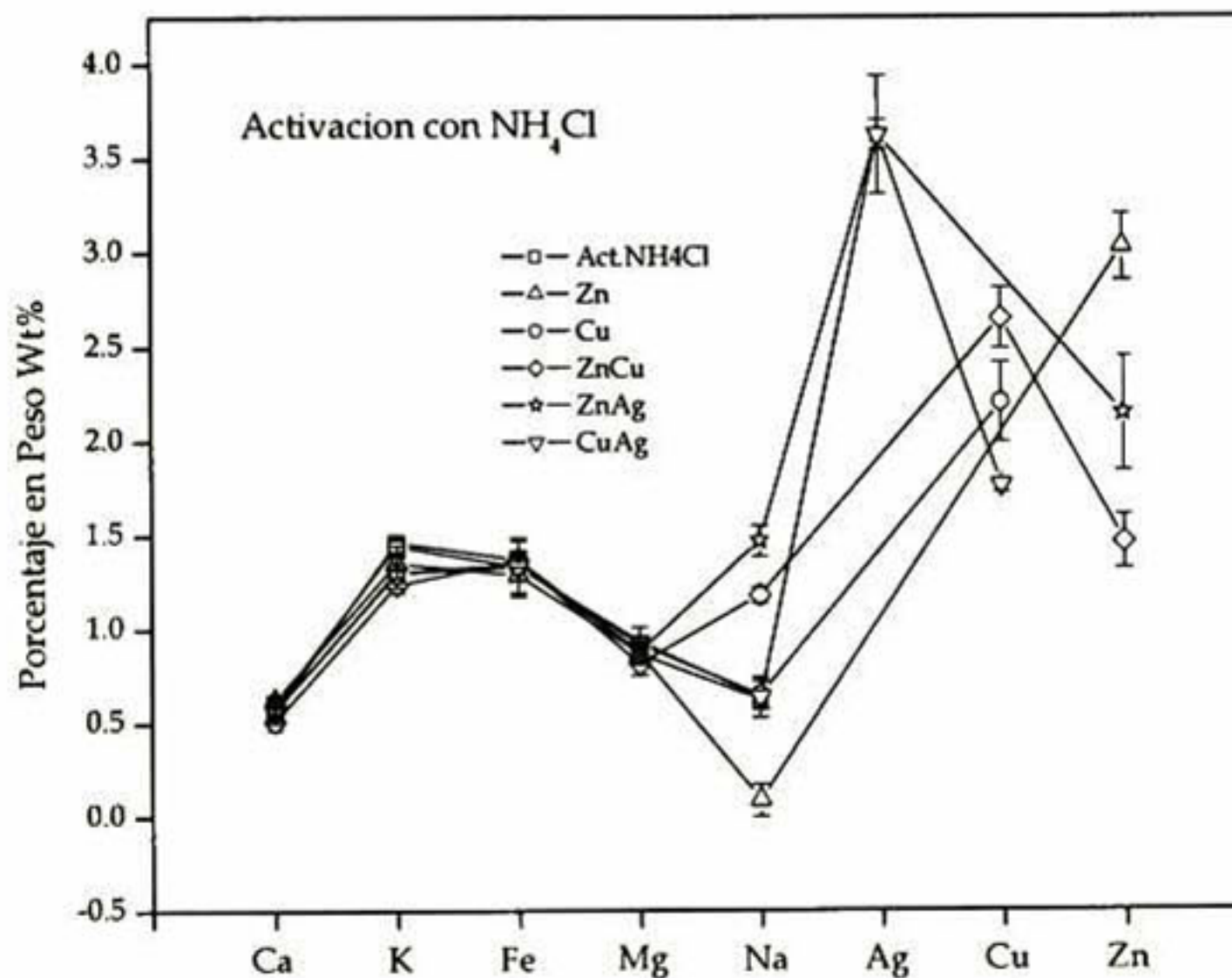


Fig. 6.3.9 Variación del porcentaje en peso de iones presentes en las muestras de zeolita modificada activada con NH₄Cl en función de los iones metálicos introducidos.

En este gráfico (Fig. 6.3.9) el Zn obtuvo un excelente intercambio iónico de 3% en comparación a las anteriores series de muestras (sin activación y activación con NaCl). El Cu se intercambió un 2.25% aproximadamente, caso contrario logra un intercambio de 2.75% en peso cuando se encuentra presente en la muestra que

contiene Zn. Una vez más los iones Ag están presentes aproximadamente un 0.75% por encima de los iones Zn y 1% de los iones Cu. En todos los casos existe una reducción de Na, confirmando nuevamente que estos iones tienen facilidad para poder salir de la zeolita.

Caracterización SEM (EDAX)

En las siguientes figuras se muestran algunas de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de la zeolita Clinoptilolita pura y algunas muestras de zeolita modificada.

A continuación se muestra (Fig. 6.3.10) una de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de Barrido, en la cual podemos observar cristales de la Zeolita natural Clinoptilolita con un tamaño de partícula de 1 a 5 μm y una forma estructural laminar típica de la zeolita natural.

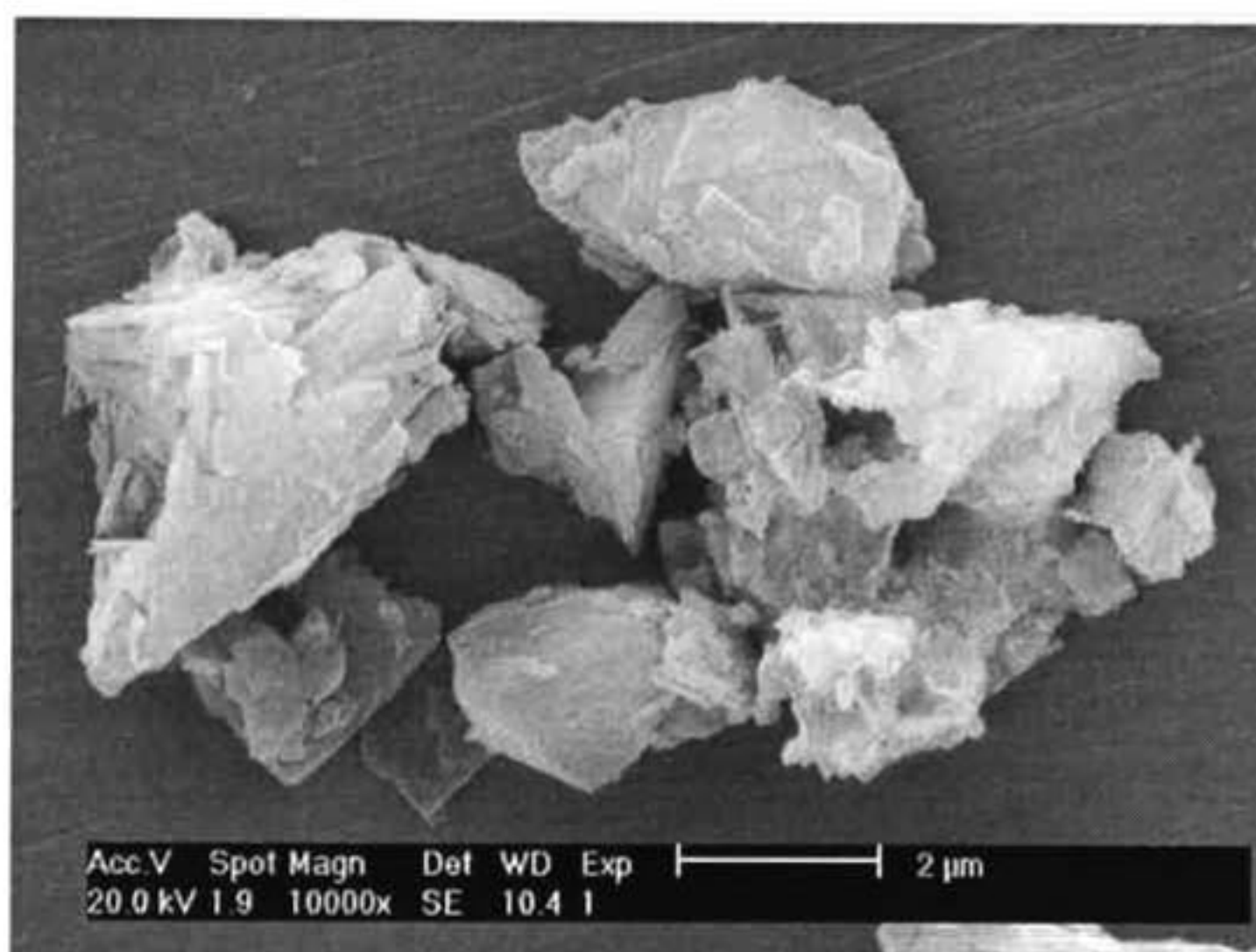


Fig. 6.3.10 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de una cristal de zeolita natural Clinoptilolita

La siguiente figura (Fig.6.3.11) muestra la zeolita modificada con Ag, que fue activada con NaCl, en la cual al compararla con la figura anterior podemos observar que la forma de los cristales no cambia al introducir la Ag en sus cavidades, con un tamaño de partícula que no difiere al de la zeolita natural (1-5

μm), aunque en ésta imagen no se pueden apreciar los iones de Ag debido a las pequeñas dimensiones de las mismas y a la resolución del equipo.

