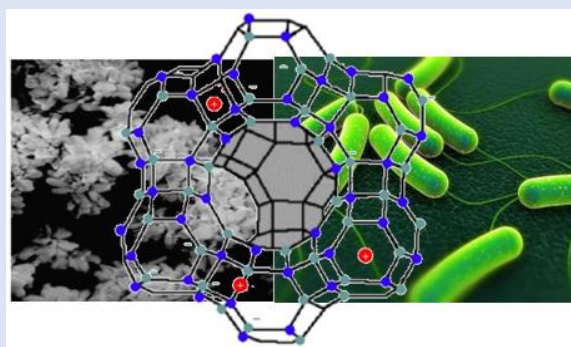


SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ZEOLITAS TIPO CANCRINITAS MODIFICADAS CON Ag CONTRA BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS (*Escherichia coli*, *Shigella spp* Y *Salmonella spp*)

Perera Agdalis¹, Montilla Gerardith¹, Medina Milagro¹, Rondón Celia¹, Álvarez Ruth¹, Linares Carlos², Mobili Davide³

1: Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Ciencias Biomédicas. Departamento de Bioquímica. Universidad de Carabobo. 2: Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Departamento de Química. Universidad de Carabobo. 3: Universidad Arturo Michelena. Departamento de Bioquímica.

email: ralvarez1982@gmail.com



RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales, ocasionadas por bacterias enteropatógenas tales como: *Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Salmonella spp*, pueden producir diarrea aguda inflamatoria o disintérica, que se caracteriza por la presencia de evacuaciones frecuentes con sangre y moco, acompañado de síntomas como fiebre, dolor abdominal y tenesmo rectal. Por otra parte, la zeolita tipo cancrinita es una red abierta que permite el intercambio de especies catiónicas que pueden tener efecto farmacológico. En el presente trabajo, se sintetizó una zeolita tipo cancrinita bajo la mezcla aniónica nitrato/carbonato usando como fuente de silicio y aluminio zeolita X comercial a 80°C, 24 h de cristalización y presión autógena. Posteriormente, esta zeolita fue intercambiada con Ag en condiciones anaeróbicas y bajo reflujo. Las zeolitas fueron caracterizadas por las técnicas de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (DRX). Finalmente, el efecto antibacteriano de la cancrinita modificada se ensayó en una población de bacterias enteropatógenas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, eligiéndose como muestras *Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Salmonella spp*. Los ensayos se realizaron en presencia de caldo Mueller-Hinton suplementado con cantidades variables (1,0-5,0) mg de la cancrinita intercambiada con Ag a 37 °C durante un período de 24 h de incubación. Un sistema con cancrinita sódica-nitrada fue incubado como control positivo de crecimiento. Los resultados indicaron que este sólido con Ag es capaz de ejercer un efecto bactericida frente a *Escherichia coli* y bacteriostático ante *Shigella spp.*, y *Salmonella spp*.

Palabras Claves: zeolita, cancrinita, bacteria, bacteriostático, Ag.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CANCRINITE-TYPE ZEOLITES MODIFIED WITH Ag AGAINST ENTEROPATHOGENIC BACTERIAS (*Escherichia coli*, *Shigella spp* and *Salmonella spp*)

ABSTRACT

Gastrointestinal infections, caused by enteropathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Shigella spp* and *Salmonella spp*, can produce acute inflammatory or dysenteric diarrhea, characterized by the presence of frequent stools with blood and mucus, accompanied by symptoms such as fever, abdominal pain and rectal tenesmus. On the other hand, cancrinite type zeolite is an open network that allows the exchange of cationic species that can have a pharmacological effect. In the present work, a cancrinite-type zeolite was synthesized under the nitrate / carbonate anionic mixture using commercial zeolite X at 80 °C, silicon and aluminum, 24 hours of crystallization and autogenous pressure. Subsequently, this zeolite was exchanged with Ag under anaerobic conditions and under reflux. The zeolites were characterized by the techniques of infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). Finally, the antibacterial effect of the modified cancrinite was tested in a population of enteropathogenic bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae*, with *Escherichia coli*, *Shigella spp* and *Salmonella spp* being chosen as samples. The tests were carried out in the presence of Mueller-Hinton broth supplemented with variable amounts (1.0-5.0) mg of the cancrinite exchanged with Ag at 37 °C during a period of 24 h of incubation. A system with sodium-nitrated cancrinite was incubated as a positive growth control. The results indicated that this solid with Ag is able to exert a bactericidal effect against *Escherichia coli* and bacteriostatic against *Shigella spp.*, And *Salmonella spp*.

