



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN QUIMICA

“Minerales Arcillosos de la NorPatagonia Argentina en la Retención de Compuestos  
Orgánicos que Impactan sobre la Salud Humana y el Medio Ambiente”

María Eugenia Parolo

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue y del Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre el 11 de octubre de 2005 y el 28 de junio de 2010, bajo la dirección del Dr. Marcelo J. Avena, UNS, y directora asistente Dra. Miria T. Baschini, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 18/1/2010, mereciendo la calificación de 10 (sobresaliente).

*a Guillermo*

*Ana Paula*

*y Federico.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de la presente tesis hubiera sido imposible si el aporte y participación de personas e Instituciones que permitieron que este trabajo llegue a feliz término, es por ello que aprovecho este espacio para expresar mi reconocimiento a todos ellos.

Agradezco de manera especial al Dr. Marcelo Avena por aceptarme para realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Sus aportes en cada etapa de las actividades realizadas y en la discusión de los resultados han sido muy valiosos no sólo para la realización de mi tesis sino para mi formación profesional.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Miria Baschini por su participación en el trabajo realizado con permanente predisposición, paciencia y por facilitarme el camino que me permitió llegar a donde pretendía.

A la Universidad Nacional del Comahue por el apoyo ofrecido a partir del Programa de Investigación "Los recursos minerales: origen, exploración, explotación y aplicación", dirigido por el Dr. Jorge Vallés a quien agradezco por la contribución de sus conocimientos y su gran experiencia en el campo de los minerales arcillosos.

A Gisela Pettinari por su constante predisposición para enseñarme a interpretar los difractogramas de rayos X, por escucharme con paciencia, apoyarme en cada etapa que transité en estos años de trabajo y por compartir experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor.

A Ricardo Echevarría por brindarme su amistad, su inquietud en ayudarme a resolver algunos obstáculos que se me presentaron y ofrecerme un lugar en su laboratorio para escribir la tesis, donde me sentí como en mi casa.

A Mónica Savini, siempre generosa y dispuesta como pocas, por apoyarme incondicionalmente en este proyecto y por las horas de trabajo que compartimos que me permitieron conocer una persona muy valiosa, con quien espero mantener una sólida amistad.

A la Bioq. Irene Zajonkovsky por su valiosa participación en los estudios microbiológicos y su interés en colaborar siempre que lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio, Diana Andrade, Carlos Soria y Eugenia Roca Jalil, por su calidez humana y por brindarme su grata compañía en mi lugar de trabajo.

A la Universidad Nacional del Sur por permitirme realizar mi posgrado y a sus profesionales por el interés en brindarme asistencia.

Y por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia... a mis hijos, Ana Paula y Federico, que crecieron junto a mis proyectos con todo lo que esto ha significado en nuestras vidas; a mi marido, Guillermo, por valorar mi trabajo, por alentarme constantemente y por su amor y compañía.

## **RESUMEN**

Los minerales arcillosos son utilizados frecuentemente en productos farmacéuticos como excipientes o sustancias activas. La interacción de un principio activo con el mineral puede influir sobre la liberación y estabilidad del compuesto, determinando su biodisponibilidad. El conocimiento de los aspectos químicos de los complejos principio activo-mineral arcilloso y los modos de adsorción y desorción constituyen una importante contribución en la formulación de sistemas de liberación modificada de sustancias basados en arcillas. Por otra parte, en los últimos años ha recibido especial atención el estudio de las consecuencias de la distribución de antibióticos en el medio ambiente, como consecuencia de su amplia utilización como preventivo y en el tratamiento de diversas infecciones, y la necesidad de desarrollar tecnologías para el control de la contaminación. Sólo recientemente los minerales arcillosos han sido utilizados para estos fines, a pesar de su amplia distribución en suelos y sedimentos y su elevada capacidad adsorbente.

En este trabajo de tesis se estudió la adsorción de antibióticos de la familia de las tetraciclinas sobre montmorillonita bajo diferentes condiciones experimentales mediante espectroscopia UV-visible, dicroísmo circular, ATR-FTIR, difracción de rayos X y experiencias en "batch" y modelado teórico. Se evaluó también la capacidad de los complejos de adsorción antibiótico-montmorillonita para inhibir el crecimiento de bacterias de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos por métodos espectroscópicos sugieren importantes interacciones entre diversos grupos funcionales del antibiótico y la superficie del mineral. El aumento en el espaciado basal observado en los diagramas de rayos X revelan que las moléculas se encuentran intercaladas en el espacio intercapa de la montmorillonita. A partir de las experiencias en batch se observó que la adsorción de tetraciclina (TC) sobre montmorillonita depende del pH, fuerza iónica y catión de intercambio del mineral. La cantidad de TC adsorbida alcanza valores cercanos a la capacidad de intercambio del mineral a valores de pH menores a 4, donde prevalece la especie catiónica de TC, y luego disminuye al aumentar el pH. Los resultados experimentales y el modelo utilizado sugieren que en la adsorción de TC sobre montmorillonita no sólo intervienen las especies catiónicas sino también neutras y monoaniónicas. Además de fuertes interacciones electrostáticas, pueden operar simultáneamente varios tipos de interacciones que incluyen interacciones puente hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Estos tipos de interacciones explican la adsorción de TC en un amplio intervalo de concentraciones, de pH y de fuerza iónica. Los estudios de actividad antimicrobiana, medida por el test de zona de inhibición, revelan que la actividad se mantiene cuando los antibióticos se encuentran adsorbidos sobre montmorillonita. La actividad antimicrobiana mostrada por los complejos de adsorción constituye un campo

promisorio de aplicación, en particular para la formulación de productos tópicos. Por otro lado, la optimización del material adsorbente y de las condiciones de adsorción permite recomendar su utilización en la retención de antibióticos presentes en sistemas acuosos, utilizando minerales arcillosos de la NorPatagonia Argentina mediante técnicas simples y de bajo costo.

## **ABSTRACT**

Clay minerals are often used in pharmaceutical products as excipients or active substances. The interaction of an active principle with the mineral can influence the release and stability of the substance, determining its bioavailability. The knowledge of the chemical aspects of the active principle-clay mineral complexes and their adsorption-desorption behaviour constitute an important contribution to the formulation of clay based systems that can be used for modified release of substances. On the other hand, the study of the consequences of the antibiotic distribution in the environment has received special attention in the last years, as a consequence of its wide use in disease prevention and in the treatment of several infections, and of the need to develop technologies for contamination control. Only recently, clay minerals have been used for these purposes, in spite of its wide distribution in soils and sediments and its high adsorbent capacity.

In this work the adsorption of antibiotics from the tetracycline family on montmorillonite has been studied under different experimental conditions by UV-visible spectroscopy, circular dichroism, ATR-FTIR, X ray diffraction and batch experiences and theoretical modelling. The capacity of the antibiotic-montmorillonite adsorption complexes to inhibit the grow of *Escherichia coli* bacteria was also studied. The results obtained with spectroscopic methods suggest important interactions between different antibiotic functional groups and the mineral surface. The increases in the basal spacing observed in the X-ray diagrams reveal that the molecules are intercalated in the montmorillonite interlayer space. Batch experiments have shown that tetracycline (TC) adsorption on montmorillonite depends on pH, ionic strength and the cation exchange capacity of the mineral. TC adsorption reaches values close to the cation exchange capacity at pH values lower than 4, where the TC cationic species prevails, and then it decreases as pH increases. The experimental results and the modelling suggest that both cationic as well as neutral and monoanionic species participate in the adsorption. Besides strong electrostatic interactions, several types of interactions can operate simultaneously including hydrogen bonds and van der Waals forces. These types of interactions explain TC adsorption in a wide interval of concentrations, pH and of ionic strength. The studies of antimicrobial activity, measured by the inhibition zone test, reveal that the activity remains when antibiotics are adsorbed on montmorillonite. Antimicrobial activity shown by the studied adsorption complexes constitutes a promising field of application, especially for the formulation of topical products. On the other hand, the optimization of the adsorbent material and of the adsorption conditions leads to recommend the use of clay minerals from the Argentinean Northern Patagonia for the retention of antibiotics in aqueous systems by using simple and low-cost techniques.



## INDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 1 - MINERALES ARCILLOSOS. PROPIEDADES, ESTRUCTURA Y CLASIFICACION.....</b>	<b>4</b>
1.1- Características y Clasificación de minerales arcillosos.....	4
1.2- Aplicaciones de los minerales arcillosos.....	17
1.3- Estructura y Propiedades de montmorillonitas.....	21
1.4- Reactividad de la superficie de minerales arcillosos.....	24
1.5- Localización de yacimientos en la NorPatagonia Argentina.....	27
1.6- Caracterización y propiedades fisicoquímicas del mineral arcilloso seleccionado para los estudios de adsorción.....	28
1.7- Experimental:	
1.7.1- Separación de la fracción montmorillonita del mineral.....	31
1.7.2- Homoionizado de montmorillonita con iones $Ca^{2+}$ .....	32
1.7.3- Concentración crítica de coagulación (CCC) del mineral arcilloso. Efecto del electrolito.....	33
1.7.4- Difracción de rayos X (DRX).....	33
1.7.5- Métodos espectroscópicos.....	34
1.7.6- Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	35
1.8 - Resultados y Discusión.....	35
1.9- Conclusiones.....	44
<b>CAPITULO 2 - ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA. GENERALIDADES Y EXPERIMENTOS CON TETRACICLINA.....</b>	<b>46</b>
2.1- Utilización de antibióticos y su distribución en el medio ambiente.....	46
2.2- Propiedades fisicoquímicas de los antibióticos seleccionados como adsorbatos.....	48
2.2.1- Reacciones de protonación-deprotonación.....	51

2.2.2.- Formación de complejos con cationes divalentes.....	54
2.2.3- Propiedades espectroscópicas.....	56
2.2.4- Estabilidad de antibióticos según condiciones de almacenamiento.....	58
2.3- Propiedades antimicrobianas de las tetraciclinas.....	60
2.4- Experimental:	
2.4.1- Concentración crítica de coagulación del mineral arcilloso utilizado en los estudios de adsorción. Efecto del adsorbato orgánico.....	63
2.4.2- Espectroscopia UV-vis.....	64
2.4.3- Espectroscopia IR. ATR-IR.....	64
2.4.4- Dicroísmo Circular.....	65
2.4.5- Difracción de rayos X.....	66
2.4.6- Microscopía electrónica de barrido .....	66
2.4.7- Efecto del pH del medio en la estabilidad de soluciones acuosas de TC.....	67
2.5- Resultados y Discusión.....	67
2.6- Conclusiones.....	86

**CAPITULO 3 - ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS CON  
MINERALES ARCILLOSOS.....88**

3.1- Mecanismos de adsorción de compuestos orgánicos sobre minerales arcillosos.....	88
3.2- Métodos analíticos para determinar la interacción de un compuesto orgánico con el mineral arcilloso.....	91
3.3- Experimental: Evidencias de interacción tetraciclina-montmorillonita	
3.3.1- Análisis espectroscópico del sistema de adsorción.....	95
3.3.2- Difracción de rayos X del sistema de adsorción.....	98
3.3.3- Evaluación del pH de la dispersión de montmorillonita en presencia de tetraciclina.....	99
3.3.4- Análisis de Ca <sup>2+</sup> en equilibrio en sistemas de adsorción tetraciclina-montmorillonita cálcica por absorción atómica.....	100
3.3.5- Microscopia electrónica de barrido SEM y TEM.....	100

3.4-Resultados y Discusión.....	101
3.5- Conclusiones.....	127

**CAPITULO 4 - DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ADSORTIVAS DE SISTEMAS**

**MONTMORILLONITA-AGUA.....129**

4.1- Optimización de los parámetros de adsorción.....	129
4.2- Isotermas de adsorción.....	130
4.3-Experimental	
4.3.1- Efecto del pH del medio en la adsorción de tetraciclinas.....	134
4.3.2- Efecto de la fuerza iónica del medio.....	136
4.3.3- Efecto del catión de intercambio del mineral arcilloso.....	136
4.3.4- Efecto de la presencia de iones Ca <sup>2+</sup> en el electrolito soporte....	137
4.3.5- Cinética de adsorción.....	137
4.3.6- Isotermas de adsorción.....	138
4.3.7- Isotermas de desorción de tetraciclina.....	139
4.4- Resultados y Discusión.....	139
4.5- Interpretación del comportamiento de adsorción de tetraciclina sobre montmorillonita natural mediante un modelo matemático.....	154
4.6- Modo de adsorción propuesto para tetraciclina sobre montmorillonita.....	160

**CAPITULO 5- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS ADSORBIDOS A**

**MONTMORILLONITA.....161**

5.1- Minerales arcillosos en sistemas de liberación de fármacos.....	161
5.2 Susceptibilidad de bacterias a los agentes antimicrobianos.....	163
5.3- Experimental:	
5.3.1- Efecto antimicrobiano de tetraciclina y minociclina.....	165
5.3.2- Evolución de los diámetros de inhibición en antibiogramas de tetraciclina y minociclina a lo largo del tiempo.....	168
5.4- Resultados y Discusión.....	169
5.5- Conclusiones.....	179

**CONCLUSIONES GENERALES.....180**

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....183**

## **INTRODUCCIÓN**

Los minerales arcillosos son utilizados frecuentemente en productos farmacéuticos como excipientes o sustancias activas ([Del Pozo, 1978](#); [Gámiz et al., 1992](#); [Bolger, 1995](#); [López Galindo y Viseras, 2000](#); [Carretero, 2002](#)). Para la preparación de medicamentos, los materiales utilizados deben cumplir una serie de requerimientos tales como estabilidad e inercia química y otras características físicas como textura, color y contenido de agua que también deben ser tenidas en cuenta. Las esmectitas son los minerales utilizados más comúnmente en la formulación de medicamentos por su elevada capacidad de intercambio, sus propiedades geológicas y la posibilidad de retener compuestos orgánicos ([Parolo et al., 2008](#)). La interacción del principio activo con el mineral puede influir sobre la liberación y estabilidad del compuesto determinando su biodisponibilidad. Los complejos de adsorción de antibióticos y minerales arcillosos pueden modificar la velocidad de desorción de la droga y así ser utilizados en la formulación de sistemas de liberación prolongada logrando niveles efectivos de la misma durante el tratamiento ([Aguzzi et al., 2007](#)). El conocimiento de los aspectos fisicoquímicos de los complejos droga-mineral arcilloso y los mecanismos de adsorción y desorción constituyen una contribución esencial en la formulación de sistemas de liberación de drogas basados en arcillas.

La utilización de antibióticos como preventivo y en el tratamiento de diversas infecciones ha logrado que estos compuestos sean unos de los más ampliamente difundidos para el cuidado de la salud humana y animal ([Chambers, 2001](#)). Además, son utilizados en la elaboración de alimentos para animales junto a anestésicos, antihistamínicos, antiinflamatorios, antiparasitarios, diuréticos y sedantes. Entre los más difundidos se encuentran las drogas para tratar y prevenir enfermedades infecciosas como la tetraciclina, antibióticos de la familia de  $\beta$ -lactamas y anti-inflamatorios esteroides ([Sarmah et al., 2006](#)).

Uno de los problemas que presenta la amplia difusión del uso de antibióticos en medicina humana y veterinaria se relaciona con la alta solubilidad en agua de estos compuestos químicos, siendo excretados en elevadas proporciones por los organismos a través de orina y heces, estas últimas utilizadas en ocasiones como abonos de suelos. Los residuos

---

procedentes de las industrias farmacéuticas así como los hospitalarios constituyen otras vías de acceso de los antibióticos al ambiente, generando un ciclo que les permite llegar con cierta facilidad a las aguas superficiales, suelos e incluso aguas subterráneas, donde se encuentran en concentraciones del orden de unos pocos nanogramos a microgramos por litro o kilogramo (Grung et al., 2008). La continua exposición de microorganismos a residuos de antibióticos incorporados al ambiente contribuye a generar resistencia en las poblaciones microbianas y en algunos casos pueden actuar como sustancias tóxicas para diferentes organismos acuáticos, llegando a producir efectos adversos en edades tempranas de su desarrollo (Wollemberg et al., 2000; Kämpel et al., 2001; Aksu y Tunç, 2004).

Una vez que estos compuestos llegan al ambiente se dispersan por medio de diferentes mecanismos de transporte. Los procesos fisicoquímicos que tienen lugar en los sistemas suelo-agua son la adsorción, percolación y degradación; dichos procesos están determinados por las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos como la estructura molecular, solubilidad, especiación e hidrofobicidad. Los minerales arcillosos comúnmente presentes en suelos, tales como las montmorillonitas, vermiculitas, illitas y caolinitas poseen sitios activos para reaccionar y formar complejos con diversos compuestos químicos (Lagaly et al., 2006).

En los últimos años ha recibido especial atención el estudio de las consecuencias de la distribución de antibióticos en el medio ambiente y la necesidad de desarrollar tecnologías para el control de la contaminación. Solo recientemente los minerales arcillosos han sido utilizados para éstos fines (Churchman et al., 2006), a pesar de su amplia distribución en suelos y sedimentos y su elevada capacidad adsorbente.

Entre los minerales arcillosos, las montmorillonitas se encuentran en depósitos de elevada pureza en la región patagónica de la república Argentina (Vallés e Impiccini, 1999; Lombardi et al., 2003). La disponibilidad de estos materiales en la región donde se llevó a cabo el presente estudio impulsa el análisis de las propiedades adsorptivas y posibles aplicaciones de las arcillas. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Evaluar la capacidad adsorbente, bajo diferentes condiciones experimentales, de minerales arcillosos naturales procedentes de la NorPatagonia Argentina con adsorbatos habitualmente
-

utilizados como principios activos en medicina humana y/o veterinaria.

- ✓ Estudiar los procesos de adsorción y desorción de los adsorbatos antes mencionados a fin de determinar los factores y mecanismos que los regulan.
  
  - ✓ Orientar los estudios hacia la utilización de las montmorillonitas como materiales capaces de retener moléculas orgánicas, tanto en procesos de descontaminación de efluentes descargados en cursos de agua, como en la formulación de los mismos principios activos seleccionados.
-

## **1 MINERALES ARCILLOSOS. PROPIEDADES, ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN**

### **1.1 Características y clasificación de minerales arcillosos**

Si bien las arcillas son materiales conocidos por el hombre desde la antigüedad, el estudio científico de las mismas comenzó a partir de 1930 donde se aceptó el concepto general de minerales arcillosos. La definición del término arcillas aceptada por la Asociación Internacional para la Estudio de Arcillas (AIPEA) es la de materiales naturales compuestos principalmente por minerales de pequeño tamaño de partícula que presentan propiedades plásticas con un contenido apropiado de agua y consolidan cuando se secan. Aunque el tamaño de partícula es un parámetro común en todas las definiciones de arcillas, no existe un límite máximo aceptado de manera general. Algunas disciplinas se refieren a la fracción arcilla como materiales cuyo tamaño de partículas es menor a 2  $\mu\text{m}$ ; sin embargo en geología, sedimentología y geoingeniería el tamaño límite se fija comúnmente en 4  $\mu\text{m}$  (Moore y Reynolds, 1997).

Los minerales arcillosos se definen como filosilicatos o silicatos laminares, debido a que poseen una morfología plana, y están constituidos por la fracción fina de rocas, sedimentos y suelos. Las principales características de estos minerales incluyen:

- Estructura laminar con dimensiones nanométricas en una dimensión.
- Varios tipos de superficie: basal o externa, de borde e interna o intercapa.
- Superficies externas e internas que pueden ser fácilmente modificadas por adsorción e intercambio iónico.
- Plasticidad
- Capacidad de endurecer cuando se secan.

Las estructuras de los filosilicatos se basan en hojas tetraédricas (T) y octaédricas (O) que pueden condensar en proporciones 1:1 y 2:1 para formar capas TO o TOT respectivamente. En la mayoría de los minerales arcillosos las

---



capas presentan carga negativa que es balanceada por cationes que determinan sus propiedades superficiales y coloidales. Un agregado de capas constituye una partícula y varias partículas forman un agregado (Fig. 1.1). La disposición espacial de las partículas (*placas hexagonales, tubos, tablas y fibras*) o agregados produce diferentes morfologías en el mineral. Las esmectitas tienen morfología de placas de bordes crenulados. Diferentes metodologías aportan información sobre la estructura de las arcillas: absorción de rayos X (Faisandier et al., 1998), viscometría (Sposito, 1992), difracción de rayos X y microscopía (Lagaly, 1993).

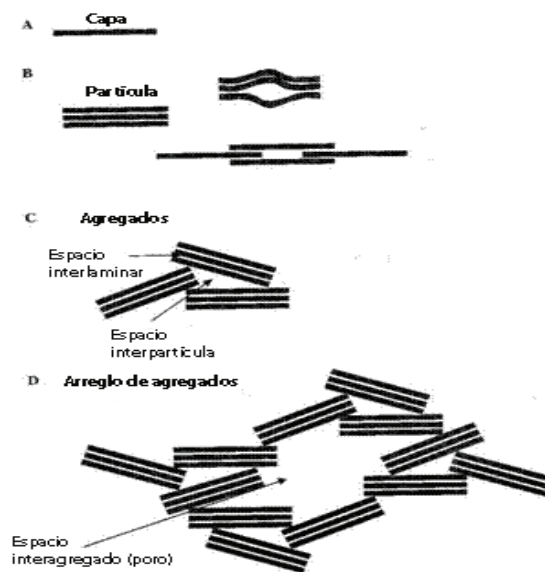


Fig.1.1- A- capa de mineral arcilloso. B-partícula formadas por apilamiento, translación y deformación de capas. C-agregado de partículas. D- arreglo de agregados que generan poros. (Bergaya y Lagaly, 2006)

Cada hoja tetraédrica está formada por una sucesión bidimensional de tetraedros constituidos por un catión central coordinado a cuatro oxígenos en los vértices. Cada tetraedro se encuentra unido a tetraedros adyacentes compartiendo tres oxígenos (oxígenos basales), formando una red hexagonal bidimensional a lo largo de las direcciones cristalográficas *a* y *b* (Fig. 1.2). Cada hoja octaédrica, a su vez, está formada por una sucesión bidimensional de octaedros constituidos por un catión central coordinado a seis oxígenos u oxhidrilos en los vértices. Cada octaedro se encuentra unido a octaedros adyacentes formando también una red bidimensional a lo largo de las direcciones *a* y *b* (Fig. 1.2).