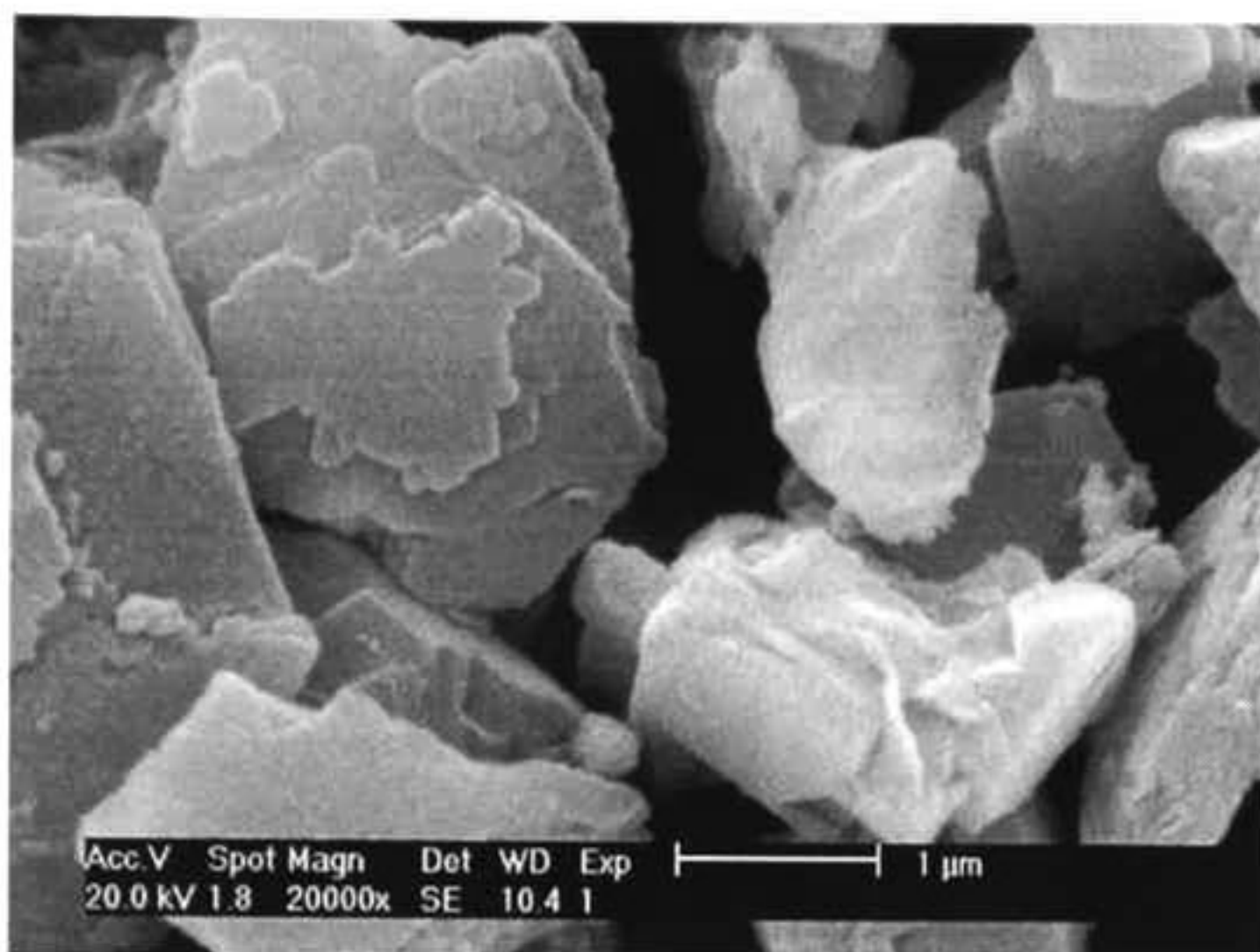


Fig.6.3.11 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Ag.

A continuación la Fig. 6.3.12 muestra la imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido, en ella podemos observar cristales de zeolita natural sin Activar alojando iones de Cu, nuevamente con tamaños de cristal de 1-5 μm . Al comparar esta imagen (Fig. 6.3.12) con la figura 6.3.10 la cual corresponde a un cristal de la zeolita natural Clinoptilolita pura, tomada en el mismo equipo, podemos observar que la forma cristalina laminar no cambia al introducir el Cu a sus cavidades aunque si pudimos observar cierta rugosidad en su superficie tal vez ocasionada por el proceso de intercambio iónico.