Keywords: ceramic zeolite, cancrinite, bacterium, bacteriostatic, silver.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte en niños menores de cinco años capaces de provocar el descenso de 525 000 niños cada año. A pesar de lo mortal de esta enfermedad, ella es prevenible y tratable [1]. Estas infecciones gastrointestinales pueden ser ocasionadas por bacterias enteropatógenas tales como: *Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Salmonella spp*, produciendo diarreas agudas inflamatorias o disentericas, que se caracterizan por la presencia de evacuaciones frecuentes con sangre y moco, acompañada de síntomas como fiebre, dolor abdominal y tenesmo rectal [2].

Por su parte, la zeolita tipo cancrinita es un mineral que funciona como tamiz molecular permitiendo el intercambio iónico y reversibilidad de deshidratación [3], esta propiedad zeolítica determina y justifica la recuperación del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base en su estructura. La cancrinita, puede actuar como protector de la mucosa gastroentérica, al neutralizar los desequilibrios del medio interno mejorando la respuesta inmunológica del paciente [3]. Estas zeolitas logran el intercambio con cationes como la plata (Ag^+), haciéndola atractiva para ser empleada como agente antibacteriano [4,5]. Las partículas de plata coloidal dañan las paredes celulares y las membranas de las bacterias patógenas, inhibiendo la actividad enzimática y la replicación bacteriana. Asimismo, la plata coloidal para los humanos, tiene una toxicidad prácticamente nula, no destruye la flora intestinal benéfica y fortalece el sistema de defensa del organismo ante agentes infecciosos, ya que incrementa el número de glóbulos blancos [4].

Brikgi M. et al [5] sintetizó zeolitas tipo cancrinita intercambiadas con Cu^{2+} a fin de evaluar el efecto antibacteriano en una población heterogénea proveniente del suelo. Los resultados indicaron que este sólido es capaz de inducir un efecto bacteriostático en los primeros tiempos de reacción. Por su parte, López, E. [7] estudió la posible eliminación de *Salmonella* en agua potable y de riego, usando plata iónica soportada en materiales mesoporosos. Los resultados demostraron la efectividad bactericida contra *Salmonella typhi* reduciéndola significativamente o completamente eliminada a pocos tiempos de contacto. Asimismo, Ocanto, F. [6], evaluó el efecto antimicrobiano de una zeolita A y una zeolita tipo cancrinita nitrada

intercambiada con cationes plata, cobre y una mezcla de estos dos metales. La acción microbicida se probó ante *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados demostraron que estos sólidos intercambiados con Ag y Ag/Cu presentaron acción bactericida, siendo los iones plata los que arrojaron la mejor actividad bactericida ante los microorganismos estudiados. En tanto, el cobre actuó como oligoelemento [6].

Bajo esta serie de argumentos y propiedades, la finalidad del presente estudio fue sintetizar zeolitas cancrinitas intercambiadas con Ag para demostrar su efectividad frente a diferentes bacterias enteropatógenas (*Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Salmonella spp*).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis de la zeolita cancrinita sódica nitrada

La zeolita tipo cancrinita sódica nitrada fue sintetizada empleando 0,5 g zeolita X (Linde Division of Union Carbide) ($\text{Si}/\text{Al} = 1,3$) como fuente de Si y Al, y 0,6 mL de una solución de NaNO_3 (Seelze-Hannover) e NaOH (Scharlau SO0425) 1,33 y 4,63 M respectivamente. La zeolita impregnada fue colocada en un recipiente de teflón sin agitación a presión autógena y en un horno de convección a 80°C por 27 h. Después de ese tiempo, la zeolita cancrinita fue lavada con abundante agua destilada hasta llegar a $\text{pH}=7$ [5, 8-9].