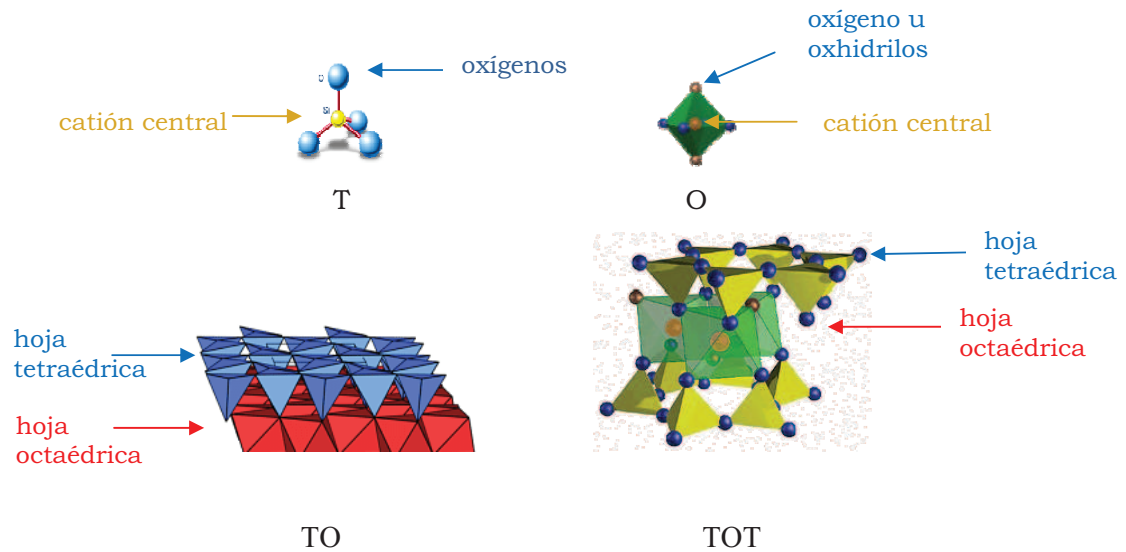


Fig. 1.2- Representación esquemática de estructuras de filosilicatos.

Los cationes más comunes en los tetraedros son Si<sup>4+</sup>, Al<sup>3+</sup> y Fe<sup>3+</sup> y en los octaedros se encuentra generalmente Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>, también se identificaron otros cationes como Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup> y Ti<sup>4+</sup> (Brigatti et al., 2006).

En la estructura 1:1, la celda unidad incluye seis sitios octaédricos y cuatro sitios tetraédricos mientras que en la estructura 2:1 la celda unidad está formada por seis sitios octaédricos y ocho tetraédricos. Se denomina estructura trioctaédrica a aquella que presenta los seis sitios octaédricos ocupados por cationes y dioctaédrica si sólo cuatro de los seis sitios están ocupados.

La periodicidad en el arreglo laminar en los filosilicatos 1:1 es de 0,7 nm y varía entre 0,9 y 1,40 nm para las estructuras 2:1. Estas diferencias se deben a que el espacio intercapa se puede encontrar vacío, con la presencia de cationes alcalinos y alcalino-térreos anhidros o cationes hidratados (Fig. 1.3). Debido a que las capas de los minerales arcillosos son muy delgadas, aproximadamente el 40% de los átomos que la constituyen se encuentran localizados en la superficie.

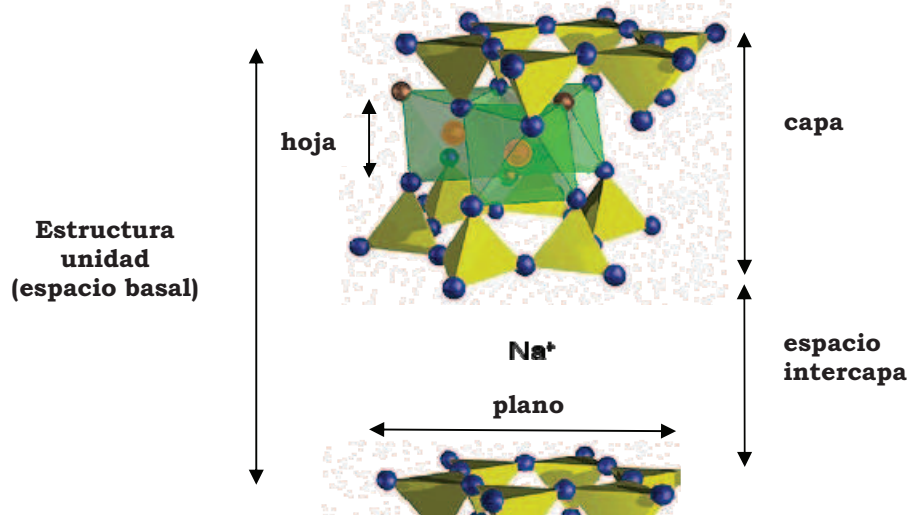


Fig. 1.3 – Términos estructurales correspondientes a un mineral arcilloso 2:1.

Los iones  $\text{O}^{2-}$  y  $\text{OH}^-$  están organizados en planos paralelos. En la estructura 1:1 un plano externo está constituido por iones  $\text{O}^{2-}$ , que corresponden a la hoja tetraédrica (plano basal), el plano interno presenta iones  $\text{O}^{2-}$  y  $\text{OH}^-$  y el otro plano externo correspondiente a la hoja octaédrica está compuesto de iones  $\text{OH}^-$ . En la estructura 2:1 los dos planos externos corresponden a iones  $\text{O}^{2-}$  de las hojas tetraédricas y existen dos planos internos que contienen tanto  $\text{O}^{2-}$  como  $\text{OH}^-$ .

La estructura laminar de los filosilicatos puede ser eléctricamente neutra o cargada negativamente. Esta carga es permanente y generada por procesos geológicos debido a sustituciones isomórficas en la estructura cristalina, siendo independiente del entorno químico. La carga negativa surge cuando el  $\text{Si}^{4+}$  es reemplazado por  $\text{Al}^{3+}$  en la hoja tetraédrica, por la sustitución de  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  por cationes de menor carga en sitios octaédricos o por la presencia de vacancias (Brigatti et al., 2006). La carga estructural generada induce a la ocupación del espacio intercapa por cationes intercambiables (generalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ ) que se encuentran próximos a los planos externos de  $\text{O}^{2-}$  u  $\text{OH}^-$  y neutralizan la carga estructural. Estos cationes pueden actuar como “links” entre las capas de la arcilla, haciendo que varias capas se mantengan unidas entre sí para formar partículas.

En los filosilicatos 2:1 la carga ( $z$ ) varía entre 0,2 para hectorita y 2,0 para micas, mientras que en filosilicatos 1:1 la carga estructural es aproximadamente cero (Tabla 1.1).

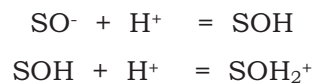
La expansión de las esmectitas es debida a la relativamente baja carga estructural ( $z=0,2-0,6$ ) combinada con la contribución del número de capas de agua del catión de intercambio y la densidad de carga del catión (Moore y Reynolds, 1997).

Tabla 1.1- Clasificación de filosilicatos (Bailey, 1980)

Tipo de capa	Grupo (z=carga por fórmula unitaria *)	Subgrupo	Especies
1:1	Serpentina-caolín ( $z \geq 0$ )	Serpentinas (Tr) Caolines (Di)	Crisotilo, antigorita, lizardita, bertierina, odinita, caolinita, dickita, nacrita, halloisita.
2:1	Talco-pirofilita ( $z \geq 0$ )	Talco (Tr) Pirofilitas (Di)	Saponita, stevencita, hectorita.  Montmorillonita, beidelita, nontronita  Illita, Fe-illita, glauconita, NH <sub>4</sub> -illita Biotita, flogopita, wonesita, muscovita, paragonita, phengita, Celadonita. Margarita.  Chamosita, nimita Donbasita Cookeita, sudoita
	Esmectita ( $z = 0,2-0,6$ )	Esmectitas trioctaédricas  Esmectitas dioctaédricas	
	Vermiculita ( $z=0,6-0,9$ )	Vermiculitas trioctaédricas Vermiculitas dioctaédricas	
	Illita ( $z = 0,6-0,9$ )	Illitas trioctaédricas Illitas dioctaédricas	
	Mica ( $z \geq 1$ )	Micas trioctaédricas Micas dioctaédricas	
	Mica frágil ( $z \geq 2$ )	Micas frágiles dioctaédricas	
	Clorita ( $z$ variable)	Tri, tri cloritas Di, di cloritas Di, tri cloritas	
2:1 Cintas invertidas	Sepiolita-paligorskita ( $z$ variable)		Sepiolita, loughlinita, palygorskita

\* z se refiere a la carga para fórmula unitaria  $O_{10}(OH)_2$ .

Los minerales arcillosos presentan, además, cargas variables en los bordes dependientes del pH del medio. Esta carga surge de la disociación de grupos superficiales (por ejemplo: grupos Si-OH o Al-OH) y su comportamiento ácido-base. Las reacciones de disociación pueden ser esquematizadas de la siguiente manera (Stumm, 1992):



donde  $\text{SO}^-$ ,  $\text{SOH}$  y  $\text{SOH}_2^+$  representan los grupos superficiales con carga negativa, neutra y positiva, respectivamente. En la superficie de minerales, las uniones con los protones están localizadas sobre los átomos de oxígeno, que son los sitios específicos para estas uniones y actúan como bases de Brønsted.

Algunas consideraciones sobre protonación de una superficie deben ser tenidas en cuenta para estudiar el comportamiento ácido-base de los grupos superficiales de un mineral arcilloso. Con el objeto de simplificar el análisis, y debido a que la superficie de los minerales arcillosos puede poseer distintos tipos de grupos superficiales dependiendo de su composición química y de los planos superficiales que se consideren, se puede plantear de manera general una reacción de protonación de un grupo superficial como sigue (Avena, 2006):



donde  $\text{A}^x$  representa al grupo superficial deprotonado y  $\text{AH}^{x+1}$  representa al grupo superficial protonado. La carga eléctrica del grupo  $\text{A}^x$  está representada por  $x$  (que puede ser positiva, neutra o negativa; fraccionaria o no) mientras que la carga eléctrica de  $\text{AH}^{x+1}$  es una unidad mayor que la del grupo deprotonado. La ley de acción de masas para la reacción anterior puede ser representada por:

$$K_H^{\text{int}} = \frac{\Gamma_{\text{AH}}}{\Gamma_{\text{A}} a_{\text{H},0}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $\Gamma_{\text{AH}}$  y  $\Gamma_{\text{A}}$  representan las concentraciones superficiales (moles/m<sup>2</sup>) de las especies protonada y no protonada respectivamente;  $K_H^{\text{int}}$  es la constante de protonación intrínseca y  $a_{\text{H},0}$  es la actividad de protones en la solución en las proximidades del sitio de adsorción.

$a_{\text{H},0}$  se define como:

$$a_{\text{H},0} = a_{\text{H}} e^{-F\psi_0/RT} \quad (\text{Ec. 2})$$

$\psi_0$  representa la diferencia en el potencial eléctrico entre la superficie y el seno de la solución y  $a_{\text{H}}$  representa la actividad de protones en la solución.

Combinando las Ec. 1 y 2:

$$K_H^{\text{int}} e^{-F\psi_0/RT} = \frac{\Gamma_{AH}}{\Gamma_A a_H} \quad (\text{Ec.3})$$

$K_H^{\text{int}}$  está relacionada con la energía libre estándar de protonación ( $\Delta G^\circ$ ) y para soluciones diluidas es independiente del potencial eléctrico y carga superficial porque es definido para el estado estándar. Se define la constante efectiva o aparente  $K_H^{\text{ef}}$  que depende del potencial superficial:

$$K_H^{\text{ef}} = K_H^{\text{int}} e^{-F\psi_0/RT} \quad (\text{Ec.4})$$

La Ec.4 indica que la protonación superficial puede ser interpretada como resultado de una contribución química o intrínseca de corto alcance ( $K_H^{\text{int}}$ ) que está dada por la capacidad del grupo superficial de unirse a un protón y una contribución electrostática ( $e^{-F\psi_0/RT}$ ) de largo alcance que depende del potencial eléctrico superficial (Avena, 2006). El efecto del potencial eléctrico en la reactividad de los grupos superficiales es particularmente notable en minerales arcillosos.

El estudio de adsorción de protones sobre la superficie de minerales se lleva generalmente a cabo mediante técnicas de titulación potenciométrica (Van Raij y Peech, 1972) o técnicas electrocinéticas como electroforesis (Miller y Low, 1990).

Las reacciones de protonación-deprotonación de los grupos superficiales son en general importantes porque ellas conducen a una variación de la carga eléctrica de la superficie que posee grupos con capacidad de protonarse o deprotonarse. De acuerdo a las reacciones antes mencionadas, si el pH de la solución acuosa en la que se encuentran los minerales arcillosos es suficientemente bajo, la concentración superficial de grupos protonados es mayor que la de grupos deprotonados y la superficie adquiere una carga neta positiva. Por el contrario, si el pH es suficientemente alto la concentración superficial de grupos deprotonados es mayor que la de protonados y la superficie adquiere una carga neta negativa (Fig.1.4). Las cargas superficiales se encuentran neutralizadas bajo una cierta condición de pH, denominado PZC (punto de carga cero) o IEP (punto isoelectrico), según el método utilizado para medirlas y los iones que las neutralizan. Cuando no existe adsorción específica de iones del electrolito soporte, el PZC coincide con

el IEP (valor de pH donde la movilidad electrocinética es nula). Cuando el pH del medio aumenta por encima del PZC, la superficie basal adquiere carga neta negativa, y al disminuir por debajo del PZC, adquiere carga neta positiva.

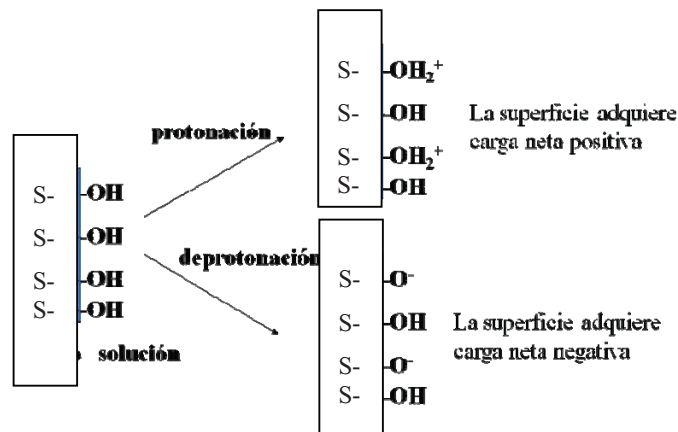


Fig. 1.4- Comportamiento ácido-base de la superficie.

Las cargas de las partículas de un sólido pueden entonces ser clasificadas en tres categorías (Spósito, 1998):

- Carga estructural ( $\sigma_{str}$ ) originada por sustituciones isomórficas.
- Carga por adsorción de protones ( $\sigma_H$ ) debida a la adsorción-desorción de protones por los grupos funcionales superficiales.
- Carga por adsorción de iones ( $\Delta q = q^+ - q^-$ ) que representa la adsorción total relativa de cationes (excepto protones) y aniones por todos los mecanismos de adsorción posibles.

Para alcanzar la electroneutralidad de la dispersión del mineral la carga estructural de la partícula más la carga generada por la adsorción de protones debe ser neutralizada por la adsorción de iones de la solución:

$$\sigma_{str} + \sigma_H + \Delta q = 0 \quad (\text{Ec.5})$$

Para estimar la carga estructural de la partícula generalmente se utiliza la capacidad de intercambio catiónico del mineral (CIC). Esta estimación es válida cuando los otros tipos de carga superficial son despreciables debido a que CIC depende también de la carga generada por protonación-deprotonación de los grupos superficiales (Tournassat et al., 2004).

---

Debido a la alta relación superficial cara/borde, las cargas de los bordes son prácticamente despreciables frente a aquellas de las caras, por ello son estas últimas las que dominan los fenómenos de superficie y habitualmente son llamadas cargas de superficie.

La reactividad de un grupo superficial en un filosilicato se puede comparar, de manera general, a la de las especies equivalentes en solución. En solución, los iones metálicos se coordinan a ligandos formando complejos como el complejo tetraédrico de Si:  $\text{SiO}_4^-$  y los complejos octaédricos de Al:  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  o  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]^0$ . De manera equivalente, el ión metálico que forma parte de un grupo superficial en un mineral arcilloso forma un complejo cuya esfera de coordinación está ocupada por ligandos oxígenos u oxhidrilos pertenecientes a la fase sólida, estando algunos de esos ligandos expuestos a la fase acuosa.

Las reacciones que pueden tener lugar en la superficie de un mineral arcilloso son presentadas esquemáticamente en la Fig. 1.5, donde se comparan los tipos de reacciones en las que puede intervenir un complejo superficial con las de un complejo en solución acuosa. Una descripción de cada una de esas reacciones se da a continuación:

- a) **Reacciones de protonación-deprotonación.** Estas reacciones dependen de las propiedades ácido-base del complejo; el grupo hidroxilo coordinado al metal puede encontrarse protonado o deprotonado según el pH del medio. Por lo tanto, la adsorción de protones cambia la carga del material adsorbente.
- b) **Intercambio de ligandos.** En estas reacciones el grupo hidroxilo puede actuar como ligando intercambiable o como grupo dador de electrones. Un ligando como el anión fosfato puede reemplazar al grupo hidroxilo y unirse al ión metálico, representando uno de los principales mecanismos de adsorción química de aniones a la superficie del mineral (Fig. 1.5). Según las propiedades de la superficie del mineral y del ligando, se puede presentar más de un sitio de coordinación superficial.

Otro tipo de intercambio de ligandos se produce en ciertos casos de adsorción de cationes. Cuando un grupo superficial reacciona con un complejo metálico en solución se produce una reacción de condensación en la cual un ión metálico pierde un

---



ligando y un grupo hidroxilo, óxido u otro grupo actúa como puente entre los metales. En este caso también puede haber más de un sitio de coordinación superficial.

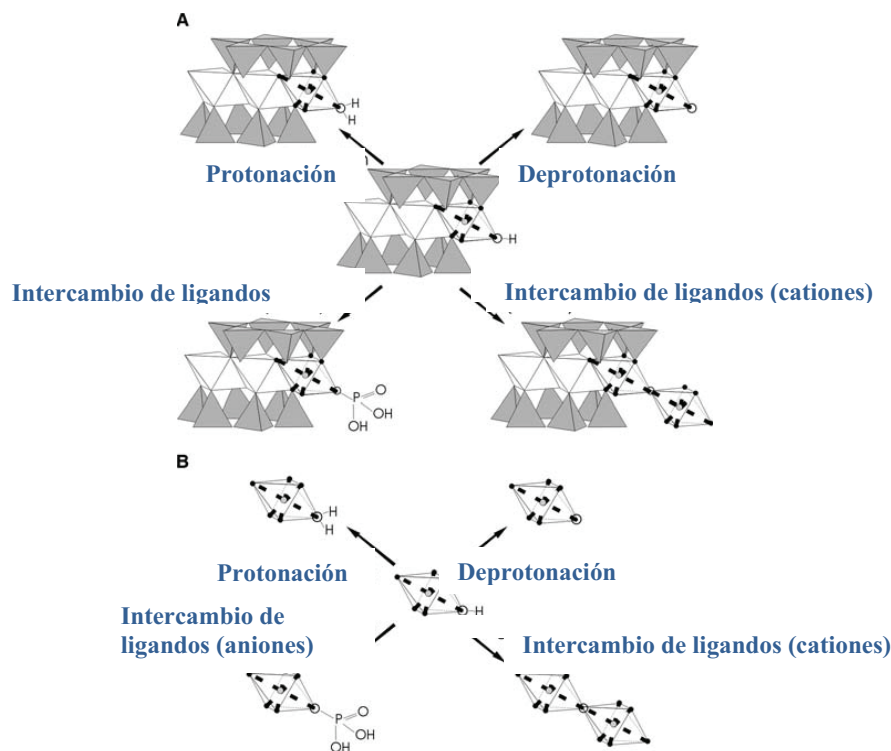


Fig. 1.5- Comparación entre la reactividad de un complejo octaédrico de aluminio, (A) en la superficie de borde de una lámina 2:1 y (B) en solución acuosa (Avena, 2006).

- c) **Complejos de esfera externa.** Los cationes no pierden o intercambian ligandos de su esfera de coordinación primaria. Se forma en este caso un par iónico asociado por fuerzas electrostáticas u otras fuerzas más débiles. Un ejemplo de esta interacción son los complejos que forman los iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en la interfaz mineral-agua.

La superficie cargada eléctricamente de la arcilla controla la interacción con otros iones del medio, moléculas, polímeros, microorganismos y partículas. Estos procesos son de fundamental importancia en la química de suelos y tienen diversas aplicaciones tecnológicas.