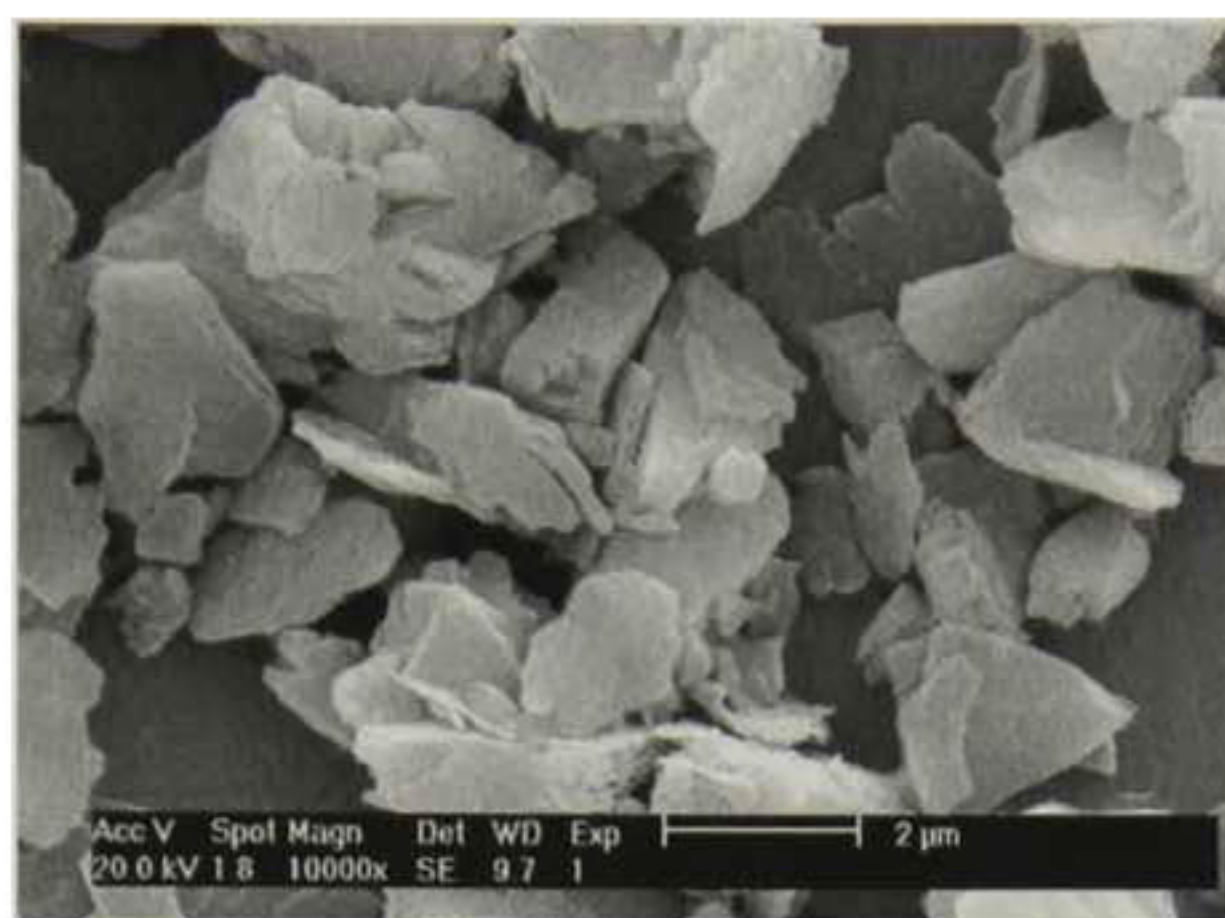


Fig.6.3.12 Imagen SEM de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Cu

En la Fig. 6.3.13 las imágenes grabadas por microscopio electrónico de barrido exhiben la forma de la zeolita natural activada con NaCl intercambiada con Zn, en esta se puede apreciar un tamaño de cristales normal en una zeolita natural, y comparándola con la imagen de la figura 6.3.10 observamos que la forma cristalina sigue siendo laminar y al igual que la anterior (Fig. 6.3.12) se observa cierta rugosidad debido a que ha sido sometida al proceso de activación alcalina y posteriormente al intercambio iónico.

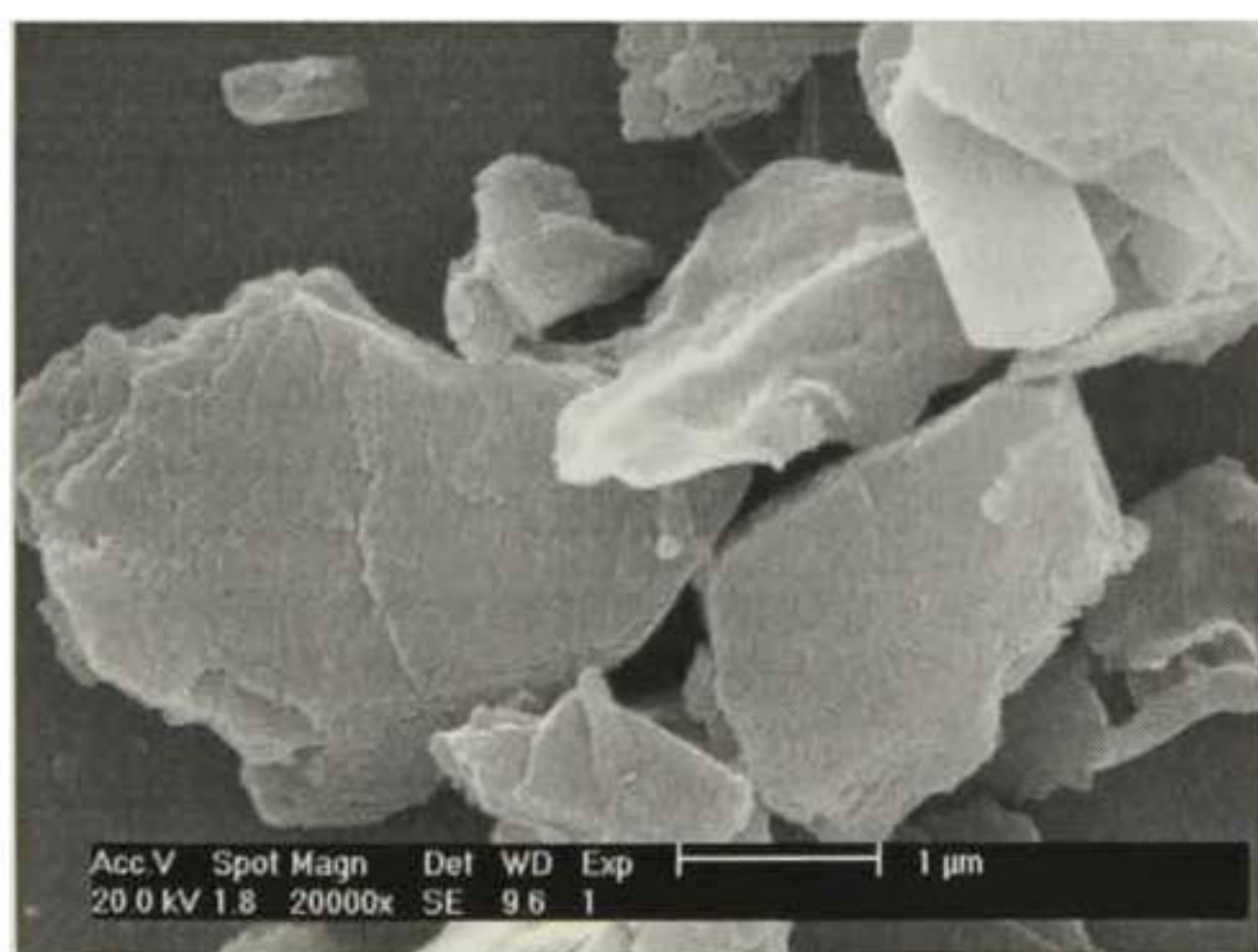


Fig.6.3.13 Imagen SEM de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Zn

La Fig. 6.3.14 muestra la imagen obtenida en SEM de cristales de Clinoptilolita activada con NH_4Cl alojando iones de Cu y Ag con una estructura cristalina laminar con tamaños de cristal sin variación (1-5 μm), en donde las superficies de los cristales se observan con cierta rugosidad ocasionada por el proceso de activación e intercambio iónico.



Fig.6.3.14 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Cu y Ag.

La siguiente Fig. 6.3.15 es una imagen obtenida en SEM la cual muestra los cristales de zeolita natural Clinoptilolita sin activar con tamaño de partícula de 1-5 μm y una forma estructural laminar típicas de la zeolita. Los cristales de esta se encuentran alojando iones de Zn y Ag lo cual tal vez ha ocasionado que la superficie de estos no sean uniformes y exista cierta rugosidad en la superficie de los cristales.



Fig.6.3.15 Imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido de cristales de zeolita natural Clinoptilolita alojando iones de Zn y Ag.

VI.4 Determinación de Propiedades Antibacterianas

En las siguientes graficas se muestran en el eje horizontal (X) las muestras de zeolita modificada indicando el tipo de activación de acuerdo al Ion metálico y en el eje vertical (Y) el porciento de reducción de las bacterias. La concentración inicial de bacterias fue de aproximadamente 1×10^4 bacterias/ml.

La figura 6.4.1 muestra los resultados del estudio realizado con *Escherichia coli* con una concentración inicial de $3.96 \log_{10}$ y sometida a 2 hrs. de contacto con las zeolitas. Se aprecia claramente que la muestra de Zeolita pura pareciera tener cierto efecto sobre ellas sin embargo, la reducción logarítmica de 0.4 probablemente se debe a que la zeolita retuvo en ella a un cierto número de bacterias sin matarlas. La muestra que contiene Zn y la que contiene Cu en las muestras activadas con NaCl, logran una reducción logarítmica de aproximadamente 3 y 3.5 unidades respectivamente. Las demás muestras lograron una reducción total en 2 hrs. Cabe señalar que cuando *E. coli* permaneció durante 7 hrs. en contacto con las zeolitas, todas demostraron inhibición total sobre la bacteria.