2.2 Intercambio catiónico de la zeolita cancrinita

La zeolita cancrinita sintetizada fue intercambiada con una solución 0,02M de iones Ag^+ (AgNO_3), (99%p/p; Reagents Chemicals) usando un balón bajo de reflujo con una relación de 15 mL de la solución metálica/g de zeolita durante 3 horas y en ausencia de oxígeno. Culminado el intercambio, la zeolita fue lavada hasta obtener resultados negativos de los iones plata en las aguas de lavado. Finalmente, fue secada en estufa a 80°C por 18 horas. El sólido fue etiquetado como “CanAg” [5].

2.3 Caracterización de la zeolita

Una vez obtenida la zeolita cancrinita sódica-nitrada y la intercambiada con plata, se procedió a su caracterización mediante las técnicas instrumentales de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (DRX). En los análisis de FT-IR, la muestra se preparó

homogeneizando el sólido en KBr para formar una pastilla. Una vez obtenida la pastilla, se colocó en un espectrofotómetro de infrarrojo Shimadzu modelo FTIR-8400S con transformador de Fourier. La muestra se dejó correr entre 4000 y 400 cm^{-1} . Para la identificación de las fases cristalinas presentes en el sólido y los posibles cambios en el patrón de difracción de los sólidos modificados se utilizó la DRX por el método de polvo, colocando la zeolita finamente dividida en un portamuestra adecuado e irradiada por rayos X proveniente de un tubo de cobre. Para ello, se utilizó un difractómetro Phillips, operado en las siguientes condiciones: CuK (α) longitud de rayos X, λ : 1.5406 Å; voltaje: 30 kV; intensidad de corriente: 20mA; velocidad de goniómetro: 2° (20/ min.). Los difractogramas se tomaron entre 5° y 80° (2 θ) [8].

2.4 Evaluación microbiológica

Se utilizaron bacterias enteropatógenas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* eligiéndose como muestras *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella spp* y, *Salmonella spp*.

2.5 Efecto antibacteriano de las zeolitas cancrinitas intercambiadas con Ag

Para la preparación del caldo de infusión cerebro-corazón (caldo BHI), se suspendieron 37 g del medio de cultivo en polvo en un litro de agua destilada, se calentó a ebullición hasta disolverlo. Por su parte, para el agar de Muller-Hinton se suspendieron 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejándose embeber por 15 minutos, luego se calentó hasta ebullición con agitación frecuente por 1 minuto. Una vez preparados los medios de cultivos se distribuyeron en tubos de ensayos de vidrio y se procedió a su esterilización por autoclave a 121 °C por 20 minutos, dando como resultado la preparación de tres (3) medios de cultivos, dos (2) de cerebro-corazón y uno (1) de Muller Hinton [10].

Seguidamente, se procedió a inocular los microorganismos a 37 °C por 24 horas en caldo cerebro-corazón (caldo BHI) hasta alcanzar la turbidez del patrón de 0,5% Mc. Farland equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL [10].

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 5 μL de la suspensión bacteriana y se agregó en seis tubos de ensayo con 9995 μL de caldo Mueller-Hinton, para así obtener una dilución de 1/2000. Se pesaron diferentes cantidades de la zeolita modificada 1; 1.5;

2; 2.5; 3 y 5 mg, y se agregaron a los seis tubos de ensayo respectivamente. Las muestras se agitaron en sentido horizontal, luego de transcurrido el tiempo establecido se sacaron del agitador, se separó el sólido del líquido y se plaquearon en medio Mueller-Hinton, mediante la técnica de extensión, empleando una espátula de Drigalski, inoculando 50 μL directamente en la placa y extendiéndola con la espátula. Seguidamente las placas fueron incubadas en estufa a 37 °C por 24 h [10].

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para evaluar el efecto bactericida y bacteriostático de la zeolita CanAg, ante cepas de bacterias enteropatógenas *Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Salmonella spp*. Paralelamente, para evaluar la vialidad de la población bacteriana usada en este experimento, se estableció un sistema control constituido por medio de cultivo de zeolita cancrinita sódica-nitrada con inóculo bacteriano. Se usaron las mismas condiciones de incubación antes mencionada [5].