Las arcillas forman sistemas coloidales en medios acuosos debido al pequeño tamaño de sus partículas en estos sistemas (menor a  $10\ \mu\text{m}$ ), presentando una fase sólida en suspensión. Los coloides permanecen

suspendidos debido a que la velocidad de sedimentación es menor a  $10^{-2}$  cm s<sup>-1</sup>. De acuerdo a la ley de Stoke y considerando partículas esféricas, la velocidad de sedimentación es proporcional al cuadrado del diámetro de la partícula (Ec.6) (Stumm, 1992).

$$V_s = \frac{g (\rho_s - \rho) d^2}{18 \eta} \quad (\text{Ec.6})$$

donde  $g$  es la aceleración de la gravedad ( $9,81 \text{ m s}^{-2}$ ),  $\rho_s$  y  $\rho$  son las densidades de la partícula ( $\text{kg m}^{-3}$ ) y del agua respectivamente,  $\eta$  es la viscosidad absoluta ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ) y  $d$  es el diámetro de la partícula.

El proceso por el cual una suspensión acuosa es inestable y sufre sedimentación gravitacional se denomina coagulación. Este proceso está dado por la aglomeración de partículas formando agregados.

Un sistema coloidal es estable si durante el período de observación no sufre cambios apreciables en su estado de dispersión. El tiempo de estabilidad de estos sistemas puede ser de años o fracciones de segundo. La energía libre asociada a la extensa interfaz de los sistemas coloidales tiende a alcanzar su menor valor por aglomeración de sus partículas.

La estabilidad de un sistema coloidal puede ser afectada por electrolitos o por adsorbatos que modifiquen la carga superficial del coloide como también por polímeros que afecten las interacciones entre partículas formando puentes o estabilizando el sistema por factores estéricos (Stumm, 1992).

Los coloides son estables cuando sus partículas presentan carga eléctrica. La repulsión entre las partículas debido a interacciones electrostáticas es equilibrada por atracciones tipo van der Waals. La energía de repulsión depende del potencial superficial, disminuye a lo largo de la doble capa eléctrica y es función de la fuerza iónica del sistema (Fig. 1.6); mientras que la energía de atracción es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre partículas y no es afectada por la fuerza iónica. Para pequeñas distancias entre partículas predominan las fuerzas de atracción y a distancias de separación intermedias predomina la repulsión. La teoría DLVO evalúa cuantitativamente el balance entre las fuerzas de atracción y repulsión para la interpretación de factores empíricos que determinan la estabilidad coloidal. Calcula la energía de interacción, en función de la distancia interpartícula, como la energía libre correspondiente a la aproximación de dos partículas

desde una distancia infinita a una distancia de separación “d” (Lyklema, 1978).

En la Fig. 1.6 se puede observar que cuando aumenta la fuerza iónica, la energía de atracción prevalece sobre la repulsión a grandes distancias entre partículas.

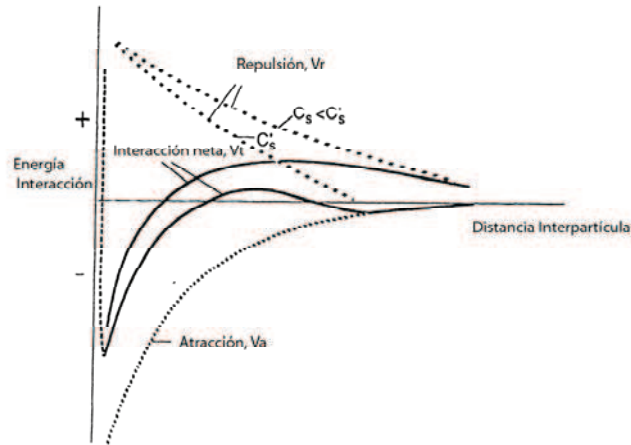


Fig. 1.6.- Modelo Físico de Estabilidad Coloidal. Energías de interacción (repulsión electrostática,  $V_R$ , atracción de van del Waals,  $V_A$ ) e interacción total,  $V_T$  en función de la distancia de separación entre partículas y para dos concentraciones de electrolito ( $C_s$  y  $C_s'$ ). (Stumm, 1992)

Para analizar cualitativamente la estabilidad de un sistema coloidal deben tenerse en cuenta, además, los factores químicos que intervienen. La adsorción específica de  $H^+$ , iones metálicos y ligandos sobre la superficie del coloide afectan la densidad de carga ( $\sigma_0$ ) y potencial superficial ( $\psi_0$ ). Por lo tanto, para estimar la estabilidad del sistema se necesita conocer el potencial superficial que, si bien no puede ser medido, es posible estimarlo aplicando la teoría de Gouy Chapman (Ec.7) o alguna otra ecuación que describa la distribución de carga y potencial en la doble capa eléctrica.

$$\sigma_0 = \left( \frac{8 \epsilon_0 \epsilon c R T}{z F \psi_0} \right)^{1/2} \operatorname{senhip} \left( \frac{z F \psi_0}{2 R T} \right) \quad (\text{Ec.7})$$

donde  $\epsilon$  es la permitividad dieléctrica relativa (78,54 para el agua a 25°C),  $\epsilon_0$  la permitividad dieléctrica en vacío ( $8,854 \times 10^{-14} \text{ CV}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $F$  la constante de Faraday y  $c$  la concentración de electrolito.

---

Experimentalmente se puede determinar la carga superficial ( $\sigma_o$ ) midiendo todas las especies cargadas que se encuentran adsorbidas (Ec.8).

$$\sigma_o = \sigma_{str} + \sigma_H + \sigma_{IS} + \sigma_{os} \quad (\text{Ec.8})$$

donde  $\sigma_{str}$ : carga estructural permanente.

$\sigma_H$ : carga neta protónica.

$\sigma_{IS}$ : carga debida a formación de complejos de esfera interna.

$\sigma_{os}$ : carga debida a formación de complejos de esfera externa.

(las unidades de  $\sigma$  son generalmente expresadas en unidades de densidad de carga superficial, C m<sup>-2</sup>).

Debido a que el estado coloidal de minerales arcillosos dispersos es decisivo para muchas aplicaciones prácticas, la coagulación de dispersiones de caolinita y montmorillonita ha sido ampliamente estudiada ([Jenny y Reitemeier, 1935](#); [Kahn, 1958](#)).

Las dispersiones de minerales arcillosos en su forma sódica pueden ser coaguladas con bajas concentraciones de sales inorgánicas. La valencia del catión determina la estabilidad electrostática de la dispersión. Por ejemplo, 0,025 % de una dispersión de montmorillonita sódica puede ser coagulada con soluciones de NaCl (5mM), solución de CaCl<sub>2</sub> (0,4 mM) y solución de AlCl<sub>3</sub> (0,08 mM) ([Penner y Lagaly, 2000](#)). La teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) predice que la relación entre la concentración crítica de coagulación (CCC) para cationes (Me) de distinta carga es:

$$\text{CCC (Me}^+) = (4-64) \text{ CCC (Me}^{2+}) = (9-729) \text{ CCC (Me}^{3+}) \quad (\text{Ec.9})$$

La coagulación de un sistema coloidal está determinada por la presencia de:

*Electrolito inerte*: iones que no se encuentran adsorbidos específicamente a la superficie del coloide. Su efecto está dado por la compresión de la doble capa eléctrica y disminución de la estabilidad del sistema. Se puede definir la CCC que es independiente de la cantidad de sólido disperso ([Stumm, 1992](#)):

---

$$CCC = \frac{8 \cdot 10^{-36} [(z e \psi / 4 k T)]^4}{A^2_{11(2)} z^6} \quad (\text{Ec.10})$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $A_{11(2)}$  es la constante de Hamaker que se aplica a la interacción entre las partículas 1 en el medio 2.

*Especies adsorbidas específicamente:* Son las especies que forman los complejos superficiales, afectan la carga superficial, el potencial superficial y la estabilidad del coloide. La concentración crítica de coagulación disminuye con la afinidad de la especie adsorbida al material coloidal y depende del área superficial del coloide.

Los agentes coagulantes pueden también ser cationes orgánicos. La CCC del cloruro de tetrametilamonio sobre montmorillonita sódica (Wyoming) es igual a la correspondiente a NaCl (5mM), mientras que cationes monovalentes de cadena larga presentan CCC menores a 0,3 mM. Un aumento en la valencia del catión orgánico no reduce la CCC debido a que en la adsorción de cationes orgánicos no participan solamente fuerzas electrostáticas sino también interacciones van der Waals con la superficie del mineral (Lagaly, 2006).

## 1.2 Aplicaciones de los minerales arcillosos

Las arcillas y minerales arcillosos son utilizados en una amplia variedad de aplicaciones industriales (Lagaly y Fahn, 1983, Murray, 2003) debido a dos aspectos importantes y contrastantes en sus propiedades:

- inercia y estabilidad
- reactividad y actividad catalítica.

La comúnmente denominada arcilla en la industria contiene mezclas de diferentes minerales arcillosos tales como ollita/esmectitas, caolinitas, esmectitas, micas y minerales asociados. Su mineralogía y distribución de tamaño de partículas determinan su utilización en la construcción de caminos, represas y en contenedores de residuos.

La utilización de arcillas en sistemas acuosos en la industria del papel o las pinturas se debe a la naturaleza hidrofílica de estos minerales que permite la formación de sistemas dispersos.

---

Uno de los grupos de minerales arcillosos más importantes encontrado en suelos y sedimentos son las esmectitas. Bentonita es el nombre que recibe el material en estado natural y está formada mayoritariamente por minerales esmectíticos y en menor proporción por otros minerales, llamados acompañantes. En los últimos años el uso de bentonitas en aplicaciones medioambientales ha crecido marcadamente; estas arcillas pueden inmovilizar sustancias contaminantes debido a su capacidad adsorbente. La producción mundial de bentonitas es de 13 millones de toneladas/año ([Harvey y Lagaly, 2006](#)).

Se utilizan grandes volúmenes de estos materiales en los procesos de filtración, decoloración y clarificación de diversos sistemas, para obtener pellets en alimentos para animales, para vehiculizar plaguicidas y como adsorbentes de grasas y aceites. Mientras que pequeñas cantidades de bentonitas son necesarias en la industria farmacéutica, en cosmética y pinturas, como aditivos de cementos, en la purificación de aguas y como catalizador o soporte de catalizadores en varias síntesis orgánicas ([Fahn y Schall, 1985](#); [Murray, 2000](#); [Panpanit y Visvanathan, 2001](#)). En otras aplicaciones, las dispersiones de bentonitas son usadas para adherir quiebres y fisuras en rocas, para inyección en suelos o para impedir el movimiento de agua y contaminantes en medios acuosos a través del suelo, arena o grava.

La amplia utilización de los minerales arcillosos se debe a que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, su extracción es relativamente sencilla y no son materiales costosos.

La reacción de minerales arcillosos con compuestos orgánicos cambia la naturaleza hidrofílica de las arcillas. En los minerales de estructura 2:1 las moléculas de agua en el espacio intercapa de esmectitas y vermiculitas pueden ser desplazadas por moléculas orgánicas polares. Los compuestos orgánicos, que actúan como ligandos neutros, pueden formar complejos con los cationes que se encuentran entre las capas del mineral o pueden desplazarlos (Fig.1.7). Los iones de alquilamonio cuaternarios son ampliamente utilizados para modificar esmectitas; los derivados orgánicos así obtenidos son adsorbentes adecuados para el control de la contaminación ambiental ([Harvey y Lagaly, 2006](#)).

Las arcillas modificadas con cationes orgánicos (también llamadas organoarcillas) se utilizan no sólo como filtros para la descontaminación de muestras de agua y como barreras para inmovilizar agentes contaminantes en

---

suelos, sino también como soportes en formulaciones de plaguicidas para conseguir una disminución en la velocidad de lixiviación de estas sustancias que son muy móviles en suelos, mejorando la calidad del agua superficial y subterránea (Celis et al., 2002).

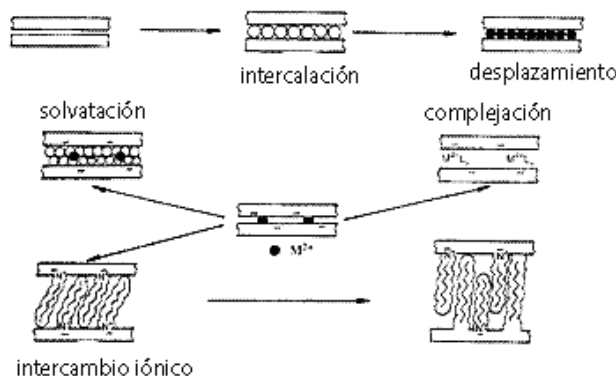


Fig. 1.7- Reacciones de intercalación de minerales arcillosos 1:1 y 2:1 (Jasmund y Lagaly, 1993).

El desarrollo de materiales híbridos inorgánicos-orgánicos ha tenido particular interés en los últimos años (Ruiz-Hitzky y Van Meerbeek, 2006). La dispersión de partículas de arcilla en una matriz polimérica puede mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros. Recientes investigaciones en este campo tienen como objetivo incrementar la fuerza de unión entre las arcillas y el material polimérico y producir materiales nanocompuestos. Estos materiales tienen la propiedad de incrementar la firmeza y la resistencia a la permeación de gases a bajos costos siendo utilizados para la construcción de paneles en automóviles y en envases.

Las propiedades particulares de las arcillas como son el tamaño coloidal de sus partículas, su estructura cristalina, elevada área superficial específica, carga y capacidad de hinchamiento hacen que estos materiales tengan óptimo comportamiento reológico y excelentes capacidades de adsorción para que puedan ser utilizados con fines terapéuticos y cosméticos. Entre los minerales más destacados para el cuidado de la salud humana se encuentran la caolinita, el talco, algunas esmectitas (montmorillonita y saponita) y los minerales fibrosos (sepiolita y palygorskita). Debido a su elevada capacidad de intercambio catiónico, las esmectitas interaccionan fuertemente con algunos fármacos catiónicos afectando su biodisponibilidad. Esta interacción puede

---

ser ventajosa en la formulación de sistemas de liberación controlada que es uno de los campos más interesantes de las aplicaciones farmacéuticas de las arcillas en la actualidad. Los minerales arcillosos cumplen con los requisitos químicos, físicos y microbiológicos que los hacen adecuados para su utilización en tecnología farmacéutica y dermofarmacia como excipientes y como sustancias con actividad biológica adecuada (Carretero, 2002; López-Galindo y Viseras, 2004). Están presentes en formas de administración sólidas (comprimidos, cápsulas, granulados), líquidas (suspensiones y emulsiones) y semisólidas (pomadas, pastas) para su aplicación tópica o administración oral (López-Galindo et al., 2006).

A causa de su actividad biológica se utilizan arcillas como principios activos en formulaciones que necesitan productos absorbentes, esterilizantes, anti-inflamatorios o detergentes, estando presentes en la composición de diversos productos:

*Antidiarreicos:* la palygorskita, caolinita y esmectitas se emplean en el tratamiento sintomático de la diarrea debido a su capacidad para adsorber agua, bacterias y algunas toxinas (Dupont et al., 1992).

*Antiácidos:* las arcillas fibrosas poseen una alta capacidad para neutralizar la acidez de secreciones gástricas.

*Antiinflamatorios y antisépticos:* se utilizan en este caso principalmente por vía tópica. Talcos purificados para calmar irritaciones, caolinita para reducir la inflamación y pastas de caolinita y ácido salicílico para el tratamiento de dolores musculares.

*Otras aplicaciones tópicas:* se emplean en cremas, leches y polvos para adsorber sustancias no deseadas como grasas y toxinas bacterianas. En este caso los filosilicatos son utilizados fundamentalmente como excipientes dada la facilidad de adhesividad a la piel, permitiendo una alta concentración del principio activo en la proximidad del área a tratar.

### **1.3 Estructura y propiedades de montmorillonitas**

La montmorillonita es un mineral miembro de la familia de las esmectitas y se encuentra como componente mayoritario en las bentonitas de la NorPatagonia Argentina (Vallés e Impiccini, 1999).

---



Las esmectitas son filosilicatos 2:1 con carga estructural entre 0,2 y 0,6 por media celda elemental. Una amplia variedad de cationes pueden ocupar posiciones en las hojas tetraédricas, octaédricas o en el espacio interlamina. Frecuentemente  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  se encuentran en sitios tetraédricos, mientras que  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Li}^{+}$  pueden ocupar los octaédricos. Estas sustituciones isomórficas determinan las propiedades fisicoquímicas de las esmectitas.

Las montmorillonitas se caracterizan por tener estructuras laminares compuestas por hojas poliméricas de  $\text{SiO}_4$  tetraédrico unido a láminas de (Al, Mg, Fe) (O, OH)<sub>6</sub> octaédrico. El carácter de los enlaces involucrados es intermedio entre covalente e iónico. La montmorillonita y la beidelita pertenecen al grupo de esmectitas dioctaédricas alumínicas (Tabla 1.1). La diferencia entre ambos minerales se encuentra en el sitio de la sustitución isomórfica donde se origina la carga negativa en las capas del mineral. En las montmorillonitas la carga estructural surge por la presencia de cationes divalentes como el  $\text{Mg}^{2+}$  en la hoja octaédrica mientras que en beidelita se debe a la presencia de  $\text{Al}^{3+}$  en las hojas tetraédricas. Para las montmorillonitas, la interacción entre las capas y el catión de intercambio es débil. En este caso, se produce la intercalación de agua, el hinchamiento y la separación de las capas. Esto ocurre porque la carga estructural en las montmorillonitas reside principalmente en la hoja interna octaédrica.

La fórmula estructural general de las esmectitas dioctaédricas para media celda elemental es:  $(\text{M}^{n+}_{x+y/n}n\text{H}_2\text{O})(\text{R}^{3+}_{2-y}\text{R}^{2+}_y)(\text{Si}^{4+}_{4-x}\text{Al}^{3+}_x)\text{O}_{10}(\text{OH})_2$  (Brigatti et al., 2006).

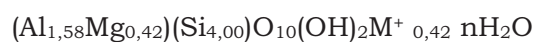
donde:

x e y indican la carga de la capa debida a sustituciones en hojas tetraédricas y octaédricas.

$\text{R}^{2+}$  y  $\text{R}^{3+}$  son los cationes divalentes y trivalentes.

$\text{M}^{n+}$  corresponde a cationes intercapa.

La fórmula estructural ideal para una montmorillonita por media celda elemental es:



Muchas aplicaciones técnicas de las esmectitas se relacionan con las reacciones que tienen lugar en el espacio interlamina. Los cationes que se

encuentran en este sitio ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) se encuentran hidratados y son intercambiables (MacEwan y Wilson, 1980; Suquet y Pezerat, 1987). Los complejos de hidratación entre capas de esmectitas pueden ser caracterizados por difracción de rayos X; el número de capas de agua varía entre cero y tres, encontrándose dos tipos de complejos de hidratación sobre la superficie del mineral: complejos de esfera interna y complejos de esfera externa. Para formar un complejo de esfera interna, los cationes deben perder agua de la primera esfera de solvatación. En un complejo de esfera externa el catión está separado de la superficie al menos por una molécula de agua (Fig. 1.8).

La hidratación de los cationes le confiere a las esmectitas una naturaleza hidrofílica y la capacidad de expandir sus capas en medios acuosos.

Existen en la literatura numerosos trabajos relacionados a la hidratación de los cationes de la intercapa (Hendricks et al., 1940; Mooney et al., 1952; Norrish, 1954, van Olphen, 1969; Suquet et al., 1977, MacEwan y Wilson, 1980; Suquet y Pezerat, 1987).

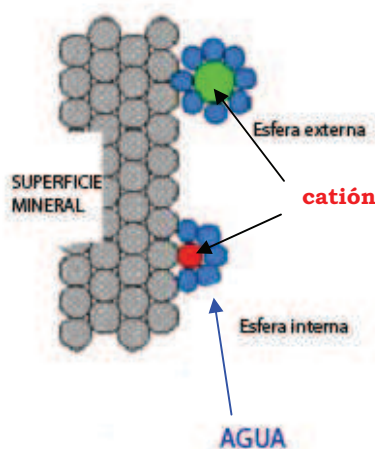


Fig 1.8- Hidratación de cationes en la superficie del mineral

Los principales factores que afectan la hidratación intercapa de las esmectitas son la energía de hidratación del catión, la polarización de las moléculas de agua próximas al catión, variaciones en el potencial electrostático superficial y localización de las sustituciones isomórficas en las capas del mineral (Brigatti et al., 2006). En montmorillonitas el  $\text{Na}^+$  se localiza

---

sobre la cavidad hexagonal donde el  $Mg^{2+}$  reemplazó al  $Al^{3+}$  en la hoja octaédrica (Chatterjee et al., 1999).

La capacidad de las esmectitas de adsorber especies catiónicas de la solución está dada por su capacidad de intercambio catiónico (CIC). Los valores de CIC se expresan en centimol o miliequivalentes de carga positiva por kilogramo o cien gramos de mineral arcilloso. Los cationes próximos a la superficie del mineral balancean su carga estructural negativa; el intercambio de cationes es reversible, estequiométrico, controlado por difusión y en muchos casos hay selectividad de un catión sobre otro (Gast, 1977). Por intercambio catiónico, las esmectitas pueden sufrir modificaciones en su estructura. La intercalación de oxi-hidróxidos poliméricos de aluminio, hierro, cromo, zinc o titanio y posterior calentamiento da origen a las arcillas pilareadas que presentan un incremento en el área superficial, porosidad, acidez y propiedades catalíticas (Brigatti et al., 2006).

#### **1.4 Reactividad de la superficie de minerales arcillosos**

En suelos y regiones subsuperficiales de la tierra, la interfaz sólido-agua controla las transformaciones químicas y biológicas que tienen lugar en estos sistemas, la calidad del agua, propiedades reológicas y la distribución y disponibilidad de nutrientes para las plantas (Hochella y White, 1990) como también el destino y transporte de sustancias orgánicas.