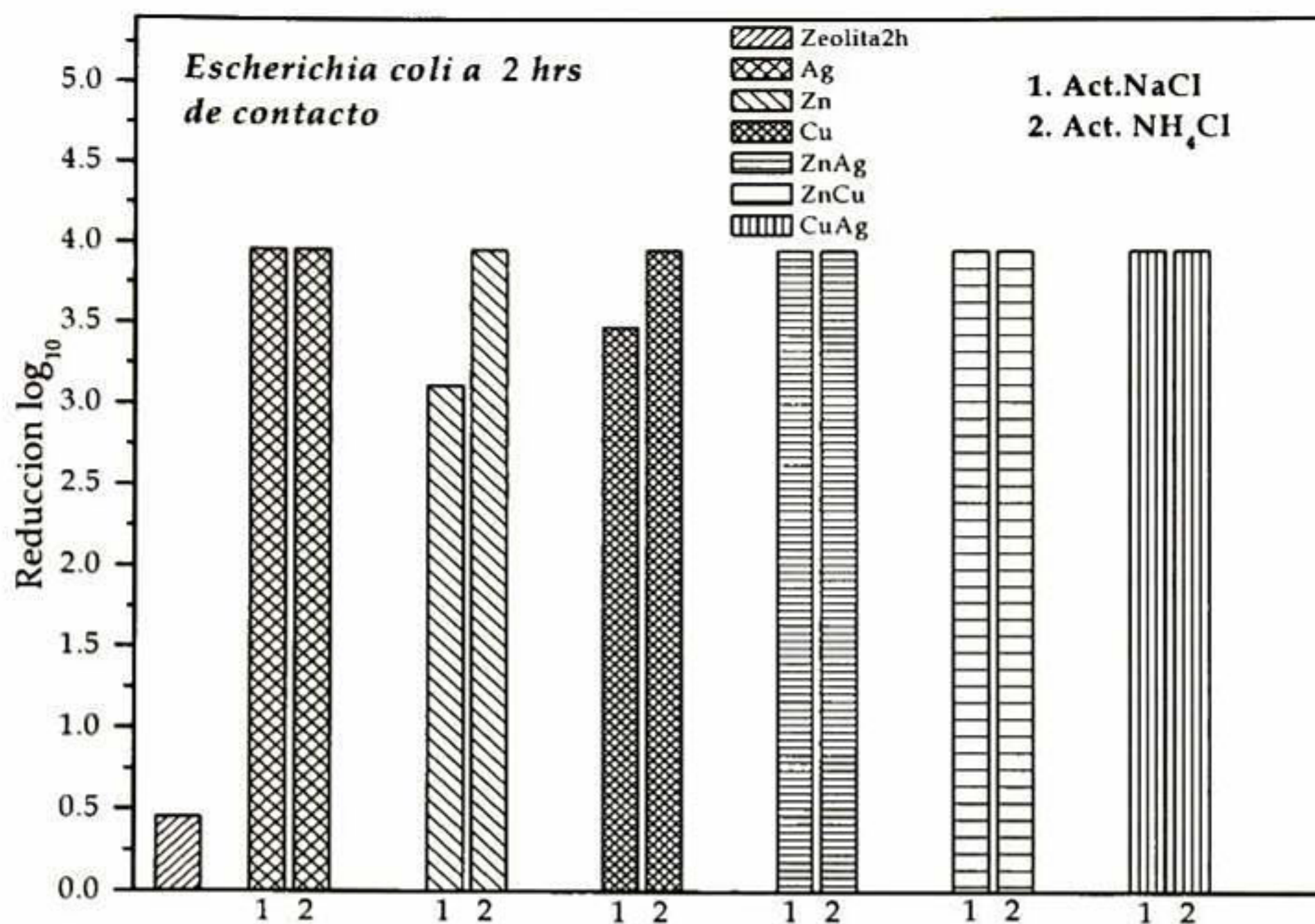


Fig. 6.4.1 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Escherichia coli* de zeolita natural alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos.

La figura 6.4.2 muestra los resultados del estudio realizado con *Escherichia coli* con una concentración inicial de $3.9 \log_{10}$ y sometida a 2 hrs. de contacto con las zeolitas sin activación. Las muestras con Zn y ZnCu logran una reducción logarítmica de aproximadamente 1.75 y 3.5 unidades respectivamente siendo que las demás muestras lograron una reducción total en 2 hrs. Nuevamente cuando *E. coli* permaneció durante 7 hrs. en contacto con la zeolita todas demostraron inhibición total sobre la bacteria. Y de nuevo la muestra de Zeolita pura logra una reducción logarítmica de 1.1 unidades debido tal vez, a que a la zeolita se adhieran un cierto numero de bacterias sin matarlas.

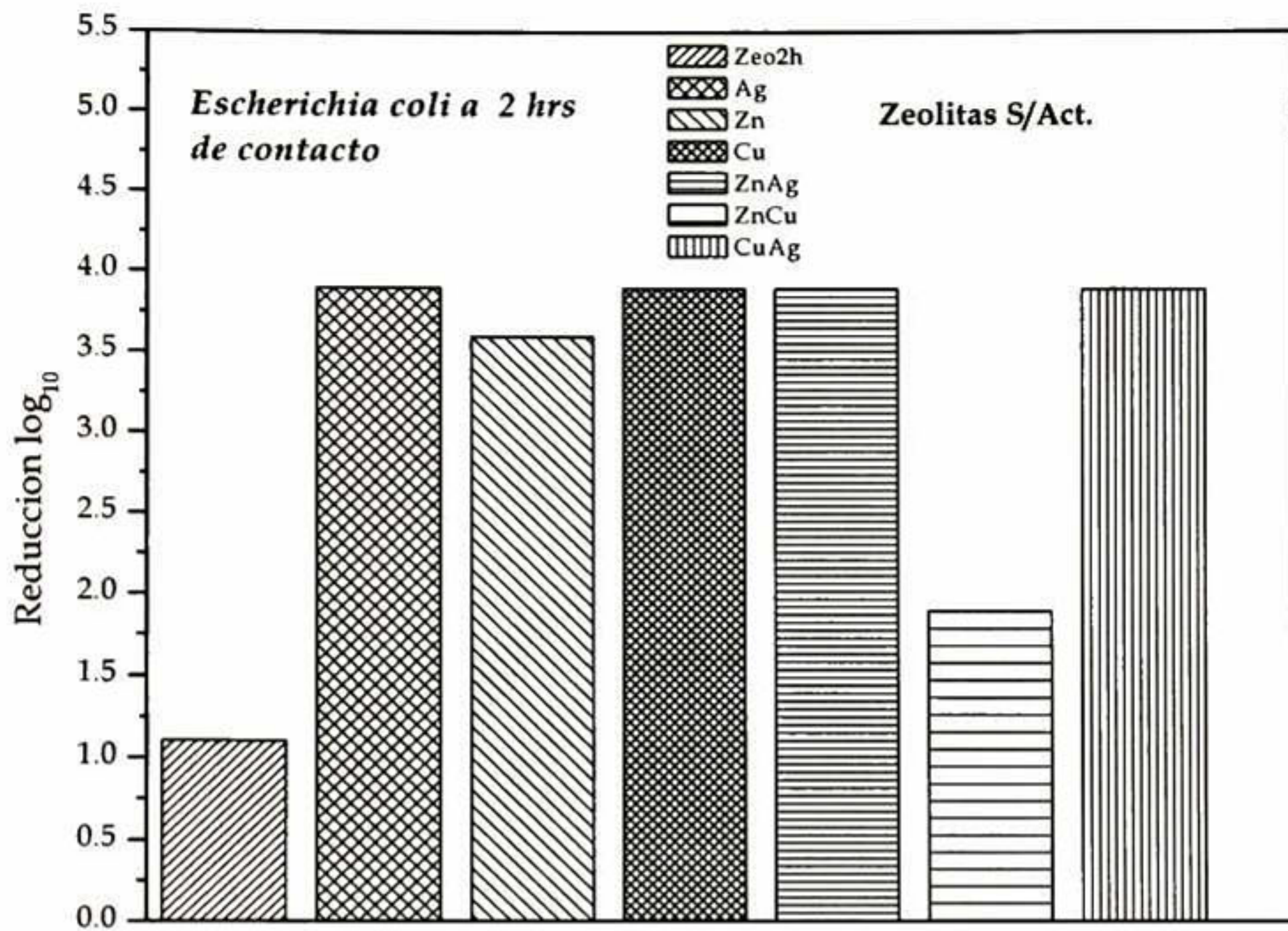


Fig. 6.4.2 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Escherichia coli* de zeolita natural alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos.

La figura 6.4.3 muestra los resultados del estudio realizado con *Listeria monocytogenes* con una concentración inicial de 4 \log_{10} , y sometida a 2 hrs. de contacto con las zeolitas. Las muestras que contienen Ag, Zn y ZnAg en las muestras activadas con NaCl y NH_4Cl , logran una reducción logarítmica aproximadamente entre 1 y 3.75 unidades, siendo que las demás muestras lograron una reducción total en 2 hrs. A las siete horas de contacto de la *Listeria m.* con las zeolitas, todas excepto el Zn con una inhibición de 3.25 y 3.75 unidades para la activada con NaCl y NH_4Cl demostraron inhibición total sobre esta bacteria.