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Síntesis de la zeolita cancrinita nitrada a partir de la zeolita X

En la Figura 1, se muestran los FT-IR de la zeolita X de partida, y de las zeolitas cancrinita sódica-nitrada e intercambiada con cationes Ag. Para todas las muestras se observaron bandas comunes: la banda ancha alrededor de 3496 y 1640 cm^{-1} pueden ser asignadas a moléculas de aguas fisisorbidas en las zeolitas. La banda estrecha alrededor de 1426 cm^{-1} determinada en las cancrinitas intercambiadas con Ag, son signos inequívocos de aniones nitratos y carbonatos los cuales se encuentran ubicados en los canales de las zeolitas cancrinitas. Estos aniones suelen aparecer en la misma región de los espectros de FT-IR. Esta banda no es observada en la zeolita X ya que la misma no presenta este tipo de aniones. La serie de bandas ubicadas entre 700 y 400 cm^{-1} se corresponde con los enlaces Al-O-Si presentes tanto en las zeolitas X como en las zeolitas tipo cancrinita [5,11].

La ubicación e intensidad de estas bandas es característico de la “huella digital” de cada una de las zeolitas. Por lo tanto, se puede observar, que la forma de este grupo de bandas es diferente en la zeolita X en comparación con ese mismo grupo de bandas observadas en las zeolitas tipo cancrinita, esto da cuenta de la transformación de la zeolita X a

zeolita tipo cancrinita. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la cancrinita nitrada sódica y la intercambiada con iones plata. En general, el intercambio catiónico en zeolitas no afecta los espectros de infrarrojo, tal como es mencionado en la literatura [5,11].

Seguidamente, en la Figura 2, se muestra los patrones de DRX de la cancrinita nitrada y aquella intercambiada con Ag. Picos intensos a: 14,11; 19,05; 24,40; 27,65; 32,74 y 37,17 2θ son característicos de las zeolitas tipo cancrinita (PDF:

46-1332) [8,12]. Por otra parte, se observaron pocas fases adicionales a la previamente reportada, lo que da cuenta del oportuno intercambio catiónico, dichas fases corresponden a la zeolita X, sólido de partida. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre la cancrinita sódica-nitrada y la intercambiada con plata, lo cual implica que el proceso de intercambio catiónico no afecta la estructura de este sólido [11].

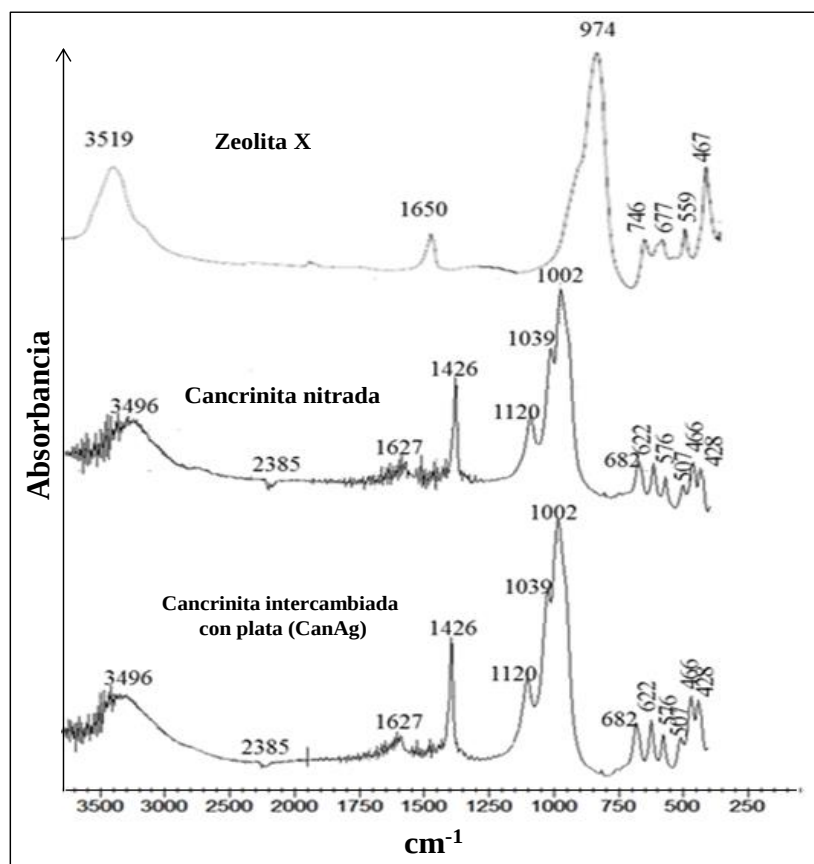


Figura 1. Espectros de IR de la zeolita X, cancrinita sódica-nitrada y (CanAg).