Los solutos orgánicos en la fase acuosa pueden interactuar con la superficie de minerales arcillosos como también con otras fases sólidas amorfas o cristalinas y sustancias húmicas. Dependiendo de la naturaleza de esta interacción, el soluto orgánico puede ser fuertemente retenido a la superficie del mineral y excluido de la solución y/o sufrir transformaciones abióticas. Si el compuesto es fuertemente retenido a la superficie, no será accesible a microorganismos del suelo y se verá reducida su biodisponibilidad.

Para analizar la reactividad de un mineral arcilloso se deben considerar los grupos funcionales superficiales presentes en cada uno de los planos de la superficie. En forma análoga a las macromoléculas biológicas, estos grupos son reconocidos como sitios activos de la superficie del mineral. Un sitio activo se caracteriza por la localización, arreglo geométrico y composición química de

---

los átomos superficiales. Entre los grupos funcionales superficiales presentes en minerales de estructura 2:1, encontramos:

- *Grupos siloxanos* presentes en el plano basal (001) del mineral. Cada grupo siloxano se representa por un ión óxido unido a dos  $\text{Si}^{4+}$  ( $\text{Si}_2\text{-O}$ ). La superficie siloxánica consiste en una capa de oxígenos apicales organizados en un retículo hexagonal cuya cavidad tiene un diámetro de 0,21 nm (Fig. 1.9).

Estos grupos actúan como dadores de electrones (bases Lewis) y su reactividad depende de la distribución de carga en las capas del mineral. Como producto de sustituciones isomórficas en las hojas tetraédricas, el exceso de cargas negativas se distribuye entre tres oxígenos basales del tetraedro que delimita el sitio de sustitución; mientras que para una sustitución en la hoja octaédrica la distribución de carga negativa tiene lugar entre diez oxígenos. Los sitios de carga negativa están separados entre 0,7 y 2 nm en la superficie basal (Schoonheydt y Johnston, 2006).

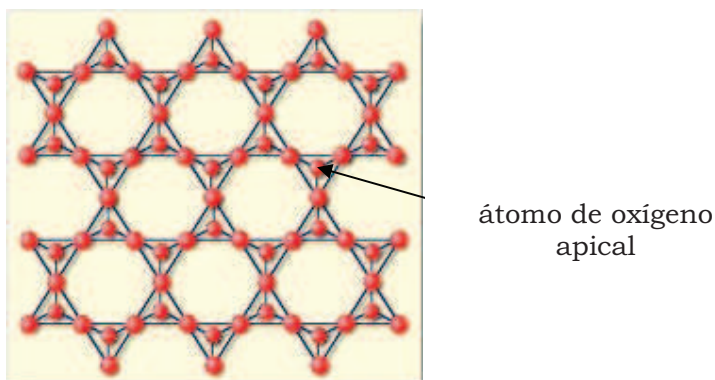


Fig.1.9- Grupos siloxanos presentes en el plano basal (001)

La hidrofiliidad de la superficie que corresponde al plano basal (001) está dada por las sustituciones isomórficas que inducen la presencia de cationes intercambiables. Los grupos siloxanos pueden formar puente hidrógeno con moléculas de agua o coordinarse directamente a cationes para compensar la deficiencia de carga. En las reacciones de intercambio catiónico pueden participar cationes inorgánicos u orgánicos. Los cationes

---

orgánicos son preferencialmente adsorbidos debido a la combinación de fuerzas atractivas electrostáticas y no electrostáticas.

Mediante estudios de dinámica molecular se determinó que la distribución de especies en las proximidades de la superficie depende de la posición de los sitios de carga negativa en las capas del mineral y que la interacción con cationes es más fuerte cuando las sustituciones isomórficas ocurren en las hojas tetraédricas próximas a la superficie del mineral (Greathouse y Spósito, 1998).

- *Cationes metálicos intercambiables.* Algunos solutos orgánicos pueden compensar sitios de coordinación del metal, coordinándose directamente al catión metálico. Los metales de transición en su mayor estado de oxidación, además de cationes alcalinos y alcalino-térreos, pueden actuar como ácidos Lewis aceptando electrones de los solutos orgánicos con los que interaccionan. En este caso la acidez superficial de los minerales arcillosos está determinada por el potencial de reducción y la hidratación del metal.
  - *Moléculas de agua correspondientes a la capa de hidratación de cationes.* Las moléculas de agua que hidratan los cationes de intercambio y los cationes estructurales en los bordes de las capas del mineral, se encuentran polarizadas. Mediante estudios espectroscópicos se determinó que las bandas de tensión y deformación del grupo-OH en el espectro IR se ven afectadas por el estado de hidratación de las esmectitas analizadas (Farmer, 1979). Las propiedades moleculares del agua están fuertemente determinadas por la naturaleza del catión de intercambio. Las moléculas de agua polarizadas sobre la superficie del mineral se comportan como ácidos de Brønsted, donando protones con más facilidad que el resto de las moléculas de agua del sistema. El comportamiento ácido de esta superficie aumenta cuando el catión presenta una elevada densidad de carga (Farmer y Mortland, 1966), pudiéndose establecer el siguiente orden para la donación de protones:  $\text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$ .
-

- *Sitios de borde.* Estos grupos surgen a partir del corte de una capa de mineral en la dirección normal al plano (001). Como resultado de este corte, los enlaces más débiles se rompen y los átomos expuestos en el borde presentan un menor número de coordinación. Los grupos funcionales de bordes pueden actuar como ácido o bases de Brønsted, siendo los grupos más activos para aceptar o liberar protones (Avena, 2006), adoptando cargas que dependen del pH del medio. Su reactividad depende del catión unido al átomo de oxígeno y de la presencia de sustituciones isomórficas próximas a la superficie (White y Zelazni, 1988). En estudios sobre tipo y densidad de grupos superficiales en los bordes de capas 2:1 de minerales arcillosos (Tournassat et al., 2004) se informó la presencia de 27 grupos superficiales diferentes; siendo  $\text{Si}^{\text{IV}}\text{-OH}$ ,  $\text{Al}^{\text{VI}}\text{-OH}$ ,  $\text{Al}^{\text{VI}}\text{Si}^{\text{IV}}\text{-OH}^{+1/2}$ ,  $\text{Al}_2^{\text{VI}}\text{-OH}$  y  $\text{Al}^{\text{VI}}\text{Mg}^{\text{VI}}\text{-OH}^{-1/6}$  los grupos de mayor densidad superficial.

La superficie basal y la superficie de los bordes de las partículas de un mineral arcilloso (Fig. 1.10) contribuyen a la reactividad total, que depende de la fracción de cada superficie expuesta a la solución. La contribución de cada superficie a la reactividad del mineral depende del tamaño y forma de la partícula.

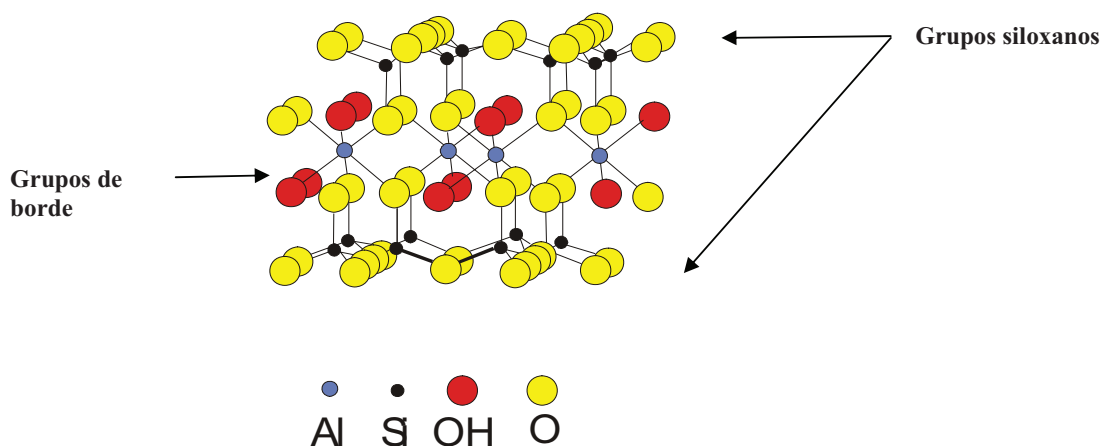


Fig. 1.10- Grupos superficiales de una capa 2:1 de mineral arcilloso

## 1.5 Localización de yacimientos en la NorPatagonia Argentina

---

La cuenca sedimentaria Neuquina presenta numerosos depósitos de bentonita que constituyen, junto a aquellos de las provincias cuyanas, los dos distritos más ricos del país en estos minerales. Gran parte de los depósitos se encuentran emplazados en la zona extraandina de la cuenca, en las provincias de Río Negro, La Pampa y Neuquén, la mayoría al Este del meridiano de 68°40' (Impiccini, 1995). En la actualidad, los yacimientos más importantes se explotan en los alrededores del Lago Pellegrini en la provincia de Río Negro (Iñíguez et al., 1972), en el Departamento Puelén, provincia de La Pampa, y en la zona de Barda Negra y Cerro Bandera, provincia de Neuquén (Fig. 1.11). Los aspectos geológicos de estos materiales han sido estudiados por Cravero et al. (1987), Vallés (1992), Impiccini (1993) y Vallés y Giaveno (1993).

Los yacimientos, explotados en canteras a cielo abierto, proveen a seis plantas de procesamiento distribuidas en la región donde las bentonitas se muelen, mezclan y embolsan, obteniéndose productos que abastecen mercados nacionales y latinoamericanos. Al tratarse de bentonitas sódicas naturales, por sus propiedades reológicas, adsorbentes, elevado grado de hinchamiento y superficie específica, se utilizan para la preparación de fluidos de inyección de pozos de petróleo, como arenas de moldeo para fundición, para pellets de minerales de hierro, para impermeabilización de obras hidráulicas, y en la industria cerámica (Lombardi, 2004).

---

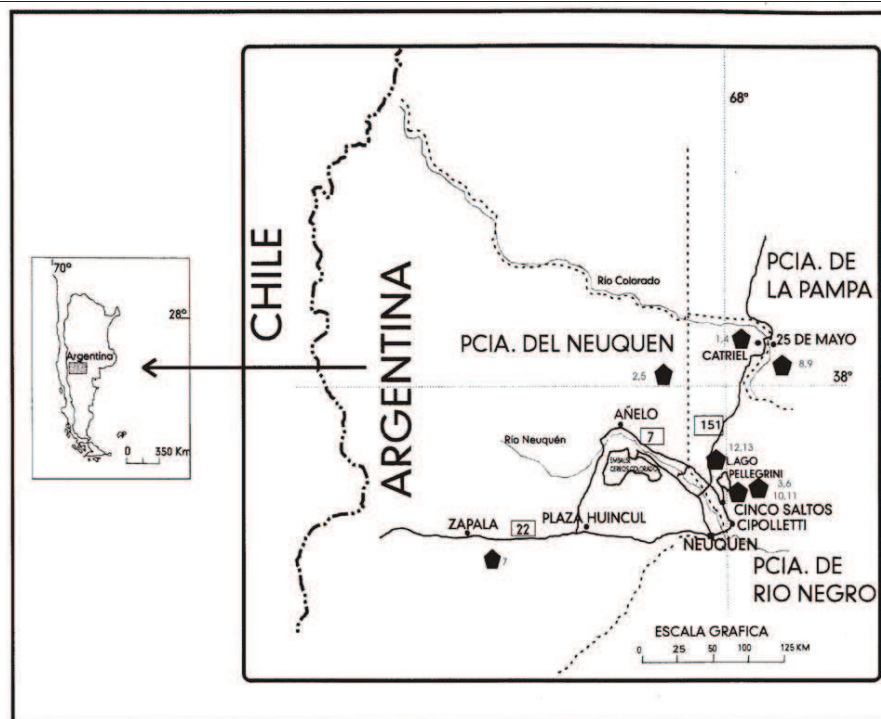


Fig. 1.11- Principales depósitos de la cuenca sedimentaria neuquina (Lombardi, 2004)

### 1.6 Caracterización y propiedades fisicoquímicas del mineral arcilloso seleccionado para los estudios de adsorción.

La mayor parte de la caracterización general del mineral estudiado fue realizada previamente por Lombardi (2004). El mineral arcilloso seleccionado para el presente estudio proviene del sudoeste de la provincia de La Pampa, en el departamento Puelén, a 25 Km al sur de la localidad de 25 de mayo y a 5 Km de la margen izquierda del río Colorado, en las áreas de los yacimientos de petróleo y gas, La Pampa y Medanito, respectivamente.

La composición mineralógica de la muestra seleccionada fue determinada por difracción de rayos X (DRX) y el porcentaje de los diferentes minerales presentes fue calculada utilizando los datos obtenidos por DRX y análisis químico (Viseras et al., 2006). Se determinó presencia de 98 % de esmectita y 2% de cuarzo. El alto contenido en montmorillonita encontrado en la muestra permite clasificarla como bentonita de alta pureza.

Los análisis químicos de la fracción menor de  $2\mu\text{m}$  de la muestra (Tabla 1.2) fueron realizados por espectroscopia de emisión de plasma (ICP) (Lombardi, 2004) y a partir de los resultados obtenidos se calculó el tipo y



grado de sustitución isomórfica tetraédrica y octaédrica de las muestras (Tabla 1.3). La fórmula estructural se determinó utilizando el procedimiento indicado por [Siguín et al. \(1994\)](#).

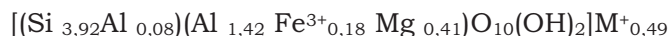
Tabla 1.2- Composición química de la muestra expresada como % de óxidos respectivos ([Lombardi, 2004](#)).

muestra	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
714	58,30	18,80	0,28	4,06	2,30	0,24	3,49	<0,01	0,73	0,04

Tabla 1.3- Grado de sustitución isomórfica: tetraédrica (σ), octaédrica por Fe (φ), octaédrica por Mg (μ) y total (γ) de la muestra de montmorillonita (expresado en %)([Lombardi, 2004](#)).

muestra	Tetraédrica	Octaédrica			Total
	σ %	Fe <sup>3+</sup> (φ%)	Mg <sup>2+</sup> (%μ)	%α=φ+μ	%γ=α+σ
714	2,00	9,00	20,50	29,50	31,50

La fórmula estructural de la montmorillonita utilizada para media celda unidad es:



donde M<sup>+</sup> corresponde mayoritariamente a cationes sodio (montmorillonita sódica natural).

Los elementos traza presentes en doce muestras de esmectitas de la NorPatagonia Argentina fueron analizados por ICP ([Viseras et al., 2006](#)) para determinar la posibilidad de utilización en formulaciones farmacéuticas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1.12. y se comparan con los valores obtenidos para filosilicatos 2:1 grado farmacéutico ([Viseras y López-Galindo, 1999](#)) y arcillas comerciales españolas ([Mascolo et al., 1999](#)). Teniendo en cuenta que los límites establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para los elementos Pb y As son 40 y 5 ppm respectivamente para bentonitas y 15 y 3 para montmorillonitas; los minerales extraídos de los yacimientos regionales cumplen con los límites establecidos para bentonitas purificadas ([USP, 2004a,b](#)).

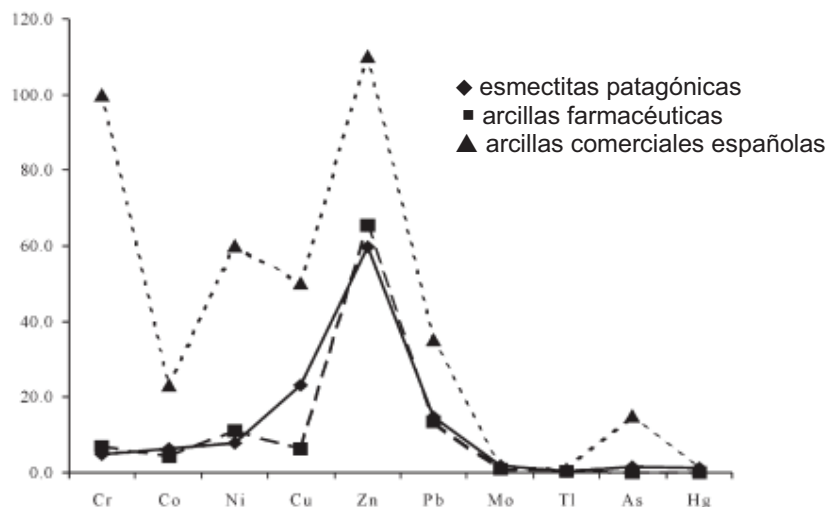


Fig. 1.12- Elementos traza promedio (ppm) en arcillas de distinto origen (Viseras et al., 2006)

Para las muestras totales y fracción menor de  $2\mu\text{m}$  se determinó la capacidad de intercambio catiónico (Lombardi, 2004) poniendo en contacto la muestra, previamente homoionizada con  $\text{Na}^+$ , con solución 1M de cloruro de amonio. El valor de CIC para la muestra natural fue de 104 meq/100g y 101 meq/100 g para la fracción menor a  $2\mu\text{m}$ . La superficie específica determinada utilizando etilenglicolmonoetil éter (EGME) es  $607\text{ m}^2/\text{g}$  para el mineral natural y  $763\text{ m}^2/\text{g}$  para la fracción menor a  $2\mu\text{m}$  (Lombardi, 2004).

Aplicando la Ec.11 y teniendo en cuenta la superficie del mineral arcilloso utilizado en el presente estudio ( $607\text{ m}^2/\text{g}$ ) y su capacidad de intercambio iónico (104 meq/100g), se puede determinar que la superficie de mineral disponible (S) para un equivalente de adsorbato catiónico monovalente es  $0,97\text{ nm}^2$  considerando la superficie total y  $0,88\text{ nm}^2$  para la superficie interna.

$$S = \frac{SE \times 10^{18}}{CIC \times N} \quad (\text{Ec.11})$$

donde:

SE: superficie específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )

CIC: capacidad de intercambio catiónico (Eq/g)

N: n° de Avogadro

Los valores de IEP de las muestras naturales y la fracción arcilla se determinaron por medición del potencial de difusión equilibrando la muestra a

pH 2 y en medio de KCl  $10^{-3}$  M, obteniéndose valores de 1,8 para muestra total y 3,6 para fracción menor a 2  $\mu\text{m}$ .

El análisis microbiológico del mineral (Viseras et al., 2006) revela que la cantidad total de bacterias patógenas se encuentra por debajo del límite establecido por la USP (menor a 5000 UFC/g). Otros requerimientos farmacológicos como pH de la dispersión acuosa y volumen de sedimento fueron considerados, encontrándose resultados que corresponden a esmectitas sódicas y sistemas con elevada tendencia a coagular (Tabla 1.4).

Tabla 1.4- Propiedades de la suspensión acuosa del mineral (Viseras et al., 2006)

Muestra	pH (4g/100mL)	Volumen de sobrenadante (3g/100mL)	Volumen sedimentado (2g/100mL)
714	9,0 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0,5	23 $\pm$ 1,0

Del análisis granulométrico del mineral (Viseras et al., 2006) se puede observar que la mitad del total de partículas de la esmectita tienen tamaño menor a 1  $\mu\text{m}$ , mientras que el tamaño de todas las partículas se encuentra por debajo de los 20  $\mu\text{m}$  (Tabla 1.5).

Tabla 1.5- Granulometría (%) del mineral (Viseras et al., 2006).

Muestra	<1 $\mu\text{m}$	1-2 $\mu\text{m}$	2-5 $\mu\text{m}$	5-20 $\mu\text{m}$
714	50,43	21,16	20,42	7,99

## 1.7 Experimental:

### 1.7.1 Separación de la fracción montmorillonita del mineral.

Las bentonitas están formadas por minerales arcillosos esmectíticos (montmorillonitas) y en menor proporción por otros minerales, sustancias húmicas, óxidos de hierro y calcita. El pequeño tamaño de partícula de la montmorillonita (menor de 2 $\mu\text{m}$ ) permite su separación de la muestra total (bentonita) mediante centrifugación o por decantación.

La separación de la fracción menor de 2 $\mu\text{m}$  de la bentonita se realizó poniendo en contacto 5 g del material seco, molido y tamizado (200 mesh) con 200 mL de agua destilada y centrifugando primeramente a 2000 rpm (650 x *g*) durante 2 minutos utilizando una centrífuga Sorvall RC 5C (rotor Sorvall

GSA). Se recuperó el sobrenadante donde se encuentra la fracción de montmorillonita y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm (10000 x g) durante 30 minutos para recuperar la muestra sólida.

El tiempo de sedimentación de partículas en medio acuoso (T) en función de la velocidad angular (N) de centrifugación se calculó a partir de la Ec.12 (Ross y Morrison, 1988):

$$T = (\eta x \log R / R_1) \sqrt[3]{3,81 x r^2 x N^2 x (\rho - \rho_o)} + 2(t_a + t_d) / 3 \quad (\text{Ec.12})$$

donde:

$t_a$ = tiempo de aceleración (s)

$t_d$ = tiempo de desaceleración (s)

$\eta$ = viscosidad del medio líquido (poises)

$R_1$ =radio axial inicial (cm)

$R$ = radio axial final (cm)

$r$ =radio de la partícula (cm)

$\rho$ = densidad de la partícula (g/cm<sup>3</sup>)

$\rho_o$ = densidad del medio líquido (g/cm<sup>3</sup>)

### 1.7.2 Homoionizado de montmorillonita con iones Ca<sup>2+</sup>

Se puso en contacto durante 24 h la montmorillonita con un volumen adecuado de solución de CaCl<sub>2</sub> 1N de manera que los miliequivalentes de Ca<sup>2+</sup> agregados sean cinco veces superior a la CIC del mineral. Se mantuvo el sistema en agitación constante para favorecer el intercambio de iones Na<sup>+</sup> por Ca<sup>2+</sup> y luego se centrifugó a 8000 rpm (10410 x g) durante 30 minutos. Posteriormente se lavó la montmorillonita con agua destilada hasta que el ensayo de iones cloruro en el sobrenadante resultó negativo. Para la determinación de cloruros se utilizó una solución de AgCl 0,1 M.