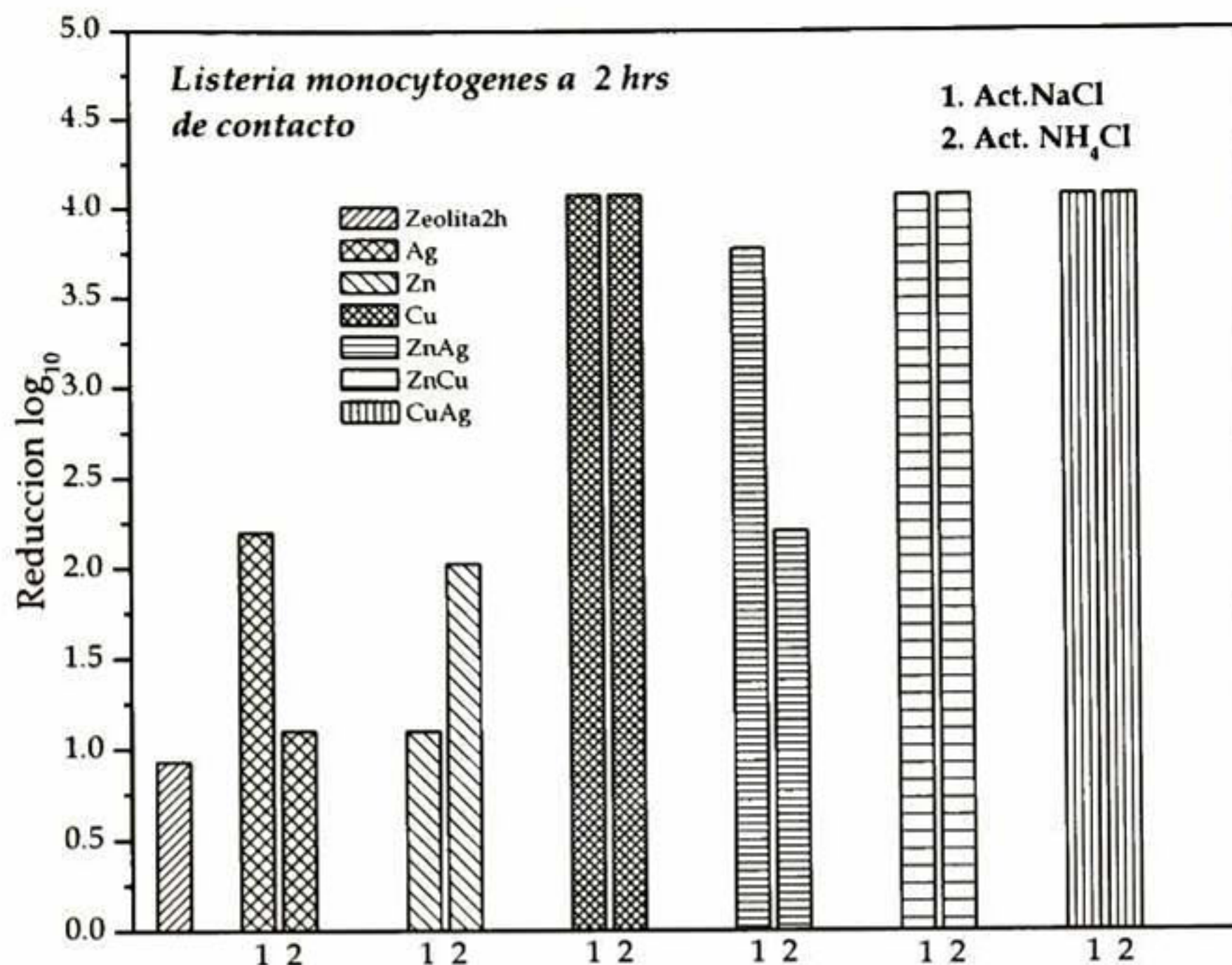


Fig. 6.4.3 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Listeria monocytogenes* de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos.

La figura 6.4.4 muestra los resultados del estudio de la bacteria *Listeria monocytogenes* a 2 hrs. con una concentración inicial de 4.3 log₁₀ de las muestras de zeolita sin activación las cuales mostraron una reducción logarítmica total. Logrando también una inhibición total a las siete hrs. Se hubiese esperado que las muestras sin activación tuvieran menos efectividad que las activadas por su menor porcentaje en peso de los iones intercambiados sin embargo sucedió lo contrario.

Observamos que los iones plata en combinación con los iones Zn o Ag aumentan su efectividad.

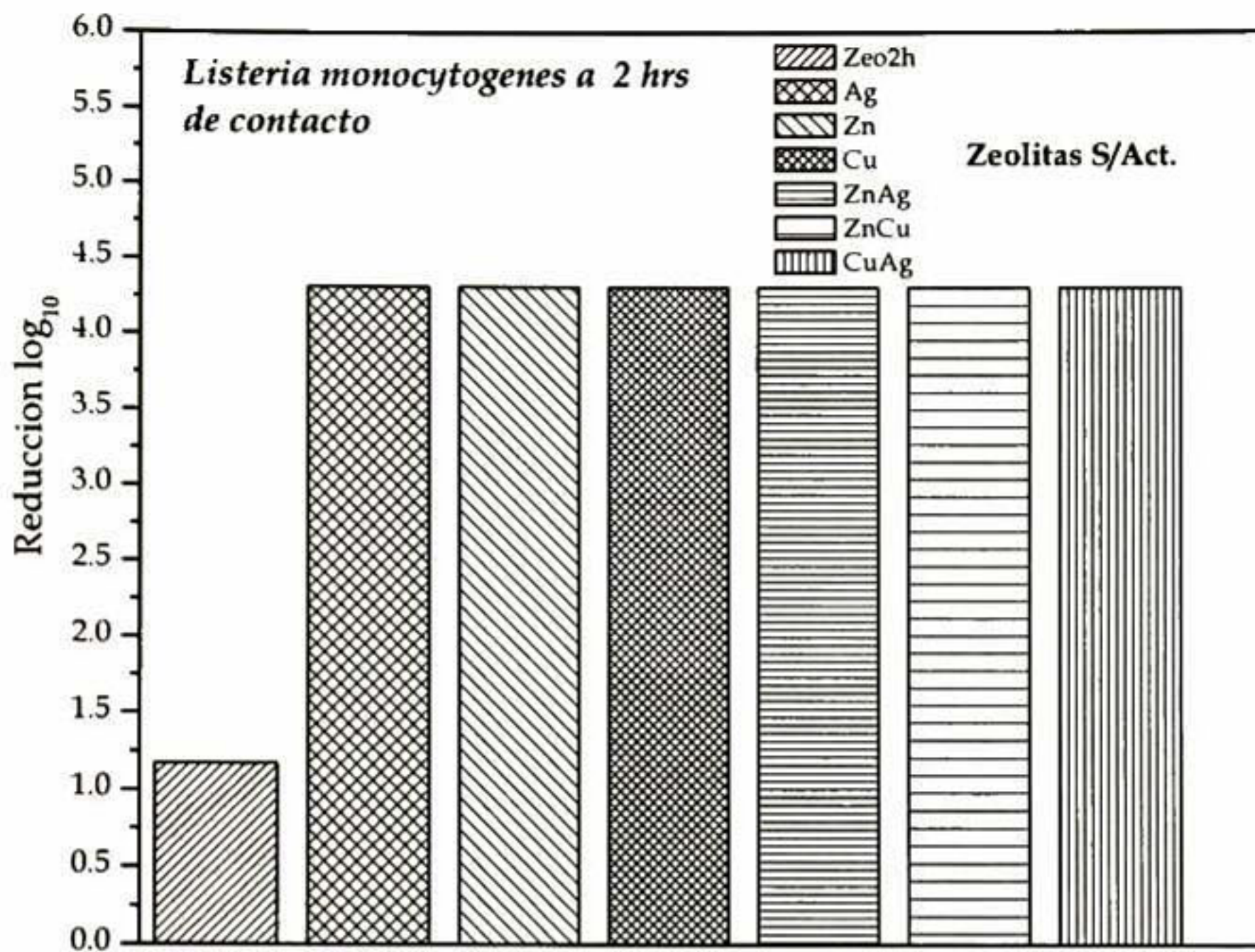


Fig. 6.4.4 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Listeria monocytogenes* de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos.