3.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de los sólidos obtenidos, ante cepas de bacterias enteropatógenas

Varios metales pesados, como la plata, pueden ser germicidas o antisépticos. Los cationes de plata son microbicidas a bajas concentraciones, y no tienen efectos colaterales importantes en los humanos [13]. La capacidad de cantidades muy pequeñas de Ag^+ , se conoce como acción oligodinámica [13]. La plata posee un fuerte campo electrostático, el cual origina

intensas interacciones con los átomos de azufre muy polarizables de los grupos tioles presentes en las enzimas, inactivándolas, y en menor cuantía, con algunos grupos del nitrógeno o del oxígeno presentes en las estructuras de las proteínas, lo cual induce a la precipitación de éstas y al rompimiento de las membranas celulares, conduciendo a la formación de compuestos irreversibles y a la desactivación de enzimas, generando consecuentemente la muerte del organismo. Este metal, también interacciona con la

pirimidina del ADN de las bacterias no permitiendo la duplicación del mismo [7]. Además, las bajas concentraciones de plata no entran en la célula, y estos iones de plata inmovilizan la deshidrogenación,

porque la respiración ocurre a través de membranas celulares en las bacterias y no en la membrana mitocondrial como en las células eucariotas [7].

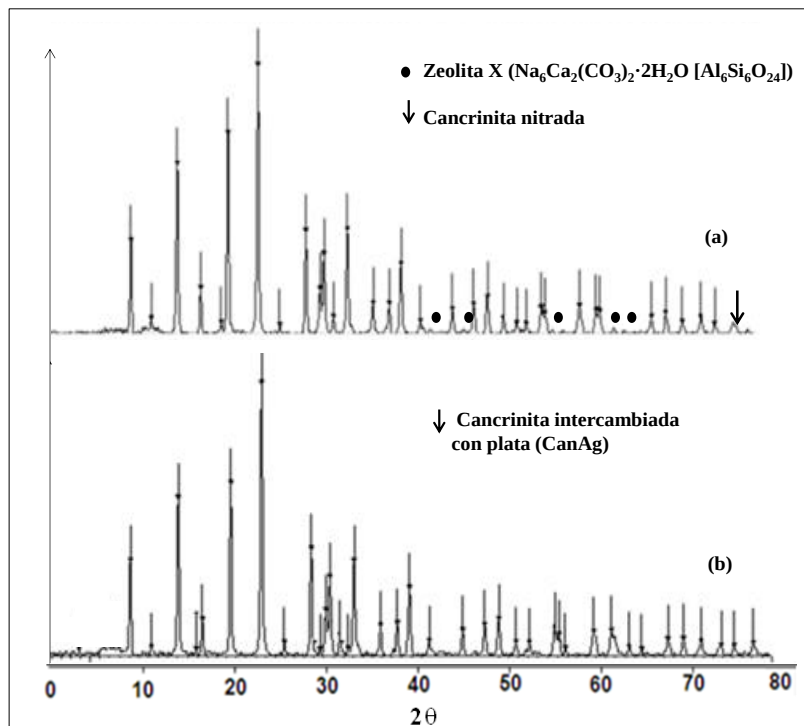


Figura 2. DRX de la cancrinita sódica-nitrada (a) y CanAg. (b).

En cuanto al caso específico de la CanAg, el metal se intercambia de la matriz zeolítica hacia el microorganismo. Se forman especies oxigenadas reactivas en el interior de la zeolita las cuales luego salen de ellas, y el oxígeno disuelto en el medio es necesario para formar las especies con actividad bactericida [5,15]. Se ha establecido que el mecanismo de acción fundamental de este microbicida zeolítico es el intercambio iónico de la Ag^+ por los iones Na^+ generalmente presentes en el medio biológico [5,15].

Por lo antes expuesto, un suministro constante de plata, garantiza una toxicidad letal para *Escherichia coli*. En la Figura 3, puede apreciarse que la zeolita CanAg disminuye considerablemente la población bacteriana, alcanzando su eliminación por completo con una concentración de 5 mg, en este sentido se encontró que los iones plata presentan una fuerte acción bactericida ante *Escherichia coli* a bajas concentraciones del catión [5].