### 1.7.3 Concentración crítica de coagulación (CCC) del mineral arcilloso. Efecto del electrolito

A fin de evaluar el efecto de la concentración la solución utilizada como electrolito en la coagulación de una dispersión acuosa del mineral, se determinó la concentración crítica de coagulación en presencia de NaCl como electrolito, sin control del pH del sistema.

Se prepararon las dispersiones del mineral seco y molido (100mg/10mL) en tubos de 250 mL agregando soluciones de cloruro de sodio cuyas concentraciones variaron entre  $3 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-2}$  M. Los tubos fueron agitados en vortex a fin de obtener un sistema homogéneo y luego se mantuvieron en agitación constante durante 6 horas; posteriormente fueron centrifugados a 3000 rpm ( $1409 \times g$ ) durante 5 minutos. Se llevaron a cabo las lecturas de % transmitancia de los sobrenadantes a 420nm utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU 240.

### 1.7.4 Difracción de rayos X (DRX)

Para el análisis por difracción de rayos X se siguieron procedimientos de rutina recopilados de [Brindley y Brown \(1980\)](#) y [U. S. Geological Survey \(1984\)](#). Se prepararon dispersiones de la montmorillonita natural y homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$  (15 mg/mL) en agua destilada y también en solución de NaCl 0,01M. Se agitó en vortex hasta homogeneizar completamente el sistema y 2 mL de dispersión fueron depositados sobre portaobjetos, lográndose así un preparado orientado según (001), a efectos de resaltar los parámetros basales.

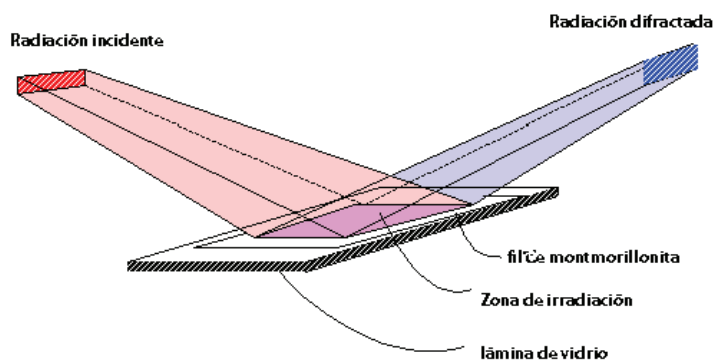


Fig. 1.13- Preparado orientado para el análisis por DRX.

Las muestras se dejaron secar durante 48 horas a 20°C y 36% de humedad relativa.

Los diagramas de DRX fueron obtenidos utilizando un difractor Rigaku DII Max Geigerflex equipado con ánodo CuK $\alpha$ ,  $\lambda=1,5414 \text{ \AA}$ , filtro de Ni, a 40 kV, 20 mA y goniómetro horizontal.

Los registros se realizaron entre 2° y 40° (2 $\theta$ ), con una velocidad de 2°/min. La interpretación de los diagramas se llevó a cabo con el software MDI Jade 7 y el análisis matemático de los picos, cuando correspondió, se realizó utilizando el programa PEAKFIT v4.

### **1.7.5 Métodos espectroscópicos**

#### **Espectroscopia UV-visible:**

Se registraron los espectros UV-vis de dispersiones acuosas diluidas del mineral arcilloso natural y homoionizado con Ca<sup>2+</sup> (0,45 mg/mL). Con el objetivo de seleccionar las condiciones experimentales que minimicen la dispersión de la luz por las partículas de arcilla en suspensión para la cuantificación de adsorbatos en solución, se registraron los espectros del sobrenadante de la dispersión de las montmorillonitas centrifugadas bajo diferentes condiciones. Las dispersiones fueron centrifugadas a 6000 rpm (4025 x *g*), 8000 rpm (7155 x *g*) y 10000 rpm (11180 x *g*) durante distintos tiempos (10 a 30 minutos) utilizando una centrifuga Sorvall RC 5C (rotor SM24). Los espectros fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU 240 con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

#### **Espectroscopia IR:**

Los espectros IR fueron registrados utilizando un Espectrofotómetro BUCK 500 (detector DLATGS) en la región 600-4000 cm<sup>-1</sup>. El KBr utilizado como soporte para la preparación de pastillas fue secado a 110°C durante 24 h para minimizar la presencia de agua absorbida y de esta manera obtener una mejor resolución en la región de vibraciones de tensión del grupo -OH (3800-3200 cm<sup>-1</sup>). Se prepararon pastillas de KBr del mineral natural y del mineral homoionizado con iones Ca<sup>2+</sup> (3 mg/300mg KBr) utilizando una prensa Beckman 00-25 (7,5 toneladas).

---

### 1.7.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las partículas se determinó por microscopía electrónica de barrido con análisis de EDX en un equipo Philips SEM-JEOL-515; las muestras fueron recubiertas con un film conductor de oro, siguiendo la técnica de [Goldstein y Muldoon \(1977\)](#).

## 1.8 Resultados y Discusión

### 1.8.1 Concentración crítica de coagulación del mineral arcilloso. Efecto del electrolito

La Fig.1.14 muestra los % transmitancia (%T) de dispersiones acuosas del mineral arcilloso preparadas a distintas fuerzas iónicas. Elevados valores de %T corresponden a una mayor coagulación del mineral, mientras que bajos valores de %T indican dispersión del mineral en el medio acuoso.

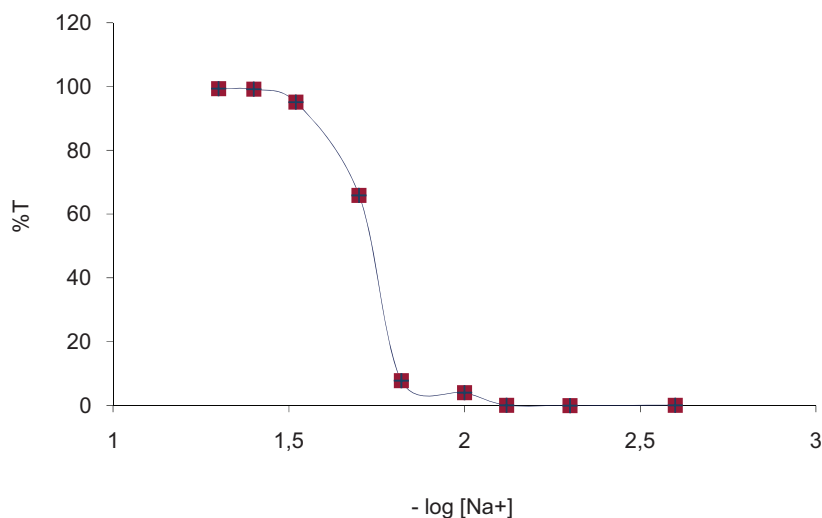


Fig. 1.14- Valores de transmitancia de dispersiones acuosas del mineral arcilloso para distintas fuerzas iónicas.

Para una concentración de NaCl 0,02 M se observa un valor de 70 %T y un cambio de las condiciones de dispersión. Este valor de concentración puede ser considerado como CCC (Baschini et al., 1999) para el mineral seleccionado en el presente estudio.

La concentración de cationes Na<sup>+</sup> en la dispersión correspondiente a CCC (200 meq/100g) es superior a la CIC del mineral. Esta elevada concentración iónica ocasiona que las láminas de mineral coagulen.

Se seleccionó como electrolito para los estudios de adsorción una solución de NaCl 0,01 N ya que la correspondiente fuerza iónica se encuentra levemente por debajo de la CCC, con lo cual es posible conservar la estabilidad del sistema coloidal durante la experiencia.

### **1.8.2 Difracción de rayos X (DRX)**

Las técnicas instrumentales de identificación de materiales cristalinos de pequeño tamaño de partícula son las más utilizadas para caracterizar minerales arcillosos. El método de difracción de rayos X se encuentra entre los más usados para obtener información acerca de las dimensiones cristalinas, composición química y secuenciación de láminas. Esta técnica también es utilizada para cuantificar la abundancia de minerales en materiales ricos en arcillas.

En la Fig. 1.15 se observan los diagramas de DRX obtenidos a partir de dispersiones acuosas correspondientes a montmorillonita natural sódica cuyas reflexiones corresponden a  $d(001)$  12,7 Å,  $d(002)$  6,2 Å y  $d(004)$  3,1 Å y a montmorillonita cálcica con valores  $d(001)$  15,4 Å,  $d(002)$  5,1 Å y  $d(004)$  3,0 Å.

---



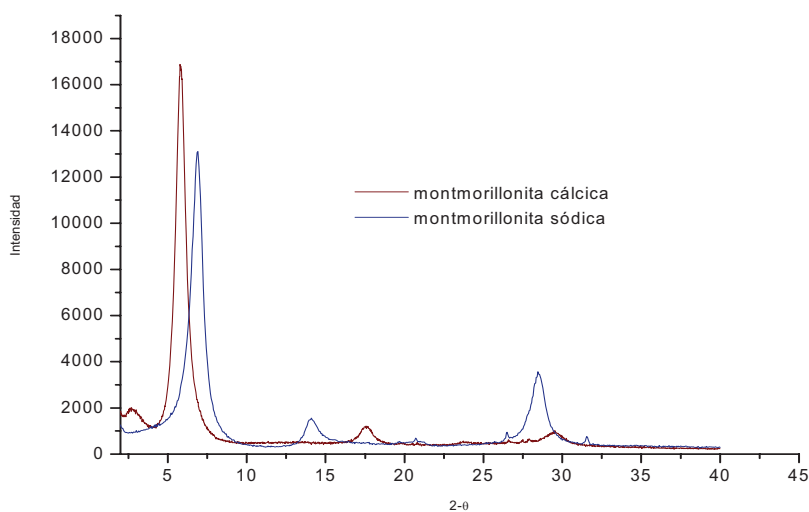


Fig. 1.15- Diagrama DRX obtenido a partir de dispersiones acuosas de montmorillonita sódica natural y montmorillonita cálcica.

El espaciado basal de 12,7 Å observado en el diagrama de la muestra natural dispersa en agua es característico de una montmorillonita sódica con una monocapa de agua en la región intercapa. Asimismo, en la muestra homoionizada con calcio el espaciado basal de 15,44 Å caracteriza a una montmorillonita cálcica (Moore y Reynolds, 1997).

En presencia de electrolito NaCl 0,01M las reflexiones de ambas montmorillonitas se modifican (Fig. 1.16), observándose picos con un mayor ensanchamiento y cambios en los valores de  $2\theta$ .

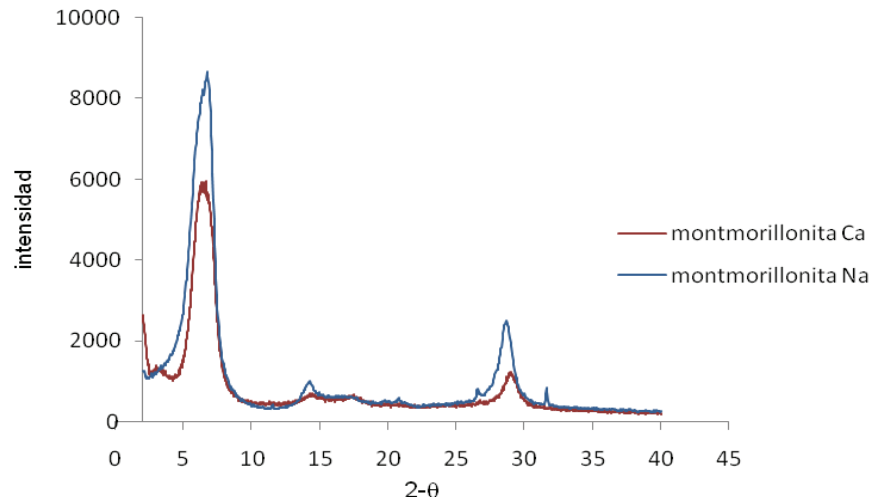


Fig. 1.16- Diagrama DRX obtenido a partir de dispersiones de montmorillonita sódica natural y montmorillonita cálcica en NaCl 0,01 M.

En las Fig. 1.17 y 1.18 se muestran los ajustes entre los picos experimentales y la resultante de la suma de las tres curvas Gaussianas correspondientes a montmorillonita sódica natural y cálcica respectivamente en soluciones de NaCl 0,01 M.

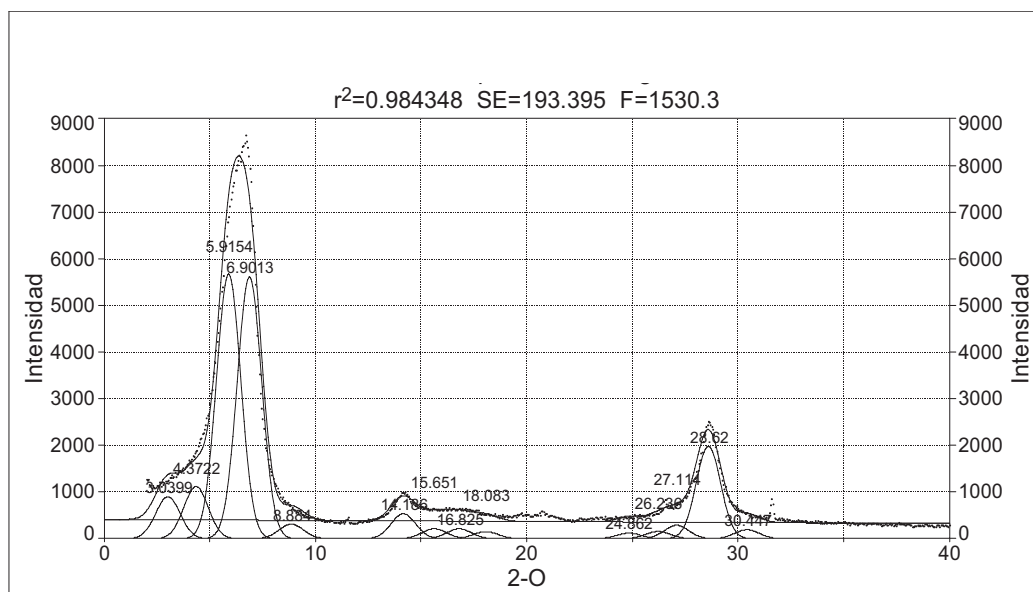


Fig. 1.17 - Descomposición matemática del diagrama DRX de montmorillonita natural en NaCl 0,01M

Para la montmorillonita natural la reflexión (001) se descompone en dos picos a valores de 5,92 y 6,90°  $2\theta$  correspondientes a espaciados basales de 14,9 y 12,8 Å. La presencia de dos reflexiones evidencia distinto grado de hidratación en la intercapa del mineral. Se puede asignar la formación de una monocapa para el espacio intercapa de 12,8 Å y una bicapa para 14,9 Å. Similares resultados fueron encontrados por otros autores (Pantanetti et al., 2008) para montmorillonita homoionizada con  $\text{Na}^+$  y suspendida en NaCl 0,1 M.

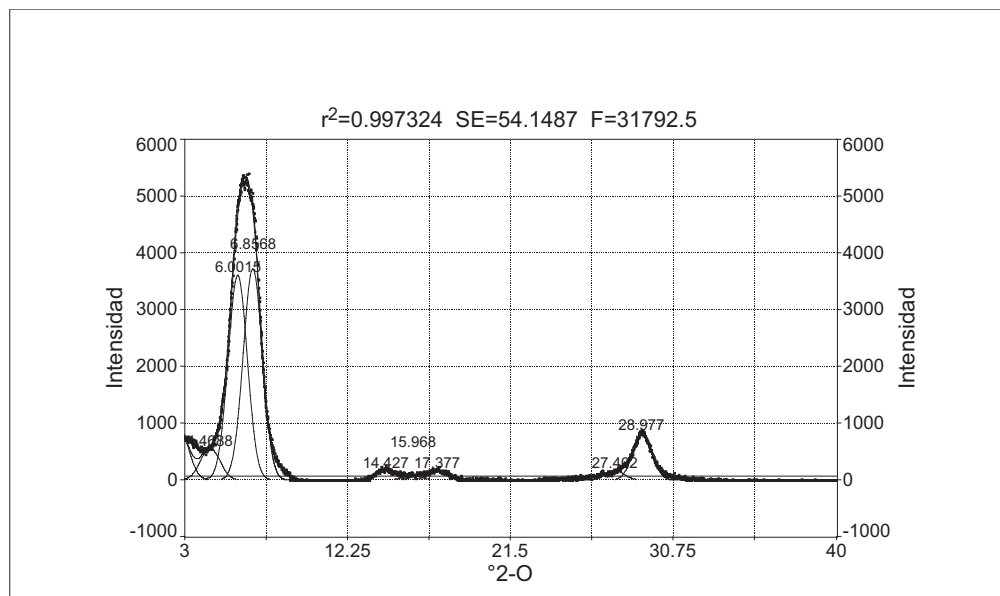


Fig. 1.18- Descomposición matemática del diagrama DRX de montmorillonita cálcica en NaCl 0,01M

Para la montmorillonita cálcica dispersa en solución de NaCl, la reflexión (001) se descompone en dos reflexiones a valores de 6,00 y 6,86° 2θ correspondientes a espaciados basales de 14,7 y 12,9 Å. En este caso, el sodio utilizado como electrolito soporte en concentraciones 100 veces superiores a la del catión de intercambio, puede competir con parte del calcio intercambiable, obteniéndose un espaciado basal característico de montmorillonita sódica (12,9 Å) además de la reflexión correspondiente al mineral con Ca<sup>2+</sup> como catión de intercambio (14,7 Å).

### 1.8.3 Espectroscopia UV-vis

El principal problema del análisis por métodos espectroscópicos de dispersiones acuosas de minerales arcillosos es la excesiva dispersión de luz e insuficiente transmitancia como consecuencia de la elevada densidad óptica de la suspensión.

La Fig. 1.19 muestra el espectro UV-vis de dispersiones acuosas diluidas, donde se observa el estado de dispersión de las partículas del mineral en sistemas que se mantuvieron estables durante el tiempo de análisis.

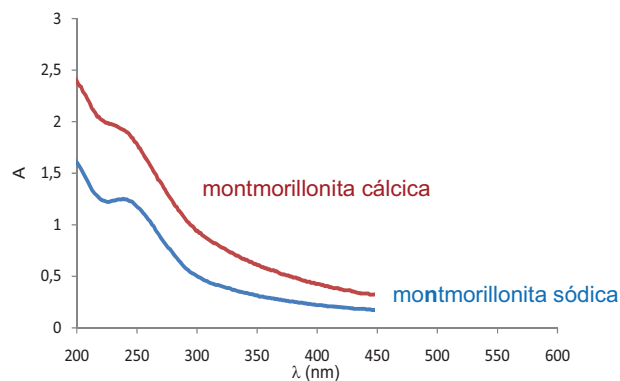


Fig. 1.19- Espectro UV vis de dispersiones de minerales arcillosos (0,45 mg/mL)

La centrifugación de la dispersión del mineral reduce significativamente el número de partículas en el sistema acuoso principalmente en la región del espectro correspondiente a radiación visible. A modo de ejemplo, la Fig. 1.20 muestra el espectro de una dispersión del mineral que fue centrifugada a 8000 rpm (7100 x  $g$ ) durante 30 minutos.

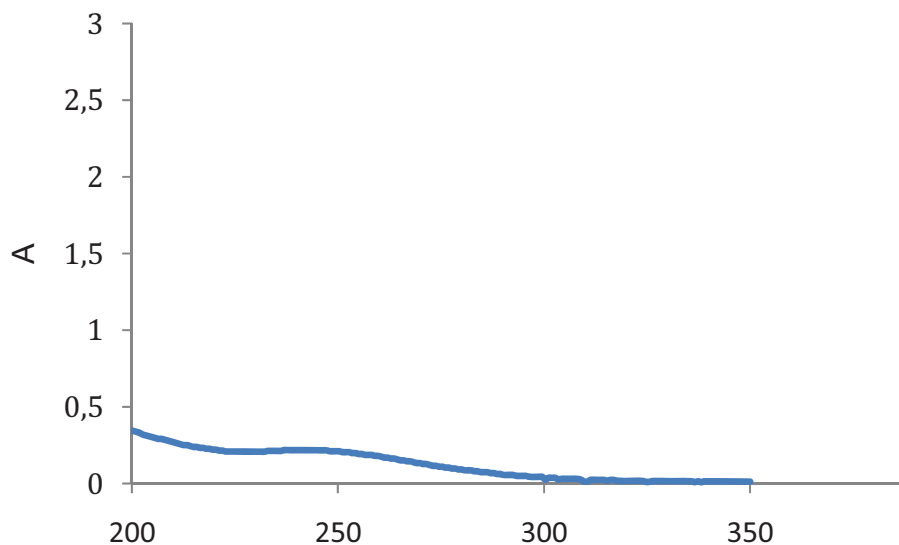


Fig. 1.20- Espectro UV vis de dispersión del mineral arcilloso centrifugado.

### 1.8.4 Espectroscopia IR

La espectroscopía infrarroja es un método complementario a la difracción de rayos X para el análisis de minerales arcillosos. El espectro IR de un mineral ofrece información sobre estructura y grado de regularidad, naturaleza de las sustituciones isomórficas, permite diferenciar agua molecular de grupo hidroxilo estructural y la presencia de impurezas cristalinas y no cristalinas (Farmer, 1979). En muchos casos, es posible identificar el mineral mediante el análisis de su espectro IR.

La Fig. 1.21 muestra el espectro IR correspondiente al mineral arcilloso seleccionado para el presente estudio y el mineral con  $\text{Ca}^{2+}$  como catión de intercambio.