La figura 6.4.5 muestra los resultados del estudio realizado en un periodo de contacto de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* con una concentración inicial de $3.79 \log_{10}$. En todas estas muestras tanto las activadas con NaCl y NH_4Cl , se observa una reducción mínima de $1.6 \log_{10}$ y máxima de $3.25 \log_{10}$ siendo que la concentración inicial fué de $3.8 \log_{10}$ aproximadamente por lo que solo 3 de ellas logran una inhibición total de esta de bacteria en 2 hrs. de contacto. A las siete hrs. de contacto las muestras mostraron inhibición total sobre *Pseudomona aeruginosa* excepto el ZnAg con una reducción logarítmica aproximadamente de $3 \log_{10}$ activada con NH_4Cl pareciendo así que estos iones aun combinados no presentaron una acción total antibacteriana. En el caso de la Ag, esto probablemente pueda deberse a que durante todo el tratamiento de la muestra la Ag haya sufrido una degradación por la luz inherente.

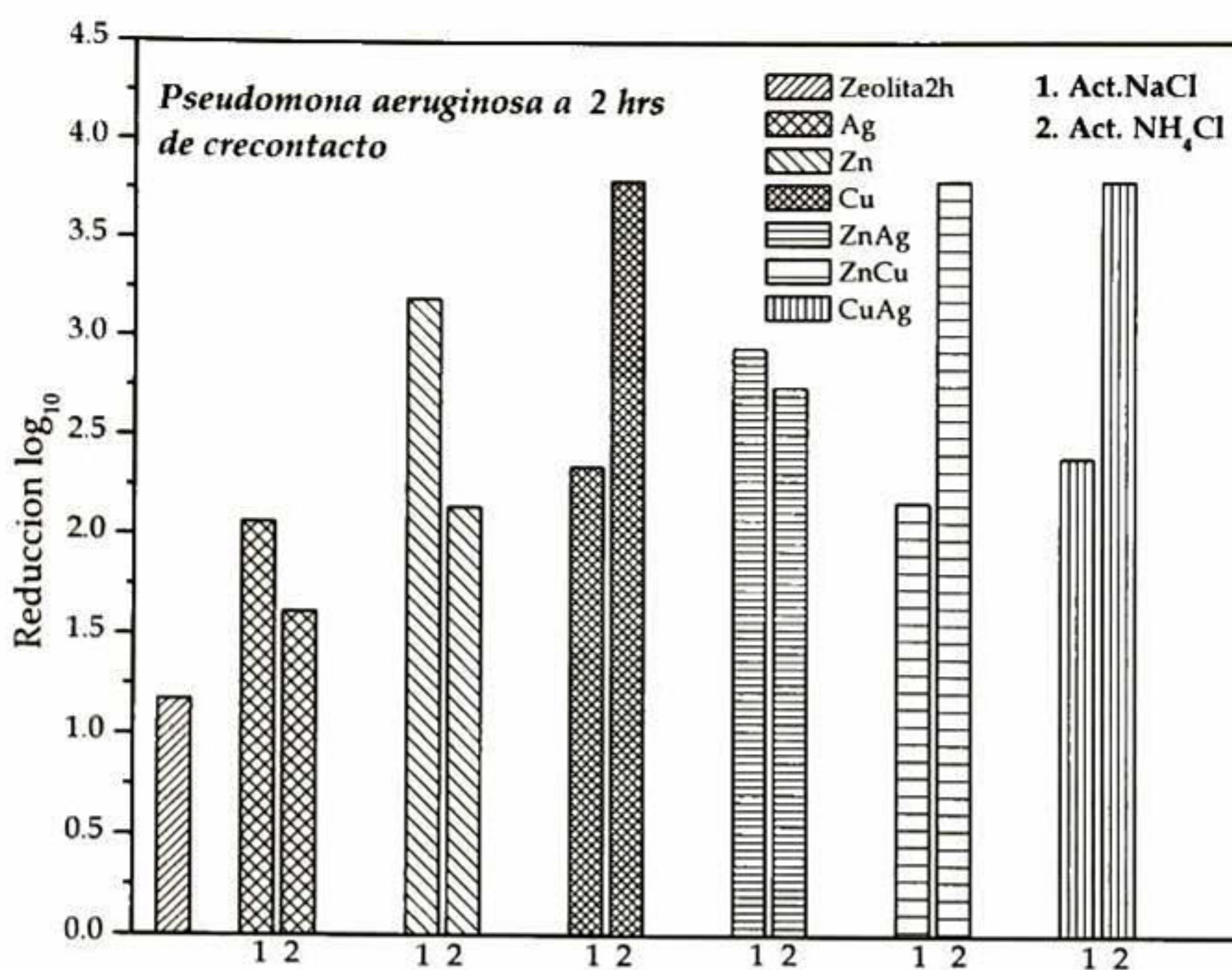


Fig. 6.4.5 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos

La figura 6.4.6 muestra los resultados del estudio a 2 hrs. de contacto de las muestras de zeolita sin activación. La Ag con una reducción logarítmica de 1.75, Zn 2.4 y Cu 2.75 no mostraron una efectividad antibacteriana total contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración inicial de 3.72 log₁₀ lo cual nos indica que los iones por separado no son completamente eficientes contra ella. Sin embargo al igual que las muestras activadas, esta serie logró la inhibición total a las siete hrs. de contacto.

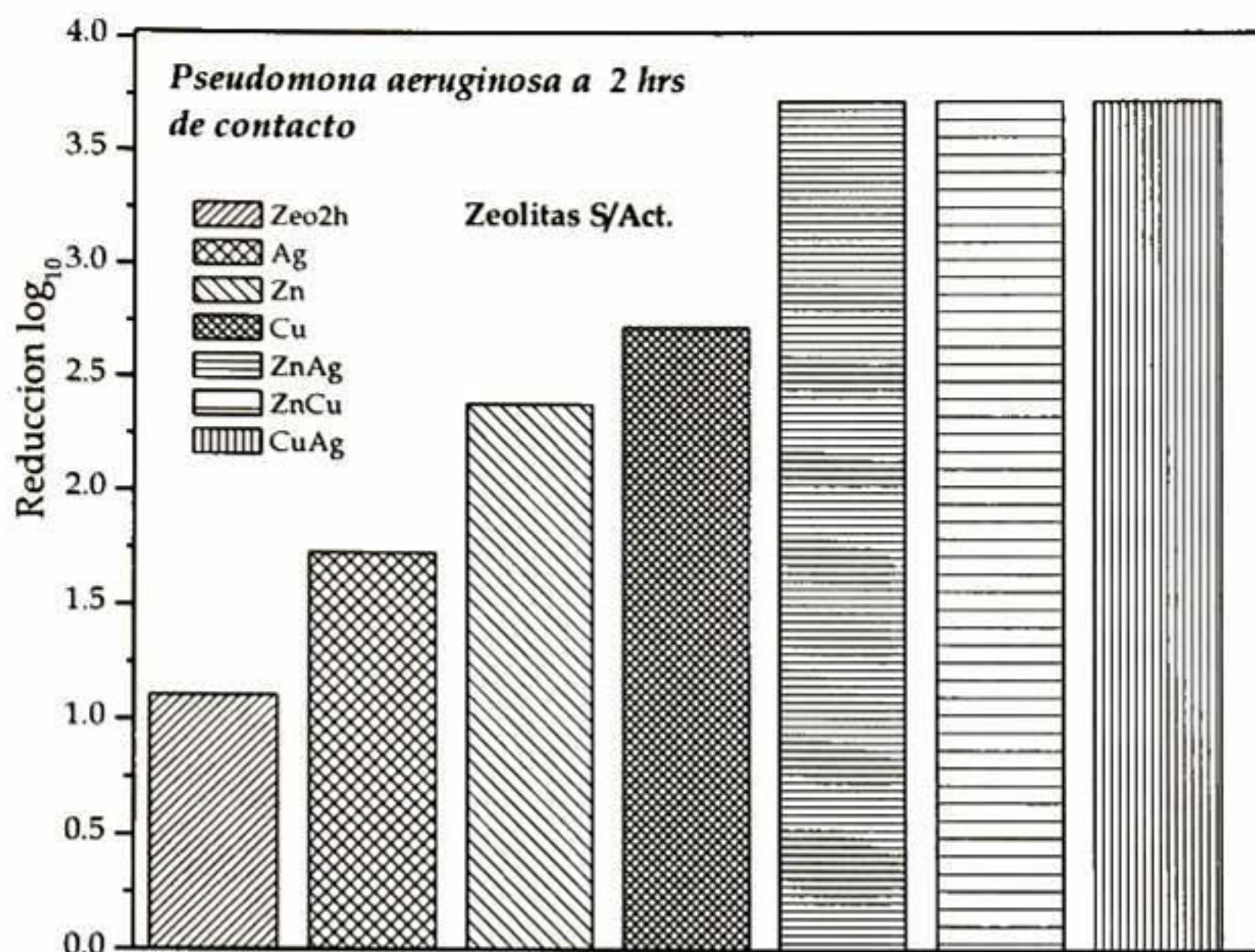


Fig. 6.4.6 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de zeolita natural sin activar alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos

La figura 6.4.7 muestra los resultados del estudio realizado en un periodo de 2 hrs., de la bacteria *Staphylococcus Aureus* con una concentración inicial de 4 \log_{10} . Como se puede observar la muestra de Ag no demostró una efectividad antibacteriana total pero si logró una reducción logarítmica de 3.75 y 3.5 unidades en la activación NaCl y NH_4Cl respectivamente. Al igual que ésta, la muestra de zeolita con Zn y Cu activada con NaCl no logró una efectividad antibacteriana total pero una reducción logarítmica de aproximadamente 3.75 \log_{10} para esta bacteria a 2 hrs. de contacto. A las siete horas de contacto todas las muestras mostraron inhibición total sobre la bacteria.

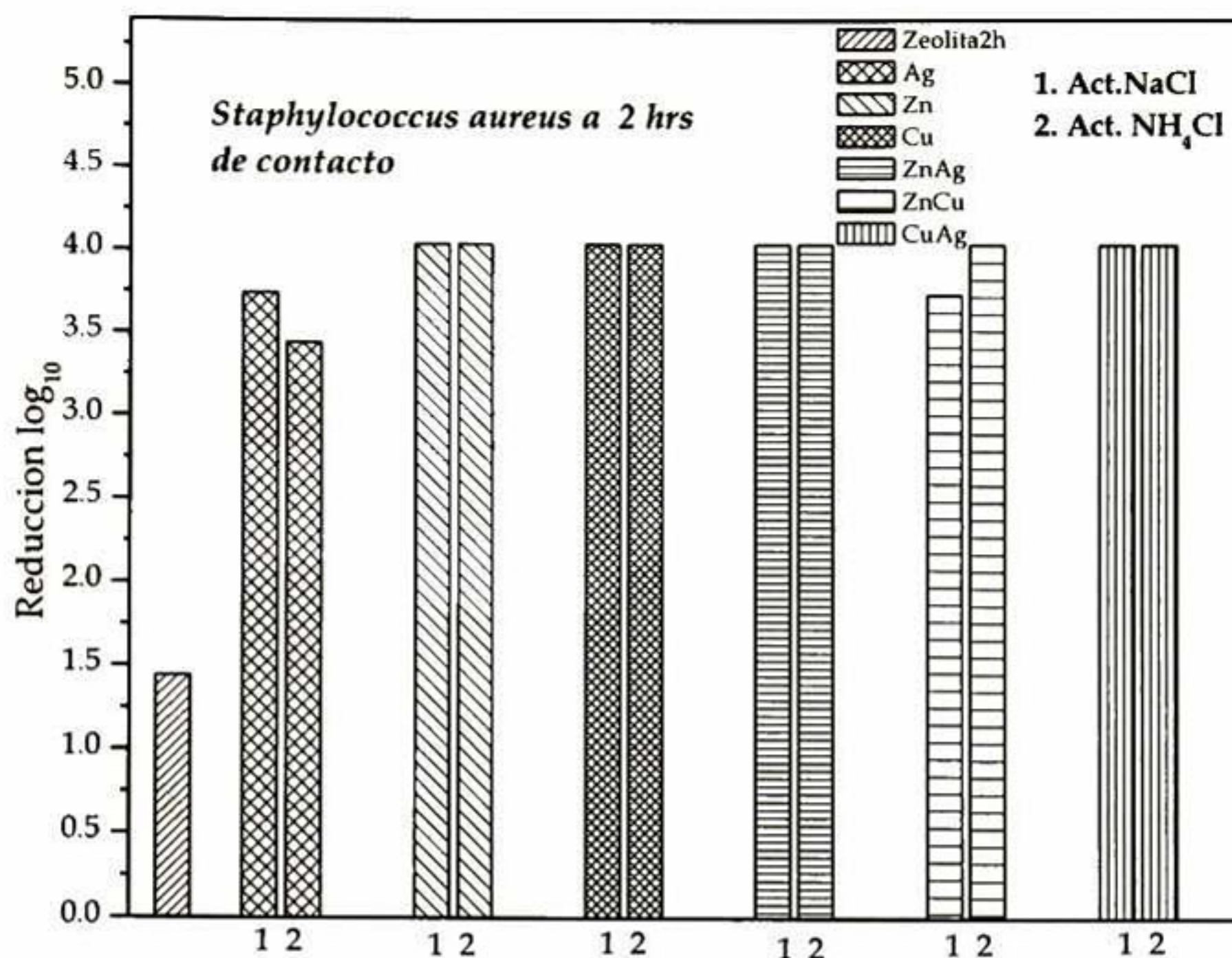


Fig. 6.4.7 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* de zeolita natural activada alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos

La figura 6.4.8 muestra los resultados del estudio con *Staphylococcus aureus* con una concentración inicial de 4.31 log₁₀ y sometida a 2 hrs de contacto con las muestras de zeolitas. Las muestras de zeolita sin activación con Ag muestran una reducción logarítmica aproximada de 2.25, Zn 1.75 y ZnAg 3.75 unidades aproximadamente, mostrando una efectividad antibacteriana incompleta, sin embargo, logran inhibir cierta cantidad de bacterias en 2 hrs. de contacto. A las 7 hrs. de contacto de *Staphylococcus aureus* con Zn su reducción logarítmica solo aumento 0.55 unidades aproximadamente, sin embargo todas las demás demostraron inhibición total sobre la bacteria a las 7 hrs. de contacto.