En el caso de *Salmonella spp*, bacteria aerobia y

anaerobia facultativa, no se observó el efecto bactericida reportado por López [7], debido principalmente a que la concentración de plata empleada en el sólido zeolítico juega un papel esencial en las propiedades biocidas del mismo y posiblemente por la presencia de genes plasmídicos como SilP, el cual es un ATPasa de membrana del tipo P que bombea Ag^+ desde la célula y es muy similar a las ATPasas de eflujo de Cu^+ y de Cd^{2+} [13]. Sin embargo, en la Figura 4, se observó una disminución de la población bacteriana, pudiéndose catalogar el efecto de la zeolita CanAg como bacteriostático, ya que las UFC son incontables tanto para el control como para los sólidos estudiados en el mismo tiempo establecido.

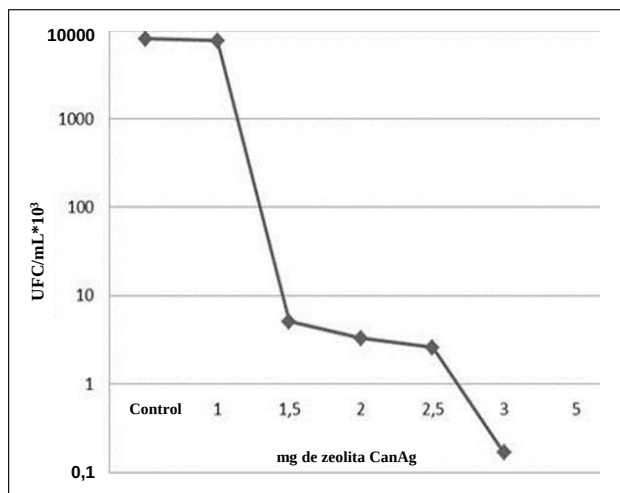


Figura 3. Efecto antimicrobiano de la CanAg frente a *Escherichia coli*.

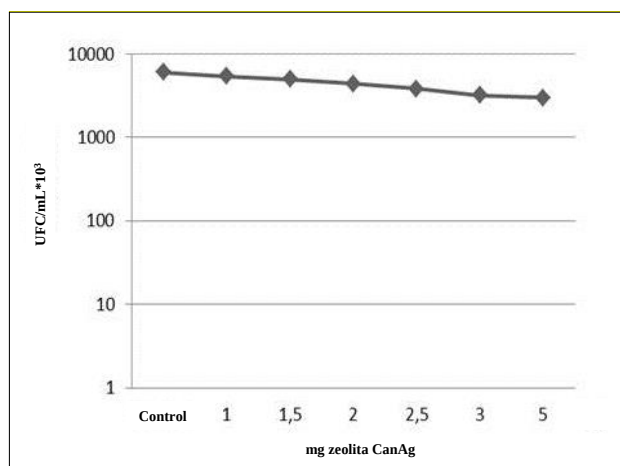


Figura 4. Efecto antimicrobiano de la CanAg frente a *Salmonella spp.*

Al igual que el microorganismo anterior, la CanAg ejerció un efecto bacteriostático frente a *Shigella spp.* Según estudios, ésta tiene la capacidad de producir membranas proteicas que expelen los antibióticos de la célula y alteran el sitio blanco del mismo, pudiendo ejercer, de esta forma, resistencia ante los iones plata [14,15]. En la Figura 5, puede apreciarse que las UFC iniciales son incontables, pero a medida que se aumenta la concentración de la CanAg éstas van disminuyendo considerablemente, sin embargo, no ejerce un efecto letal frente a este microorganismo.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del sólido zeolítico ante cepas de bacterias enteropatógenas. Este resultado indica que la plata ejerce una fuerte acción

bactericida frente a *Escherichia coli*, y una acción bacteriostática frente a *Salmonella spp* y *Shigella spp*, representando su efecto esquemáticamente en la Figura 6.