El proceso de homoionizado no produce cambios en la bandas que corresponden a los grupos estructurales del mineral.

La interpretación de los espectros obtenidos en la región del IR medio ( $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a los autores Farmer y Russell (1964), Farmer (1979) y Russell y Fraser (1994) y se presenta en la Tabla 1.6.

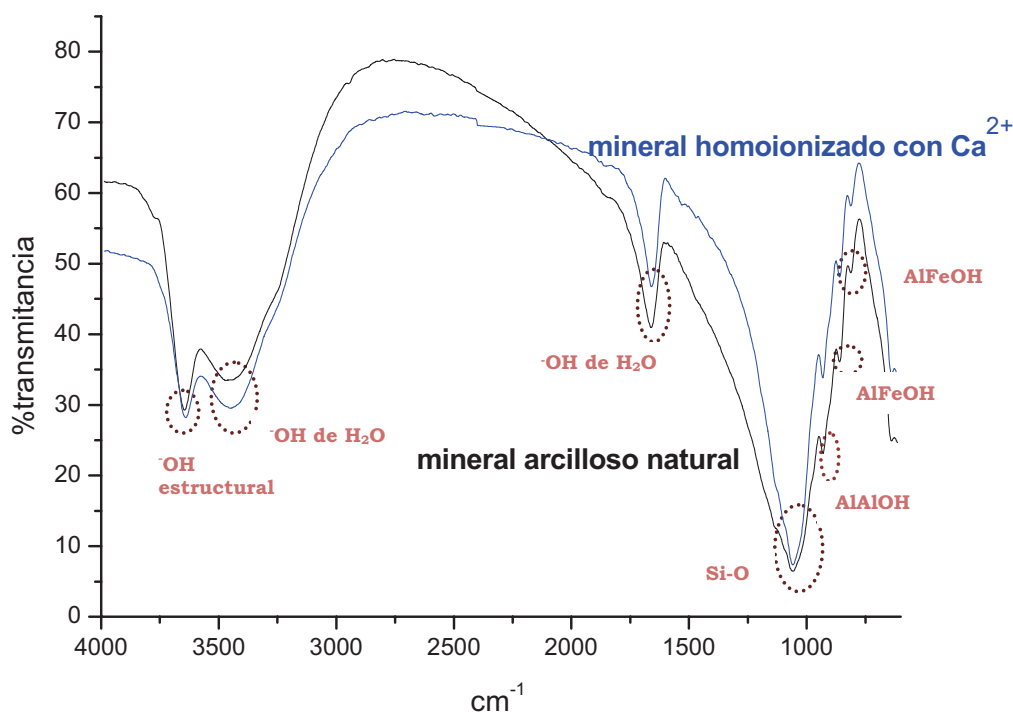


Fig. 1.21- Espectro IR en KBr del mineral arcilloso natural y homoionizado con  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tabla 1.6- Asignación de bandas de absorción IR para muestras preparadas en KBr.

Posición (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3632	tensión -OH estructural
3422	tensión -OH de agua
1634	deformación -OH de agua
1041	tensión Si-O
917	deformación AlAlOH
885	deformación AlFeOH
842	deformación AlFeOH

En la Fig. 1.22 se presentan los espectros IR del mineral seleccionado para los estudios de adsorción y la montmorillonita de Wyoming SWy-2.

No se observan modificaciones en las posiciones e intensidades de las bandas correspondientes a los grupos presentados en la estructura de la montmorillonita utilizada en el estudio respecto de la montmorillonita patrón; sólo se observan cambios en las intensidades de las bandas correspondientes a las frecuencias de los modos vibracionales del agua.

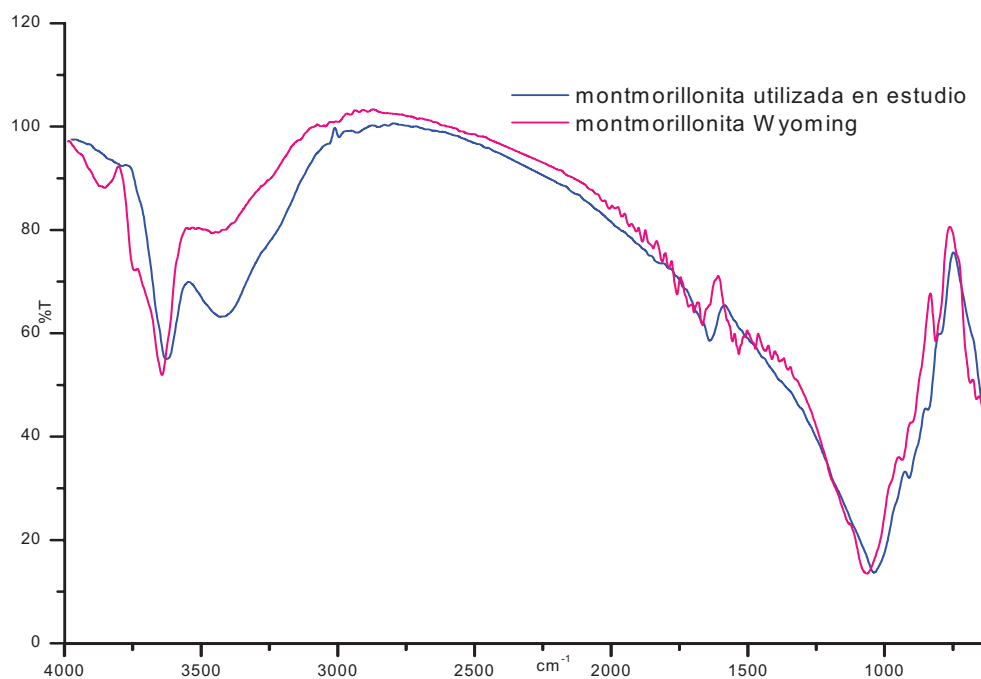


Fig. 1.22- Espectros IR del mineral arcilloso natural y montmorillonita de Wyoming en KBr.

### 1.8.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La montmorillonita seleccionada para el presente estudio presenta una morfología de partículas con hábitos laminares y bordes crenulados (Fig. 1.23) característica de las esmectitas.

El análisis de diferentes regiones de la muestra, reveló una gran homogeneidad en la disposición de las láminas en un arreglo tridimensional, del tipo cara-cara y cara-borde. Esta segunda asociación entre partículas, debido a la baja sustitución isomórfica tetraédrica de 2% (Tabla 1.3) en las caras de la muestra, está generada principalmente por unión entre los bordes cargados positivamente y las caras cargadas negativamente.

El análisis EDAX de la montmorillonita homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$  mostró que el elemento mayoritario es Si y luego en menor abundancia el Al, Fe, Ca y Na, confirmando el análisis químico de la muestra.

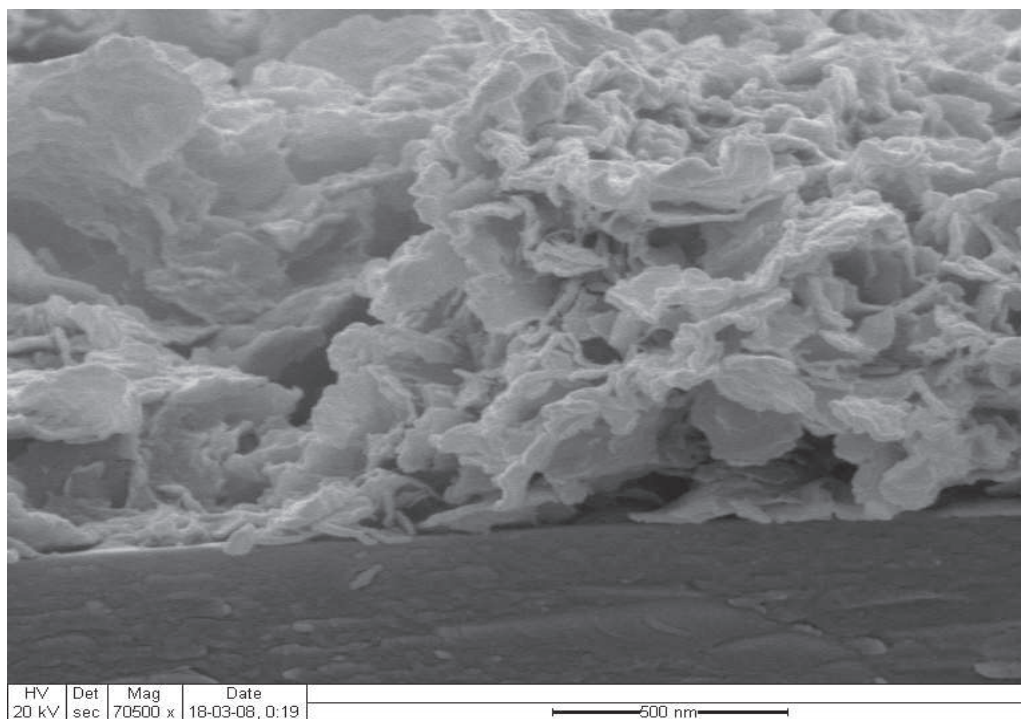


Fig. 1.23- Microfotografía SEM de la montmorillonita homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$ .



## 1.9 Conclusiones

Las bentonitas de la región NorPatagónica Argentina tienen como componente mayoritario a la montmorillonita. Para la elección del adsorbente utilizado en el presente estudio se tuvo en cuenta, además de la composición y disponibilidad del mineral, las características superficiales del mismo como son el área superficial y la capacidad de intercambio catiónico. La montmorillonita seleccionada presenta elevada superficie específica y capacidad de intercambio iónico, propiedades esenciales para su utilización como adsorbente. Las observaciones realizadas por microscopía electrónica evidenciaron, predominancia de asociación tipo “cara-cara” entre partículas, indicándola como buen adsorbente de moléculas polares en la intercapa.

Las dispersiones acuosas del mineral arcilloso mostraron ser estables en presencia de NaCl hasta una concentración igual o menor a 0,01 M. La centrifugación de la dispersión del mineral (7155 x *g*) reduce significativamente el número de partículas en el sistema acuoso y permite el análisis del adsorbato en la solución por espectroscopia UV-vis.

Debido a que el espaciado basal de la montmorillonita está determinado por el grado de hidratación del mineral y por los cationes de intercambio presentes en la intercapa, el análisis de las reflexiones observadas en los diagramas de DRX debe considerar ambos factores.

---

---

## **2 ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA. GENERALIDADES Y EXPERIMENTOS CON TETRACICLINA.**

### **2.1 Utilización de antibióticos y su distribución en el medio ambiente.**

El término antibiótico se asigna normalmente a un amplio rango de compuestos, naturales o semisintéticos, que poseen actividad antibacteriana (Kanfer et al., 1998). Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, cientos de antibióticos están disponibles para su utilización en el tratamiento de enfermedades en humanos y animales, como promotores de crecimiento y para mejorar la eficiencia de la alimentación (Adison, 1984). Actualmente, los antibióticos tienen un rol importante en prácticas agrícolas modernas e industrias ganaderas y su utilización se ha incrementado en muchos países desarrollados. El uso que de ellos se hace, como preventivo y en el tratamiento de diversas infecciones, ha logrado que estos compuestos sean unos de los más ampliamente difundidos para el cuidado de la salud humana y animal (Chambers, 2001).

Debido a la alta solubilidad en agua que presentan estos compuestos químicos, son excretados en elevadas proporciones por los organismos a través de orina y heces, estas últimas utilizadas en ocasiones como abonos de suelos. Los residuos procedentes de las industrias farmacéuticas así como los hospitalarios constituyen otras vías de acceso de los antibióticos al ambiente, generando un ciclo que les permite llegar con cierta facilidad a las aguas superficiales, suelos e incluso aguas subterráneas, donde se encuentran en concentraciones del orden de unos pocos nanogramos a microgramos por litro o kilogramo (Grung et al., 2008). Se han encontrado antibióticos en zonas cercanas a lagunas con desechos de la cría de cerdos en concentraciones de 0,7 mg/L, manifestando que estos compuestos han sido transportados a través de los contornos arcillosos que se encuentran generalmente en zonas de desechos (Meyer et al., 2000).

La presencia de antibióticos en el medio acuático ha despertado dos potenciales problemas. Por un lado, la continua exposición de microorganismos a residuos de antibióticos incorporados al ambiente contribuye a generar resistencia en las poblaciones microbianas y, además,

---

pueden actuar como sustancias tóxicas para diferentes organismos acuáticos, llegando a producir efectos adversos en edades tempranas de su desarrollo (Wollemberg et al., 2000; Kümpel et al., 2001; Aksu y Tunç, 2004). El incremento de bacterias resistentes en efluentes de hospitales y plantas farmacéuticas ha sido informado por varios autores (Witte, et al., 1998; Goni-Urriza et al., 2000), siendo un potencial problema para la salud pública el destino final de los antibióticos.

Los procesos de adsorción, desorción y degradación en suelos son determinados por las propiedades fisicoquímicas del antibiótico, tales como sus constantes de acidez y solubilidad en agua. Cuando estos compuestos químicos entran en contacto con los suelos son capaces de reaccionar y formar complejos principalmente con los minerales arcillosos que los componen, tales como las montmorillonitas, vermiculitas, illitas y caolinitas.

Los antibióticos pertenecientes a las tetraciclinas (TCs) y las sulfonamidas (SAs) constituyen un grupo importante dentro de las prácticas medicinales. Las TCs son los antibióticos utilizados más ampliamente en los Estados Unidos en medicina veterinaria (Yang y Carlson, 2003). Las tetraciclinas constituyen un grupo de agentes antibacterianos de amplio espectro, muy utilizados contra microorganismos gram-positivo y gram-negativo, que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. En particular, los agentes antimicrobianos como las tetraciclinas son utilizados en el tratamiento de enfermedades periodontales causadas por microorganismos que crecen en la placa dental (Goodson et al., 1991; Vandekerckhove et al., 1997). La tetraciclina, clindamicina y eritromicina son frecuentemente utilizadas en aplicaciones tópicas. El tratamiento antibiótico tópico es reconocido como efectivo y seguro para el tratamiento del acné (Toyoda y Morohashi, 1998).

Sin embargo, el uso sistemático de antibióticos de amplio espectro, como las tetraciclinas, puede causar un incremento en la resistencia bacteriana o interferencia con otras drogas produciendo varios efectos adversos. Por lo tanto, ha sido sugerida la administración de drogas antimicrobianas directamente en la cavidad periodontal como una forma de evitar complicaciones sistémicas y alcanzar áreas localizadas de destrucción periodontal. Las tetraciclinas se encuentran entre los antibióticos más ampliamente utilizados para la liberación local siendo incorporadas en una

---

amplia variedad de sistemas de liberación como fibras poliméricas, bandas acrílicas, formulaciones con colágeno, bálsamos y pastas, para la inserción en cavidades periodontales (Esposito et al., 1997).

## 2.2 Propiedades fisicoquímicas de los antibióticos seleccionados como adsorbatos.

Las tetraciclinas son drogas polares anfóteras, inestables en medios ácidos o alcalinos y susceptibles a fotodegradación. Como se observa en su estructura (Fig.2.1), están constituidas por cuatro anillos fusionados, de ahí su denominación, y un sistema cromóforo común (anillos B, C y D) que les confiere un color amarillo.

Unidos a estos cuatro anillos se presentan grupos funcionales hidroxilo, amida, amina, carbonilos y metilos.

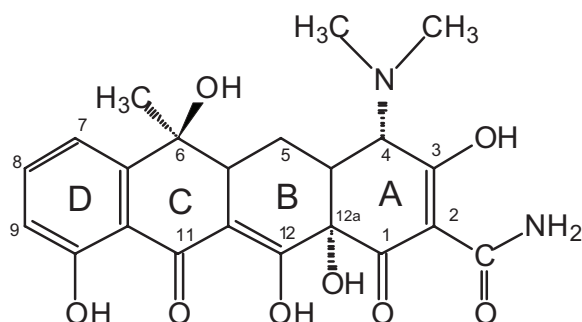


Fig.2.1- Estructura química general de las tetraciclinas.

Los compuestos pertenecientes a esta familia de antibióticos presentan la siguiente composición: las posiciones 1,3,10,11,11a,12,12a, no sufren modificaciones, el grupo acilo se encuentra en la posición 2, dimetilamino en la posición 4, en la posición 5 se puede encontrar el grupo hidroxilo, carbonilo o hidrógeno, la posición 6 puede presentar grupos que le otorguen mayor estabilidad o actividad a la droga, la posición 7 puede presentar los grupos Cl, F, Br, NO<sub>2</sub>, y aminas terciarias (Tabla 2.1), la posición 8 puede presentar grupos donantes de electrones y los grupos en posición 9 determinan las propiedades del antibiótico en relación a la resistencia bacteriana (Gringauz, 1997).

La actividad biológica *in vivo* de las tetraciclinas está relacionada con su estructura y propiedades estereoquímicas. Los grupos funcionales en posiciones 5, 6 y 7 pueden variar sin alterar la actividad antimicrobiana mientras que las configuraciones de los carbonos 5a y 4 son esenciales para dicha actividad. El grupo dimetilamino del C4 de la tetraciclina se encuentra diaxialmente eclipsado con respecto al hidroxilo del C12a; en solución ácida, se establece el equilibrio con la epitetraciclina (Fig. 2.2). Un cambio en la configuración del C4 conduce a la formación de epitetraciclina que es relativamente inactiva (Ali, 1984).

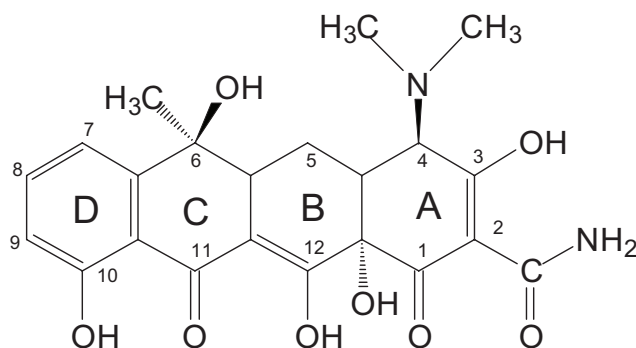


Fig. 2.2.- Estructura química de epitetraciclina

Tabla 2.1- Grupos funcionales presentes en los antibióticos de la familia de las tetraciclinas.

Tetraciclinas	R7	R6	R5
Clortetraciclina	-Cl	-CH3	-H
Oxitetraciclina	-H	-CH3	-OH
Tetraciclina	-H	-CH3	-H
Demeclociclina	-Cl	-H	-H
Metaciclina	-H	=CH <sub>2</sub> *	-OH
Doxiciclina	-H	-CH <sub>3</sub> *	-OH
minociclina	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-H

\* Indica que no existen -OH en posición 6 en las moléculas correspondientes.

Uno de los integrantes de la familia de las tetraciclinas es la tetraciclina propiamente dicha (4β-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,6α,10,12,12aβ-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxonaftacen-2-carboxamida), de fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Es una sustancia cristalina, con un peso molecular de 480,9. La molécula de tetraciclina (TC) presenta cinco centros de

---

asimetría: C-4, C-4a, C-5a, C-6 y C-12a. Es una sustancia soluble en agua (10,9 mg/mL a 28°C) y en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos, ligeramente soluble en alcohol y prácticamente insoluble en varios solventes orgánicos (Weiss et al., 1957); su punto de fusión es de 170-173 °C, con descomposición.

La TC adopta diferentes conformaciones dependientes del solvente, del pH del medio y de la presencia de metales. En medios neutros y ácidos, la molécula adopta la conformación plegada (B) donde el grupo dimetilamino de la posición 4 se encuentra sobre el sistema de anillos BCD a fin de liberar el impedimento estérico entre el nitrógeno protonado del grupo dimetilamino y el grupo -OH de la posición 12a (Mitscher et al., 1968). En la conformación plegada el N4, que se encuentra protonado, interacciona con la carga negativa deslocalizada en el anillo A (pKa 3,3) y se observa efecto Cotton negativo en la región UV del espectro de dicroísmo circular (Wessels et al., 1998). En medios básicos o no acuosos el equilibrio conformacional se desplaza a la forma extendida (A) donde el grupo dimetilamino se encuentra debajo del plano dispuesto por el sistema de anillos BCD. Esta conformación es estabilizada por fuertes interacciones puente hidrógeno entre el nitrógeno deprotonado de la posición 4 y el OH de la posición 12a. El equilibrio entre estas dos conformaciones juega un rol importante en las propiedades farmacocinéticas de la TC (Stezowski y Prewo, 1977). Además de los estudios llevados a cabo por Mitscher et al. (1968), otros autores analizaron las conformaciones de tetraciclinas en solventes no acuosos (Schach von Wittenau y Blackwood, 1966) y en estado cristalino (von Dreele y Hughes, 1971) a fin de relacionar la conformación con el estado iónico de las tetraciclinas, con resultados no siempre coincidentes. Estudios espectroscópicos de dicroísmo circular señalan dos conformaciones de TC por encima y por debajo de pH 8 (Lambs et al., 1988b), resultados consistentes con estudios teóricos (Duarte et al., 1999; Laning et al., 1999), que describen a la tetraciclina como una molécula que responde estructuralmente al medio químico en que se encuentre.

Las dimensiones de la molécula calculadas utilizando el programa Gaussian (G03w rev B.04) y optimizando de las conformaciones extendida y plegada de TC se muestran en la Fig. 2.3.