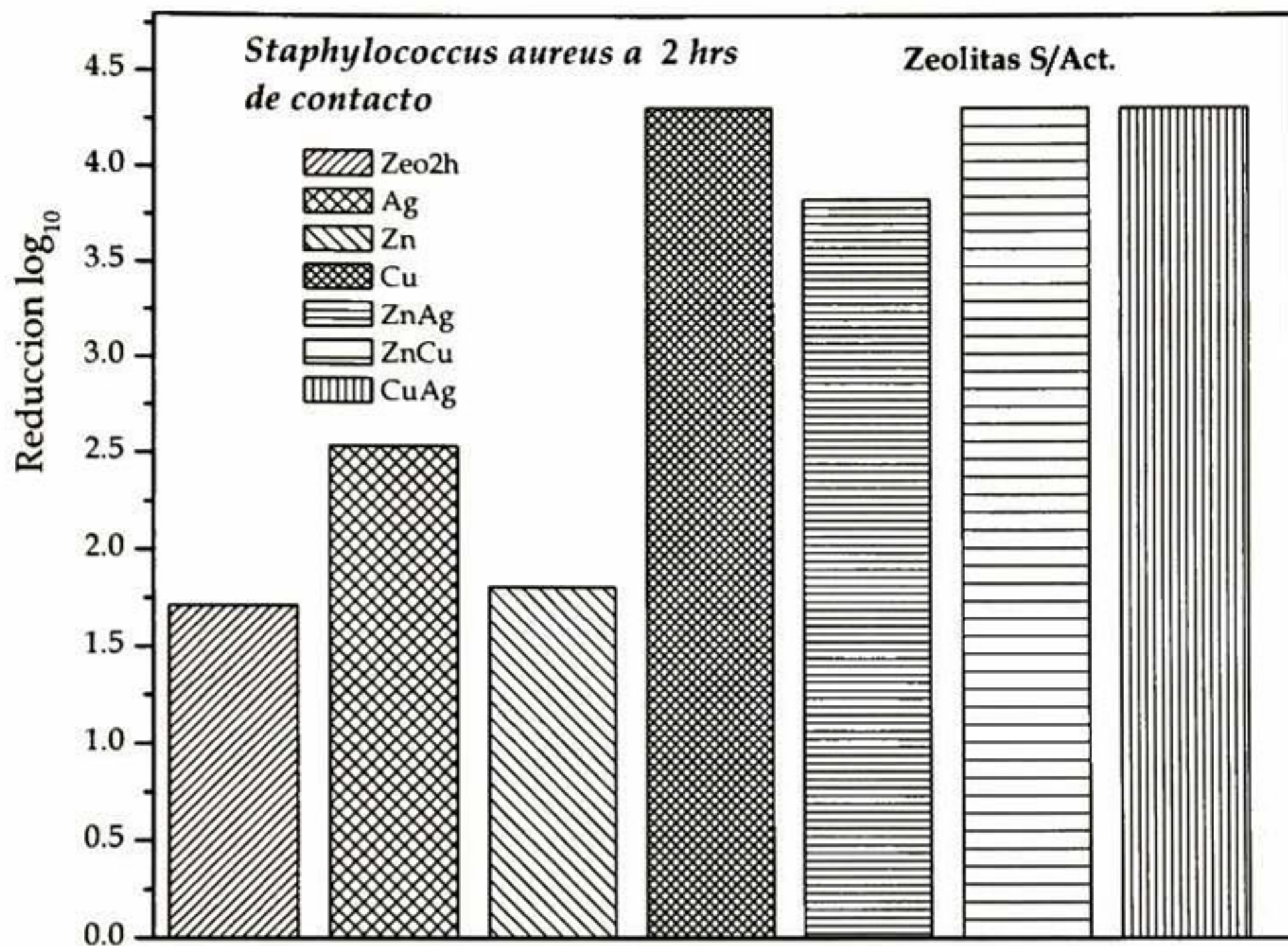


Fig. 6.4.8 Actividad inhibitoria sobre la bacteria *Staphylococcus Aureus* de zeolita natural sin activar alojando en sus cavidades a diferentes iones metálicos

CONCLUSIONES

- ✓ El primero de nuestros objetivos fué determinar la composición química y estructural de la zeolita natural con lo cual pudimos observar el porcentaje en peso de sus iones naturales, la morfología que ésta tiene, además de identificar sus picos principales de difracción correspondientes a sus planos cristalinos, y así teniendo estos datos como referencia en los resultados experimentales de las muestras de zeolita modificada.
- ✓ Con el proceso de activación ya establecido logramos reducir el porcentaje de iones que posee la zeolita por naturaleza, principalmente el Ca y Mg, utilizando las sales de Sodio y Amonio y diferentes tratamientos con menor cantidad de agua permitiendo optimizar tiempo, principalmente costos.
- ✓ Se observo que no hubo deformación en de la red cristalina, como consecuencia del proceso de activación.
- ✓ En cuanto el segundo objetivo se logró obtener zeolita alojando en sus cavidades iones de Ag, Cu y Zn en un porcentaje mayor al reportado, evitando la formación de compuestos ajenos a nuestros propósitos.
De los iones metálicos introducidos en la zeolita, al observar concluimos que:
 - a) En la superficie de los cristales de zeolita modificada se nota una ligera rugosidad.
 - b) Se conserva la alta calidad de la forma cristalina laminar
 - c) El promedio del tamaño de partícula se mantiene
- ✓ El tercer objetivo fué la determinación de propiedades antibacterianas de las muestras de zeolita modificada contra las bacterias *Escherichia Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona Aeruginosa* y *Staphylococcus Aureus*, en el cual se concluyó lo siguiente:

-
1. En un periodo de 2 hrs. de contacto los iones metálicos en las muestras de zeolita activadas y no activadas que demostraron tener una efectividad antibacteriana total es la combinación de Cu y Ag, ya que por si solos no logran una efectividad total.
 2. En un periodo de 7 hrs. de contacto los iones y la combinación entre ellos demostraron tener una efectividad antibacteriana total, sin embargo el Zn y su combinación con Ag no obtuvieron una efectividad total, los cuales no se recomiendan para utilizarse como un material bactericida.

VI.1 TRABAJO FUTURO

- La tarea de optimizar costo y tiempo en los procesos tanto de activación como de intercambio iónico con los iones metálicos Ag, Cu y Zn, ya que existe un interés por parte de algunas empresas.
- Integrar la zeolita modificada a una solución de fácil aplicación como pintura bactericida con probable aplicación en mobiliario e inmuebles de hospitales, y departamentos de tiendas de autoservicio en donde se venden consumibles perecederos.

BIBLIOGRAFIA

1. Ochoa Landin R., Tesis Maestría "Zeolita A4 como anfitrión de Nanopartículas de CdS" Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N Unidad Querétaro 7-14 (2003).
2. Curbelo Sánchez A., Bucki Wasserman B., Mollineda Trujillo A., Rodríguez Díaz J. M., Prieto García J.O., Villegas Aguilar P.J., *Zeolita Sódica Como Intercambiador de Iones Plomo*. Centro de Estudios de Energía y Tecnología de CUBA 01.83 (2004)
3. Flores Acosta M., Tesis Doctoral "Nanopartículas de PbS en Zeolitas A4, F9NaX, FYNH₄ y Ag¹⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ en Clinoptilolita". Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N Unidad Querétaro 1,8,15,18,22,23-29,68, 73, 74 (2005).
4. Chang R. *Química Séptima Ed.* Mc. Graw Hill Editores. 301(2002)
5. Pagina web
http://www.fisicanet.com.ar/quimica/q1ap04/apq1_19c_Zeolita.html
6. Pagina web
<http://www.buap.mx/investigacion/zeolitas/aplicaciones>
7. Pagina web
<http://members.aol.com/vbetz/trading/newtrade.html>
8. Rodríguez Fuentes G. et. al *Eliminación de Metales Tóxicos mediante Zeolitas Naturales* Universidad de La Habana CUBA 225 (2002) .
9. Rodríguez-Fuentes, G. et. al, *Pharmacological action of modified natural clinoptilolite*, 5th Int. Conf. on Natural Zeolites Book of Extended Abstracts, Naples, Italy (1997).
10. Rivera-Garza M., Olguín M.T., García-Sosa I, Alcántara D., Rodríguez-Fuentes G., *Silver supported on natural Mexican zeolita as an antibacterial material*. *Microporous and Mesoporous Materials* 39(2000) 431-444, México D.F (2000).

-
11. R. Bright K., C. P. Gerba and P. A. Rusin, *Rapid reduction of Staphylococcus Aureus populations on stainless steel surfaces by zeolite ceramic coatings containing silver and zinc ions*. *Journal of Hospital Infection* 52: 307±309. (2002)
 12. Top A., Ülkü S. *Silver, zinc and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity* Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, İzmir Institute of Technology, Gülbahçe Köyü, Urla, İzmir, Turkey 13-19 (2004)
 13. Japanese Industrial Standard, *Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy*, date of establishment: (2000-12-20), date of Public notice in Official Gazzette: (2000-12-20), Investigated by: Japanese Industrial Standards committee Divisional Council on Consumer Life..
 14. Montealegre A. Jaime R., *Cátedra de Microbiología General* Depto. de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (2002).
 15. Altord, Wiere and Gunter S.J. *Bact. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Límites Microbianos. Sexta Edición* 190 (1994).
 16. Fernández E.E. *Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos*. Ed. Universidad de Guadalajara. México (1981).
 17. Fernández E.E. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro, México (2000).

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DE LA C. DIANA RUIZ SERRANO, TITULADA: "INTERCAMBIO IONICO Ag, Cu Y Zn EN CLINOPTILOLITA PARA APLICACIONES BACTERICIDAS", FIRMAN AL CALCE DE COMÚN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS DIECINUEVE DIAS DEL MES DE SEPTIEMBRE DEL DOS MIL CINCO.

DR. RAFAEL RAMIREZ BON

DR. JUAN MUÑOZ SALDAÑA

DR. YURI V. VOROBIEV

DR. JAVIER CASTRO ROSAS



CINVESTAV
BIBLIOTECA CENTRAL



SSIT000008239