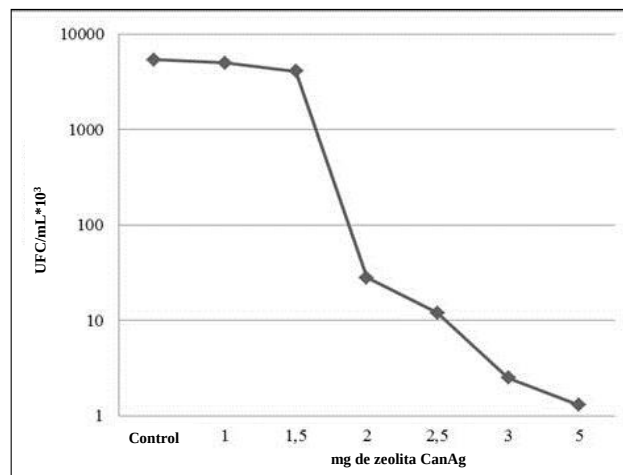


Figura 5. Efecto antimicrobiano de la CanAg frente a *Shigella spp.*

Tabla 1. Efecto antimicrobiano de los sólidos zeolíticos ante cepas de bacterias enteropatógenas.

Bacterias	mg del sólido	UFC/mL (24h)
<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	Control	$8,0 \times 10^6$
	1	$7,6 \times 10^6$
	1,5	$5,1 \times 10^3$
	2	$3,3 \times 10^3$
	2,5	$2,6 \times 10^3$
	3	1680
	5	0
<i>Salmonella spp.</i>	Control	$6,0 \times 10^6$
	1	$5,4 \times 10^6$
	1,5	$5,0 \times 10^6$
	2	$4,4 \times 10^6$
	2,5	$3,8 \times 10^6$
	3	$3,2 \times 10^6$
	5	$3,0 \times 10^6$
<i>Shigella spp.</i>	Control	$5,4 \times 10^6$
	1	$5,0 \times 10^6$
	1,5	$4,1 \times 10^6$
	2	$2,8 \times 10^4$
	2,5	$1,2 \times 10^4$
	3	$2,5 \times 10^3$
	5	$1,3 \times 10^3$

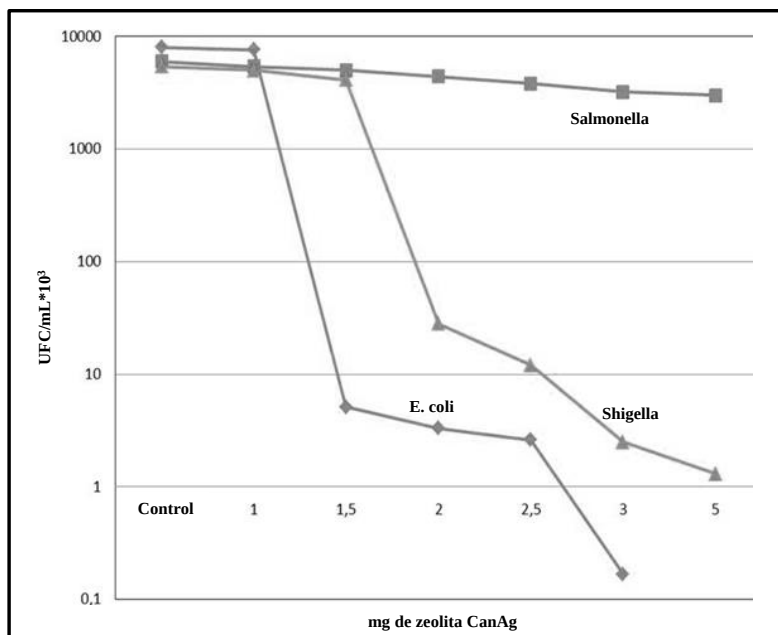


Figura 6. Efecto antimicrobiano de la CanAg frente a bacterias enteropatógenas.

El efecto antimicrobiano frente a las cepas enteropatógenas, fue considerado de tipo bacteriostático cuando se evidenció disminución del número de UFC/mL lo que indica que la sustancia, a esa concentración determinada, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Por su parte, cuando la sustancia es capaz de destruir completamente las bacterias y la cantidad de UFC/mL decae a cero el efecto es considerado bactericida.