---

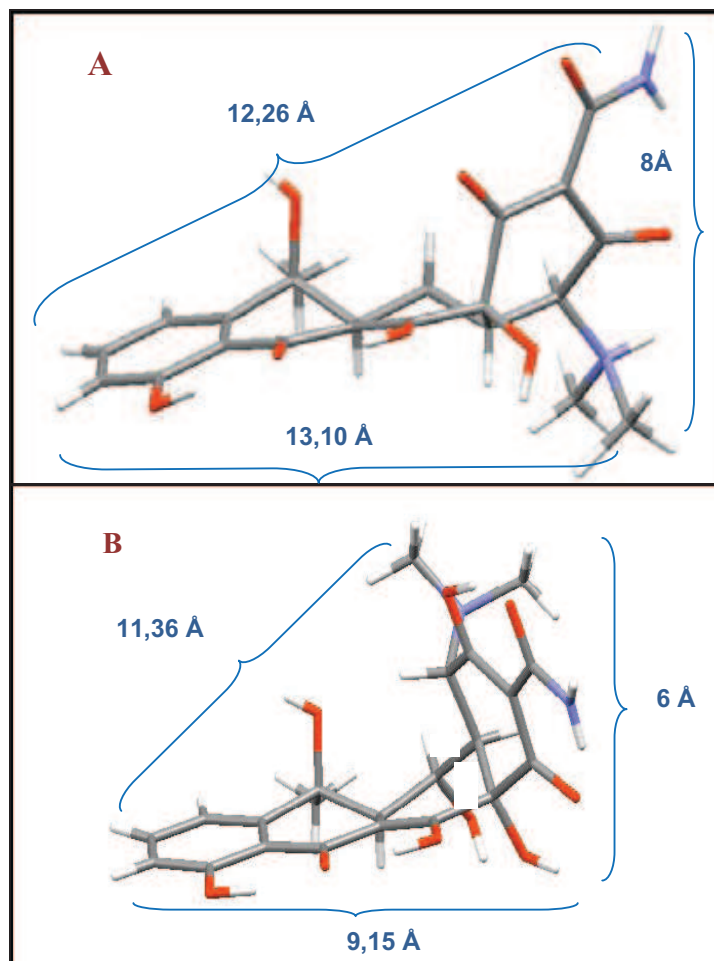


Fig. 2.3- Conformaciones extendida(A) y plegada (B) de tetraciclina. Los átomos de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno son representados en color rojo, azul y blanco respectivamente.

### 2.2.1 Reacciones de protonación-deprotonación

La molécula de TC presenta diferentes grupos que pueden sufrir reacciones de protonación-deprotonación y así generar diferentes especies iónicas según el pH de la solución acuosa en la cual se encuentra disuelta (Qiang y Adams, 2004). La especie totalmente protonada de TC existe a bajos valores de pH (Fig. 2.4), es una especie monocatiónica que se identificará como  $TCH_3^+$ .

El estudio de las reacciones protonación-deprotonación de TC ha conducido a resultados contradictorios fundamentalmente en lo que se refiere

a la asignación de los grupos de carácter ácido de TC con las respectivas constantes de disociación.

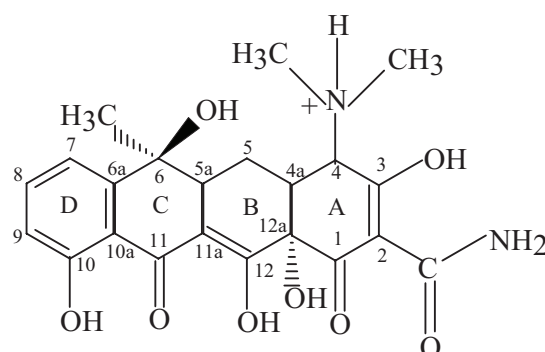


Fig. 2.4.- Estructura de tetraciclina totalmente protonada.

Teniendo en cuenta el estudio llevado a cabo por [Leeson et al., 1963](#), cuando el pH se incrementa tiene lugar el primer paso de deprotonación en el grupo hidroxilo de la posición 3 ( $pK_{a1}=3,3$ ), generando una especie con un grupo cargado negativamente y un grupo con carga positiva. La carga neta de esta especie es cero y se identificará como  $TCH_2^{\pm}$ . La forma zwitteriónica de TC ( $TCH_2^{\pm}$ ) es la predominante en el rango de pH de óptima actividad antimicrobiana (pH: 5,5-6) y presenta ambos centros de carga en el anillo A. La segunda deprotonación tiene lugar en el sistema de los grupos en posiciones 11 y 12 ( $pK_{a2}=7,7$ ), resultando en una especie con dos grupos cargados negativamente y un grupo con carga positiva. La carga neta de esta especie es -1 y se denominará  $TCH^-$ . Finalmente, la tercera deprotonación involucra el protón del grupo trialquilamino unido al C de la posición 4 ( $pK_{a3}=9,5$ ), dando lugar a una especie con dos cargas negativas identificada como  $TC^{2-}$ . En la Fig. 2.5 se muestra el diagrama de distribución de las especies de tetraciclina en función del pH.



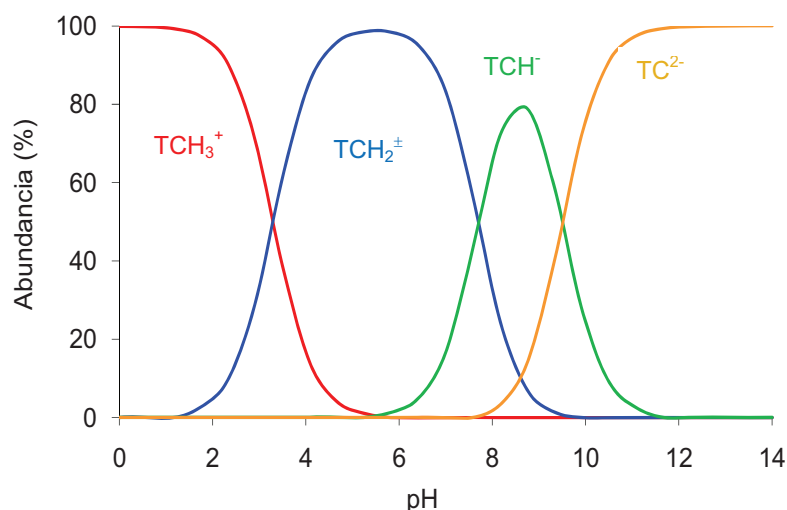


Fig. 2.5- Diagrama de distribución de especies de tetraciclina.

La minociclina (MC) es otro de los antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas (Tabla 2.1), cuya fórmula molecular es  $C_{23}H_{27}N_3O_7$ . Puede ser considerada un ácido tetraprótico, con valores de pKa 5 y 9,5 para los grupos amino aromático en posición 7 y trialquilamino en posición 4, respectivamente, y valores de 2,8 y 7,8 para los grupos hidroxilos (Orti et al., 2000). La minociclina se presenta como especie con carga eléctrica según el pH del medio. En la Fig. 2.6 se muestra el diagrama de especiación del antibiótico donde se pone de manifiesto que hasta valores de pH 6, la minociclina existe en su forma catiónica  $MCH_4^+$  y  $MCH_3^+$ , entre pH 6 y 8 prevalece su forma neutra  $MCH_2$  y a partir de pH 8 se presenta en forma aniónica  $MCH^-$  y  $MC^{2-}$ .

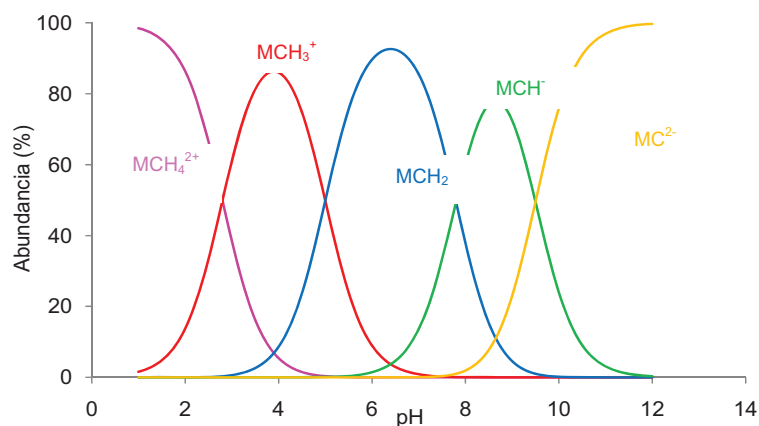


Fig. 2.6- Diagrama de distribución de especies de minociclina.

### 2.2.2 Formación de complejos con cationes divalentes

Debido a la presencia de grupos dadores de electrones en la estructura de las tetraciclinas (N4-OH12a y O10-O12), con la capacidad de formar puentes de hidrógeno intramoleculares, estas sustancias tienen propiedades quelantes y forman complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio (Wessels et al., 1998; Mackay y Canterbury, 2005; Gu et al., 2007). Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la afinidad, estequiometría y sitios de unión de cationes divalentes de interés fisiológico, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con tetraciclinas. La formación de complejos metálicos ha sido indicada como responsable de interferir con el proceso de crecimiento bacteriano (White y Cantor, 1971; Hinrichs et al., 1994). Utilizando una amplia variedad de métodos espectroscópicos y electroquímicos se encontraron estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1 ( $\text{Ca}^{2+}$ : TC) (Tabla 2.2) en solución acuosa y para un rango de pH entre 6,5 y 8,5 (Martín, 1979; Lambs et al., 1988a, Wessels et al., 1998; Schmitt y Schneider, 2000).

Tabla 2.2- Constantes de formación de complejos Ca:TC (Brion et al., 1981).

sistema	estequiometría	log $\beta$
<b>Ca:TC</b>	CaTC	4,46
	$\text{Ca}_2\text{TC}$	8,67
	$\text{Ca}(\text{TC})_2$	8,73
	$\text{Ca}(\text{TC})(\text{TCH})$	17,62
	$\text{Ca}(\text{TCH})_2$	25,54

En la Fig.2.7 se presenta las curvas de distribución de especies Ca:TC en solución calculadas teniendo en cuenta los valores de pKa de TC y la constante de formación de complejo Ca:TC (relación molar 1:1).

A bajos valores de pH las especies predominantes son  $\text{TCH}_3^+$  y  $\text{CaTCH}_2^{2+}$ . Entre pH 7 y 8,5 las especies más abundantes son  $\text{CaTCH}_2^{2+}$  y  $\text{CaTCH}^+$ , mientras que a partir de pH 10 predominan las especies CaTC y  $\text{TC}^{2-}$ .

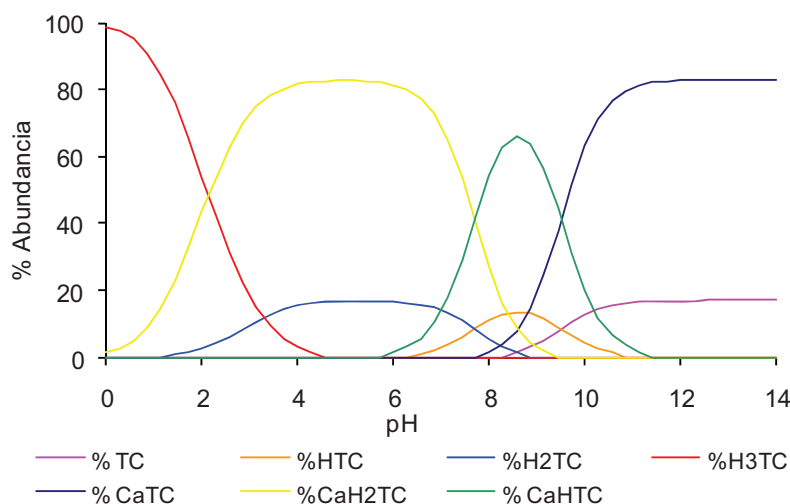


Fig. 2.7- Diagrama de distribución de especies de TC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución (TC: 0,01M y  $\text{Ca}^{2+}$ : 0,01 M), calculadas utilizando en programa MINEQL.

La presencia de varios sitios de coordinación con iones metálicos en la molécula de TC incrementa la complejidad del sistema. Además, la interacción con iones metálicos altera los valores de pKa de TC y por lo tanto el estado iónico del complejo. Otro factor que afecta la unión con iones metálicos son los cambios conformacionales relacionados con el estado de protonación de las tetraciclina. [Jin et al. \(2007\)](#) informaron un incremento en la afinidad de tetraciclina por el catión  $\text{Ca}^{2+}$  a medida que aumenta el pH en un rango de 6,5 y 11,0 unidades y una relación molar Ca:TC constante e igual a 1:1 para todos los valores de pH analizados. Se propuso que las bases para la formación de complejos es más específica que la simple compensación de cargas debido a que la relación molar Ca:TC se mantiene constante aún cuando aumenta la carga negativa de TC a medida que aumenta el pH. La unión de TC a  $\text{Ca}^{2+}$  determina el estado de protonación de TC. La carga neta del complejo Ca:TC es constante e igual a cero debido a que el catión  $\text{Ca}^{2+}$  altera los valores de pKa de los grupos del sistema dicarbonílico en posiciones 11 y 12 y del grupo trialaquilamino unido al C de la posición 4; estos dos grupos están directamente involucrados en la interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ . La deprotonación del grupo dimetilamonio se relaciona con cambios conformacionales de plegada a extendida ([Mitscher et al., 1968](#); [Lambs et al., 1988b](#)); por lo tanto el  $\text{Ca}^{2+}$

---

induce un cambio conformacional más significativamente entre pH 7,5 y 8,5 donde un protón es removido como resultado de la interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aunque se han utilizado una gran variedad de técnicas para estudiar la formación de complejos de tetraciclinas, los resultados obtenidos son parcialmente contradictorios respecto de la asignación de sitios de quelación. Por ejemplo, [Newman y Frank \(1976\)](#) estudiaron por dicroísmo circular la formación de complejos de tetraciclina con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y propusieron que tanto el nitrógeno de la posición 4 como el grupo amida de la posición 2 no están afectados en la interacción con los cationes divalentes. Por otra parte, [Mitscher et al \(1972\)](#) propusieron que por debajo de pH 7,5 el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al sistema de anillos BCD de la molécula de tetraciclina, mientras que a valores de pH superiores un segundo catión se une a través del grupo trialquilamino de la posición 4 e hidroxilo de la posición 12a. [Lambs et al. \(1988b\)](#) propusieron que los sitios de quelación para  $\text{Ca}_2\text{TC}$  son los grupos N4-O3 y O10-O12. [Williamson y Everett \(1975\)](#) utilizaron dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente y sugirieron la interacción de  $\text{Ca}^{2+}$  con el sistema tricarbónico del anillo A.

Teniendo en cuenta las propiedades ácido-base de las tetraciclinas y la presencia de iones metálicos en el organismo, es de importancia conocer el comportamiento de estos ligandos con los protones y metales del medio. La absorción gastrointestinal de estos antibióticos es afectada por la presencia de iones metálicos ([Neuvonen y Turakka, 1974](#)) como también la capacidad de las tetraciclinas de alcanzar un tejido y ejercer su acción terapéutica depende del estado químico en el cual es distribuida en el plasma sanguíneo ([Lambs et al., 1984](#)).

### 2.2.3 Propiedades espectroscópicas

La molécula de TC presenta dos regiones cromofóricas localizadas en el anillo A de la molécula y en el anillo BCD separadas por el enlace C12a-C4a que adoptan diferentes orientaciones relativas según el estado de protonación o la formación de complejos ([Hughes, et al., 1979](#), [Martin, 1985](#)). El espectro de absorción, en la región UV-vis de una solución de TC en medio ácido presenta tres bandas a 220, 275 y 357 nm. El sistema tricarbónico del anillo A contribuye a una fuerte banda de absorción a 275 nm mientras que las

---

transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  del cromóforo BCD contribuyen a los tres máximos de absorción (McCormik et al., 1957). A medida que aumenta el pH, se observa un corrimiento batocrómico en la banda correspondiente a la región visible a 369 nm cuando predomina la especie  $\text{TCH}^-$  y a 380 nm para la especie  $\text{TC}^{2-}$  (Smyth et al., 1978). Los coeficientes de extinción molar de soluciones de tetraciclina en diferentes solventes se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3.- Coeficientes de extinción molar de soluciones de tetraciclina (Ali, 1984).

	<b>METANOL</b>	<b>HCl 0,1M</b>	<b>NaOH 0,1 M</b>
$\lambda$ max (nm)	363	356	380
	270	269	268
$\epsilon$ ( $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	15940	14480	17580
	16590	18380	14360

Debido a la presencia de varios grupos carbonilos en la estructura de las tetraciclinas, se observa una banda ancha y muy intensa alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  en el espectro IR y una banda a  $1670\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo amida. El espectro IR de las tetraciclinas difiere en la región de la huella digital ( $1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ). Las asignaciones de los grupos funcionales con los números de onda correspondientes se presentan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4- Tabla de correlación IR para los principales grupos presentes en la estructura de las tetraciclinas (Ali, 1984).

<b>número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Grupo</b>
<b>3620</b>	<b>O-H alcohol terciario</b>
<b>3610</b>	<b>O-H fenólico</b>
<b>3600-3500</b>	<b>O-H puente H intramolecular</b>
<b>3500-3400</b>	<b>N-H de amidas (tensión)</b>
<b>3030</b>	<b>C-H aromáticos</b>
<b>2960</b>	<b>C-H de <math>-\text{CH}_3</math> (tensión)</b>
<b>2850</b>	<b>C-H de <math>-\text{CH}_2</math> (tensión)</b>
<b>2700-2250 (una banda ancha o grupos de bandas agudas)</b>	<b><math>\text{NHR}_3^+</math> (tensión <math>-\text{NH}^+</math>)</b>
<b>1715</b>	<b>C=O anillo de 6 miembros (tensión)</b>
<b>1690</b>	<b>Ar-C=O (tensión)</b>

número de onda (cm <sup>-1</sup> )	grupo
1675	C=O $\alpha$ - $\beta$ no saturado (tensión)
1690-1650	C=O (tensión) amidas banda I
1580	C=C aromáticos
1615	C=O $\alpha$ - $\beta$ no saturado con -OH en $\beta$ (tensión).
1600-1520	N-H de amidas (deformación) banda II
1466	-CH <sub>2</sub> (deformación)
1360-1250	Ar-N (tensión) C-N
1200	OH fenoles (deformación)
1150	C-O alcoholes terciarios
710-690	C-H (deformación fuera del plano)

#### 2.2.4 Estabilidad de antibióticos según condiciones de almacenamiento

Las condiciones que determinan la degradación de antibióticos de la familia de las tetraciclinas son la exposición a la luz, temperatura ambiental y pH del medio en el que se encuentran, siendo de baja importancia la proporción de oxígeno presente (Søeborg et al., 2004).

Debido a la estructura química compleja y la presencia de diferentes grupos funcionales en la molécula, las reacciones que presenta la TC según el pH del medio son diversas. La inestabilidad química de la droga involucra principalmente al grupo hidroxilo de la posición 6.

**En medio ácido:** Cuando la TC es expuesta a soluciones ácidas o es almacenada en condiciones inapropiadas sufre deshidratación, afectando los grupos de las posiciones 5a y 6, obteniéndose anhidrotetraciclina (Fig. 2.8). Este producto de deshidratación se forma progresivamente a pH menor a 2 y con calentamiento. La anhidrotetraciclina posee bioactividad in vitro pero no se han encontrado aplicaciones clínicas.

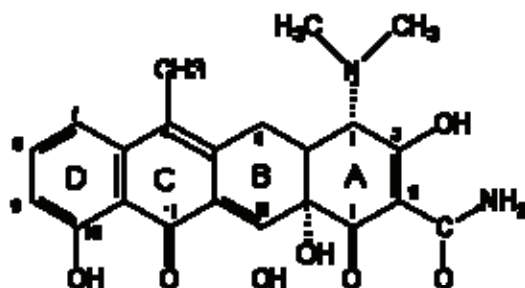


Fig. 2.8- Estructura de anhidrotetraciclina

**En medio básico:** En medio básico intervienen los grupos de las posiciones 6 y 11 y se obtiene isotetraciclina (Fig. 2.9) como producto de degradación.

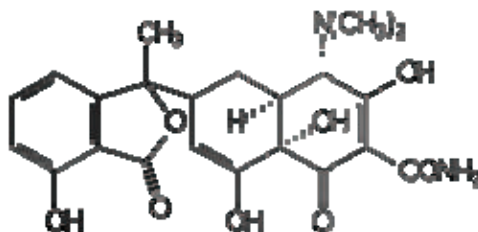


Fig. 2.9- Estructura de isotetraciclina

En disoluciones de pH entre 2 y 6 las tetraciclinas experimentan epimerización en el átomo de carbono 4, alcanzándose el equilibrio cuando se han formado cantidades aproximadamente iguales de ambos isómeros. La reacción es reversible y se produce debido al impedimento estérico de los grupos trialquilamino de la posición 4 y el hidroxilo de la posición 12a, cuando están axialmente eclipsados (Fig.2.10). En medio básico y presencia de metales quelantes es posible obtener el isómero bioactivo debido a que el metal interacciona con los grupos trialquilamino de posición 4 e hidroxilo de posición 12a superando el impedimento estérico de los grupos (Mitscher et al., 1968).

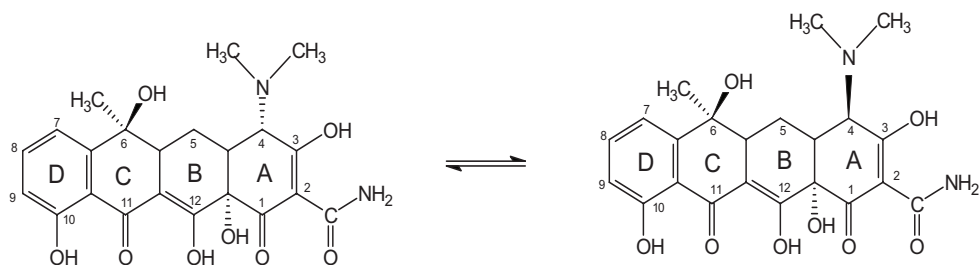


Fig. 2.10.- Estructuras de tetraciclina y epitetraciclina.