En base a los resultados obtenidos se recomienda realizar un análisis químico para determinar la cantidad de plata presente en el sólido y realizar estudios con concentraciones mayores a 5 mg del sólido, para determinar la concentración mínima inhibitoria para *Salmonella spp.*, y *Shigella spp.*

4. CONCLUSIONES

Los iones plata desempeñaron una acción lítica ante *Escherichia coli* resultando la muerte de la población bacteriana, ejerciendo un efecto bactericida. Además, se encontró que la masa mínima de la matriz zeolítica estudiada, que presenta acción bactericida ante *Escherichia coli* fue de 5 mg. Por otra parte, los iones plata inhibieron el crecimiento de *Salmonella spp* y *Shigella spp*, más no las destruyeron, provocando así una reducción en la población bacteriana, evidenciándose solo un efecto bacteriostático. *Salmonella spp*, fue el microorganismo más resistente de las cepas estudiadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CDCH-UC y al FONACIT por el financiamiento recibido.

6. REFERENCIAS

- [1]. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades diarreicas. (2009). Nota descriptiva N°330. [En línea]. [Consultada en marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
- [2]. Silver, S., Lo, Jeng-Fan, Gupta, Amit., (2000). Los cationes de plata como agentes antimicrobianos: usos clínicos y resistencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 20 (3): 1-5.
- [3]. Mazorra M y Silveira E. (2007). Tratamiento oral del síndrome diarreico en terneros con zeolita natural (Oral treatment of the diarrhea syndrome in calves with natural zeolite). *Revista electrónica de Veterinaria. (REDVET)*.1695-75042007., 8 (3): 1-9.
- [4]. Ramírez, R., (2009). El uso de la plata en los antibióticos del futuro. *Revista Digital Universitaria*. 10 (10). ISBN 1067-6079.
- [5]. Brikgi. M, Ocanto. F, Palacios M, Valbuena. O, Linares. C. (2009). Actividad bacteriostática de zeolitas tipo cancrinita intercambiada con Cu. *FARAUTE Ciencias y Tecnología*., 4(1): 15 -20.
- [6]. Ocanto, F., (2009). Síntesis y caracterización de zeolitas tipo cancrinita con aplicaciones

- farmacéuticas y ambientales. Tesis Doctoral en Ciencias, Universidad Central de Venezuela UCV, mención Química.
- [7]. López, A. Elizabeth. (2012). Alternativa para la eliminación de Salmonella en agua potable y de riego, mediante plata iónica soportada en materiales mesoporos. Tesis de Pregrado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMICH). México.
- [8]. Linares C., Sánchez S., Urbina de Navarro C., Rodríguez K., Goldwasser M. Study of cancrinite-type zeolites as possible antacid agents. *Microporous and Mesoporous Materials* 77 (2005) 215–221
- [9]. Linares C., Goldwasser M. S., M.R. Urbina de Navarro C., (2001). *Stud. Surf. Sci. Catal.* 135. 331.
- [10]. Koneman E. W; Winn W. C.; Allen S. D.; Janda W. M.; Procop G. W.; Schrenckenberger P. C.; Woods G. L.; (2008). Diagnóstico Microbiológico. Inserto de la casa comercial de medio de cultivos. Edición: 6a. Editorial la Panamericana. Capítulo I-II.
- [11]. Ocanto, F., Linares, C., Urbina, C., Figueredo, E., García, R., (2012). Síntesis de zeolitas tipo cancrinitas nitradas, a partir de materia prima no convencional, utilizando un diseño estadístico factorial 23. *Revista Ingeniería, UC.* Vol. 19 (3).
- [12]. JCPDS PDF: Joint Committee on Powder Diffraction Standards Powder Diffraction files, (1977). International Centre for Diffraction Data: Newton Square, PA.
- [13]. Silver, S., Lo, Jeng-Fan., Gupta Amit. (2013). Los cationes de plata como agentes antimicrobianos: usos clínicos y resistencia bacteriana. *Enfermedades infecciosas y Microbiología.* 2000. 20(3):102-6.
- [14]. Mejía, S. (2007). Educación Médica Continua. Opciones de tratamiento en Shigelosis. *Revista de la Sociedad Bolivariana de Pediatría.* 46 (1): 80-84.
- [15]. Matsumura, Y., Yoshikata K., Kunisaki, S., and Tsuchido T., (2003). Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 69. (7). p. 4278–4281.