Las tetraciclinas son estables en medio neutro o ligeramente ácido. A valores de pH extremos y especialmente a elevadas temperaturas, la bioactividad se pierde progresivamente (Mitscher, 1978). La droga sólida almacenada a 20 °C y en ambientes de baja humedad relativa es muy estable, presentando un  $t_{90}$  de 50 años (Dihuidi et al., 1982).

### 2.3 Propiedades antimicrobianas de las tetraciclinas

En el año 1.945 se descubre la primera tetraciclina, extraída del caldo de cultivo de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*, recibiendo por ello el nombre de aureomicina, compuesto al que actualmente se denomina clortetraciclina. El segundo componente del grupo fue aislado a partir de una cepa mutante de *Streptomyces* y se denominó demeclociclina. Estos dos antibióticos, junto con oxitetraciclina y tetraciclina, constituyen las tetraciclinas de primera generación o naturales, las restantes son derivados semisintéticos y forman las tetraciclinas de segunda generación, en la que se incluyen metaciclina, doxiciclina y minociclina.

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que inhiben una serie de reacciones enzimáticas esenciales de procesos vitales de las células bacterianas como la síntesis de proteínas. En la Fig. 2.11 se representa esquemáticamente la acción de doxiciclina en el ribosoma:



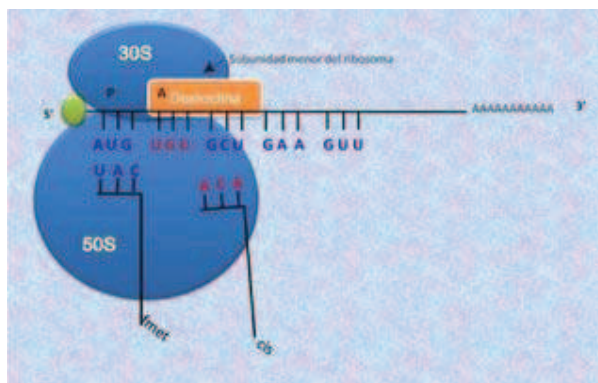


Fig. 2.11- Acción de tetraciclinas en la síntesis de proteínas bacterianas  
Fuente: [leptopirosisenclases.blogspot.com](http://leptopirosisenclases.blogspot.com)

Las tetraciclinas actúan uniéndose específicamente al ribosoma 30S de las bacterias previniendo la unión del grupo aminoacilo del ARNt al complejo ARN-ribosoma. La asociación TC-ribosoma 30S es reversible y explicaría su efecto bacteriostático. Estos antibióticos pueden, además, alterar la membrana citoplasmática y de esta manera causar pérdida de nucleótidos y otras sustancias al exterior celular. Este efecto no produce la muerte de la bacteria pero sí su inhibición.





La eficiencia de las tetraciclinas ha ido disminuyendo en el tiempo debido a la amplia existencia de genes de resistencia, probablemente como consecuencia del prolongado y extenso uso de estos antibióticos en los seres humanos y como promotores del crecimiento en animales (Sarmah et al., 2006). Sin embargo, siguen siendo eficaces en gran número de infecciones (Chopra, 2001; Roberts, 2003). La resistencia a las tetraciclinas puede ser natural o adquirida y debida a diferentes mecanismos como pueden ser: la disminución en la acumulación intracelular por bombeo activo asociado a la membrana, la presencia de proteínas de protección ribosomal que permiten actuar al ARNt en presencia del antibiótico o mutaciones en el ARNr (Ross et al., 2001).

Estos agentes quimioterapéuticos se caracterizan por la efectividad de su acción antimicrobiana frente a una amplia variedad de bacterias gram positivas y gram negativas, además de virus, tales como miembros del grupo linfogranuloma (Tabla 2.5). Las tetraciclinas son indicadas para el tratamiento de infecciones del conducto biliar, de la boca, del intestino, desórdenes respiratorios de origen bacteriano como bronquitis, brucelosis, tularemia,

pasteurelisis, leptospirosis, cólera y riketsiosis. Las tetraciclinas inhiben, además, la amiloidogenesis y la infectividad de priones asociada con desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la encefalopatía espongiforme bovina respectivamente. El mecanismo de acción propuesto en este último caso es por interacción directa con regiones hidrofóbicas de la proteína del prion.

La minociclina presenta una adecuada penetración en el cerebro y fluidos cerebroespinales (Aronson, 1980; Wu et al., 2002; Colovic y Caccia, 2003). Ha sido propuesta como un potente inhibidor de la activación y proliferación microglial, sin acción directa conocida en astrocitos o neuronas (Amin et al., 1996; Tikka y Koistinaho, 2001; Tikka et al., 2001). Además, se han demostrado sus propiedades como agente neuroprotector en animales (Stirling et al., 2004), en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Wu et al., 2002; Blum et al., 2004) y esclerosis múltiple (Brundula et al., 2002).

Tabla 2.5.-Concentración de tetraciclinas que inhiben completamente el crecimiento bacteriano ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Ali, 1984).

ANTIBIOTICOS	 Escherichia coli	 Haemophilus influenzae	 Mycobacterium tuberculosis	 Pseudomonas aeruginosa
tetraciclina	1,17	0,312	25	0,195
clortetraciclina	1,45	0,312	25	0,147
oxitetraciclina	1,17	0,312	14	0,29

### Farmacocinética:

Las tetraciclinas son administradas principalmente por vía oral, aunque existen algunos compuestos que también pueden ser administrados por vía intravenosa como la oxitetraciclina, doxiciclina y minociclina. Los antibióticos que se administran por vía oral se absorben de manera variable en el estómago y en el intestino delgado: la doxiciclina y minociclina presentan la

---

máxima absorción (90-100 %). Interfieren en su absorción el hierro y otros elementos o medicamentos que formen complejos con las tetraciclinas como el calcio, aluminio, bismuto, magnesio, cimetidina y omeprazol (Pérez-Trallero et al., 2003). Las concentraciones séricas correspondientes a una dosis oral normal son de 1,5-4,0 µg/mL. Difunden en tejidos y líquidos por su liposolubilidad y se metabolizan en el hígado. Según su perfil farmacocinético pueden agruparse en tres categorías:

- » *vida media o semivida corta* (5-9h): clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina.
- » *semivida intermedia* (10-14h): demeclociclina y metaciclina.
- » *semivida larga* (16-18h): doxiciclina y minociclina.

Las principales vías de eliminación son el riñón y la vía biliar. La eliminación por orina es variable, siendo del 6 % para minociclina y 60 % para tetraciclina; por lo que para la tetraciclina se alcanzan concentraciones terapéuticas en orina adecuadas para el tratamiento de infecciones urinarias (Pérez-Trallero et al., 2003).

## **2.4 Experimental:**

### **2.4.1 Concentración crítica de coagulación del mineral arcilloso utilizado en los estudios de adsorción. Efecto del adsorbato orgánico.**

Se prepararon las dispersiones del mineral seco y molido (100 mg/10mL) sin ajuste de pH y a pH 3, en soluciones de cloruro de sodio cuyas concentraciones variaron entre 0 y  $3 \times 10^{-2}$  M. Los tubos preparados con 14 mL de dispersión del mineral arcilloso, fueron agitados en vortex para su homogenización y luego se mantuvieron en reposo durante 24 horas; posteriormente fueron medidos los volúmenes del mineral coagulado.

A fin de evaluar el efecto de la presencia de tetraciclina en la coagulación de una dispersión acuosa del mineral, se determinó la concentración crítica de coagulación en presencia de distintas concentraciones del antibiótico, sin control de pH. Para ello, el mineral arcilloso fue dispersado en soluciones acuosas de tetraciclina, cuyas concentraciones y pH se muestran en el Tabla 2.6. El rango de concentraciones de TC seleccionado

---

para el estudio incluye el valor correspondiente a la capacidad de intercambio del mineral (104 meq/100g).

Tabla 2.6.- Sistemas preparados para la determinación de CCC por tetraciclina.

Solución TC (M)	mmolesTC / 100 g mineral	pH sistema
0	0	5,78
0,005	50	3,51
0,010	100	3,31
0,015	150	3,18
0,020	200	3,06
0,025	250	3,00
0,030	300	2,94

### 2.4.2 Espectroscopia UV-visible

Se registraron los espectros UV-vis de una solución de TC ( $5,56 \times 10^{-5}$  M) en un amplio rango de valores de pH (2,6-10,6). Debido a la inestabilidad de las tetraciclinas en medios acuosos, se analizaron soluciones recientemente preparadas y almacenadas en oscuridad. Los valores de pH fueron ajustados utilizando soluciones de NaOH y HCl.

A fin de determinar la posible descomposición de tetraciclina a valores de pH elevados, se agregó HCl a la solución de tetraciclina a pH 10,6 y se registró nuevamente el espectro UV-vis a pH 3, comparándolo con el registro original al mismo pH. Los espectros fueron obtenidos en un rango de 200-500nm, utilizando un espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Agilent 8453.

Para evaluar la formación de complejos de TC con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , se registraron los espectros UV-vis de soluciones de TC ( $5,56 \times 10^{-5}$  M) con distintas relaciones molares Ca:TC, a pH 7. Posteriormente, manteniendo una relación constante Ca:TC (200:1) se registraron los espectros UV-vis en un intervalo de pH de 8 a 11.

### 2.4.3 Espectroscopia IR. ATR-FTIR.

Los espectros IR fueron registrados utilizando un espectrofotómetro BUCK 500 (detector DLATGS) en la región  $600-4000 \text{ cm}^{-1}$ . Se prepararon

pastillas de tetraciclina sobre soporte de KBr (3 mg de clorhidrato de tetraciclina/300 mg KBr).

Los espectros de absorción ATR-FTIR fueron registrados utilizando un equipo NICOLET Magna 560 FTIR que cuenta con un detector DTGS, un accesorio Smart RK ATR y un cristal de ZnSe. Se obtuvieron los espectros de soluciones de TC a distintas concentraciones ( $3,79 \times 10^{-5}$  M - 0,02 M) y valores de pH. El control de pH de las soluciones se realizó mediante el agregado de soluciones de NaOH y HCl y se utilizó NaCl 0,01 M como electrolito soporte. Cada espectro es el resultado de 256 interferogramas, con una resolución espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4 Dicroísmo Circular

A partir de una solución madre de clorhidrato de tetraciclina (133,6 mg/100mL) se prepararon soluciones cuyas concentraciones fueron iguales a las utilizadas para el registro de los espectros de absorción UV-vis ( $5,56 \times 10^{-5}$  M).

El control de pH de las soluciones se realizó mediante el agregado de soluciones de NaOH y HCl y se utilizó NaCl 0,01 M como electrolito soporte. Los valores de pH seleccionados para el análisis corresponden al predominio de cada una de las especies de TC (Fig.2.5).

Para analizar la interacción de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  con TC, se trabajó en un rango de pH de 6-10,5 y se agregó  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a las soluciones de TC. Se mantuvo una relación molar Ca:TC constante e igual a 200:1. Antes de registrar los espectros, se ajustó el pH de la solución al valor deseado.

Los espectros de dicroísmo circular fueron registrados utilizando un espectropolarímetro JASCO (J-810) en un rango de longitudes de onda de 200-450 nm, se trabajó con un ancho de banda de 3 nm. Los resultados fueron expresados como  $\Delta\epsilon$  ( $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ), siendo:

$$[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$$

$$[\theta] = \theta / c l$$

$$[\theta] = \text{elipticidad específica (miligrados } \text{cm}^2 \text{ g}^{-1})$$

$$c: \text{concentración de la solución (g/100mL)}$$

$$l: \text{paso óptico (cm)}$$

### 2.4.5 Difracción de rayos X

Para el análisis por difracción de rayos X de tetraciclina se prepararon las siguientes muestras:

*DRX total en polvo:* se tomó 1 g de tetraciclina cristalina para molienda manual en mortero de ágata, posteriormente se montó el polvo sobre ventana de aluminio y se conservó la muestra en oscuridad hasta la obtención del difractograma.

*DRX solución:* Se preparó una solución saturada de TC en agua destilada (100 mg/10 mL) y se cubrió un portaobjetos con 2 mL de la solución. La muestra se dejó secar en oscuridad durante 48 horas a 20°C y 36% de humedad relativa.

Los diagramas se registraron entre 2 y 40 °, con un paso de 0,05 ° y a una velocidad de 2 °/min.

El equipo utilizado fue un Difractómetro Rigaku® DII Max, ánodo CuK $\alpha$ ,  $\lambda=1,5414$  Å, filtro de Ni, 40 Kv, 20 mA y goniómetro horizontal. La interpretación de los diagramas se llevó a cabo con el software MDI Jade 7.

### 2.4.6 Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de observar la morfología de los cristales de TC se preparó una solución saturada en agua destilada y para identificar la presencia de tetraciclina en los complejos de adsorción TC-montmorillonita se preparó una solución correspondiente a la mayor concentración de las isothermas de adsorción (1,04 mM). Las soluciones fueron depositadas sobre soporte de aluminio y se dejaron secar en oscuridad a 20°C.

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido con detector de electrones secundarios y detector para análisis de EDX marca Philips SEM-JEOL-515; las muestras fueron recubiertas con un film conductor de oro, siguiendo la técnica de [Goldstein y Muldoon \(1977\)](#).

---

### 2.4.7 Efecto del pH del medio en la estabilidad de soluciones acuosas de TC.

A partir de una solución madre de TC (0,1336 g/100mL) recientemente preparada, se obtuvieron las diluciones  $5,5 \times 10^{-5}$  M en un intervalo de pH de 3-11. Se registró el espectro UV-vis de cada una de las soluciones y posteriormente fueron almacenadas en oscuridad a 20 °C durante 21 días. Periódicamente se registró el espectro UV-vis de las soluciones y se determinó la absorbancia relativa para las dos principales bandas de absorción.

## 2.5 Resultados y Discusión

### 2.5.1 Concentración crítica de coagulación del mineral arcilloso. Efecto del adsorbato orgánico.

Las Fig. 2.12 y 2.13 muestran los volúmenes del mineral coagulado luego de 24 horas, correspondientes a dispersiones acuosas del mineral arcilloso preparadas a distintas concentraciones de agente coagulante.

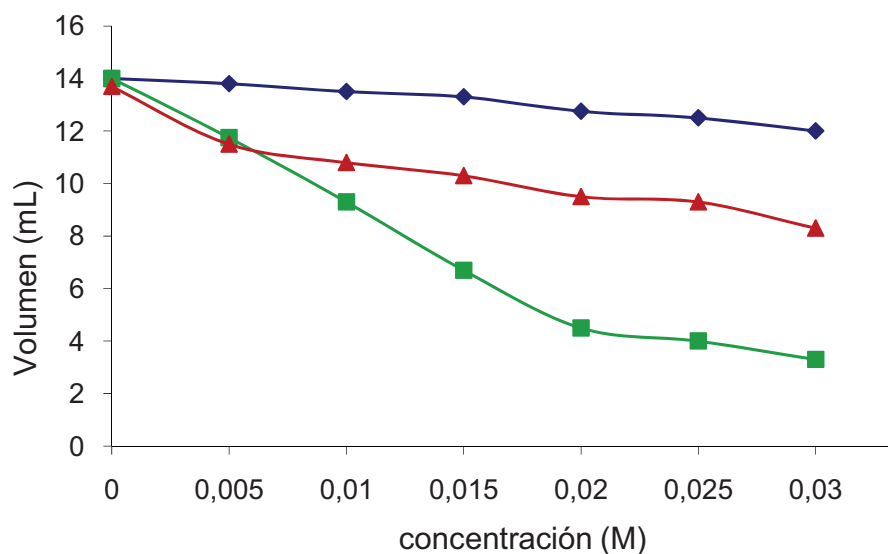


Fig. 2.12.- Volumen de dispersión de mineral arcilloso (100 mg/10mL) luego de 24 horas.

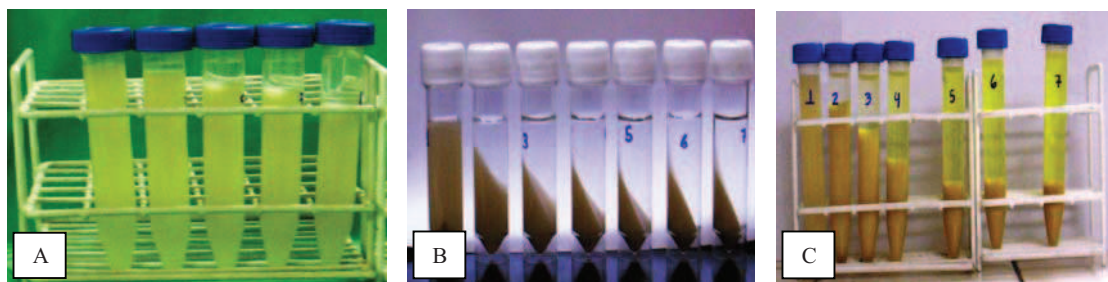


Fig. 2.13.- Coagulación de dispersiones de mineral arcilloso. A. en soluciones de NaCl. B: en soluciones de NaCl a pH3. C: en soluciones acuosas de tetraciclina.

Una disminución en el volumen del sistema disperso corresponde a un sistema inestable al cabo de 24 horas. Los sistemas preparados en soluciones de NaCl a pH 3 son menos estables que los correspondientes al mismo electrolito pero sin ajuste de pH debido a que el aumento en la concentración de protones en el sistema genera cargas positivas en los bordes de las arcillas promoviendo la interacción atractiva borde positivo-cara negativa, lo que induce la coagulación.

La Fig. 2.12 también muestra que el efecto de la sustancia orgánica en la estabilidad del sistema disperso es mayor que el de NaCl para el mismo pH. La adsorción de un compuesto orgánico como la tetraciclina, principalmente la adsorción de la especie positivamente cargada  $TCH_3^+$ , aumenta la inestabilidad del sistema porque neutraliza cargas eléctricas negativas de la arcilla. A medida que aumenta la concentración de TC el complejo de adsorción se separa del sistema disperso en forma progresiva hasta la concentración de TC que duplica la capacidad de intercambio del mineral (0,02 M).

### 2.5.2 Espectroscopia UV-vis

La Fig. 2.14 muestra los espectros de absorción de una solución de TC  $5,5 \times 10^{-5}$  M bajo distintas condiciones de pH.



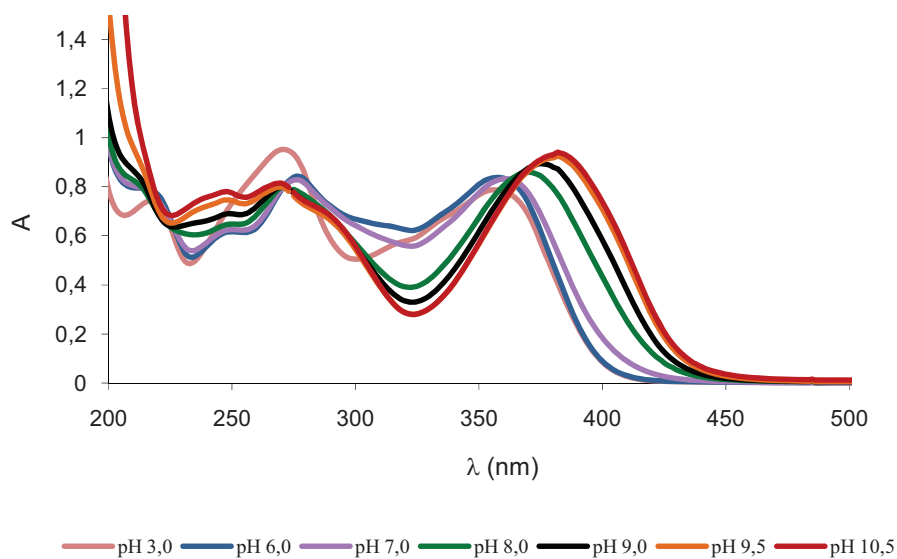
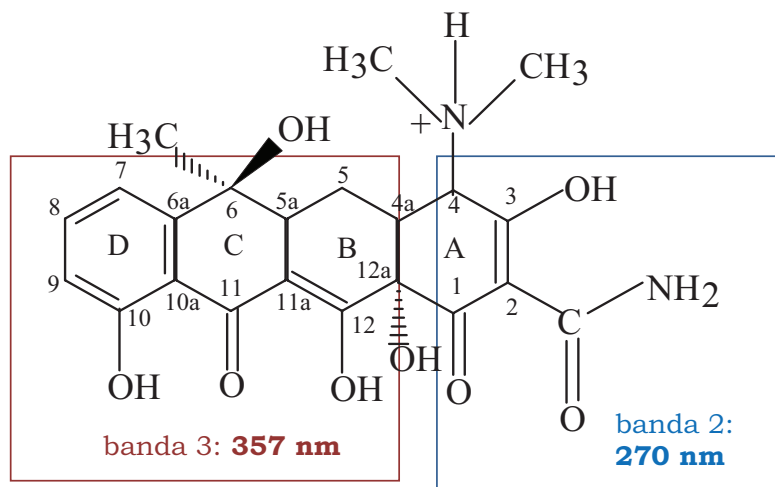


Fig. 2.14.- Espectros UV-vis de soluciones de tetraciclina ( $5,5 \times 10^{-5}$  M) a distintos valores de pH.

El espectro de absorción UV-vis de TC a pH 3 presenta tres bandas, a 220 nm (banda 1) asignada al sistema aromático D de la molécula; a 270 nm (banda 2) asignada al cromóforo del anillo A y a 357 nm (banda 3) correspondiente al cromóforo BCD. Este último cromóforo contribuye a los tres máximos de absorción (Mitscher, 1978):



A valores de pH superiores al  $pK_{a2}$  (7,7) se observa un corrimiento batocrómico de la banda 3 debida a la deprotonación de los grupos  $-OH_{11}$  y  $12$ . Si bien esta modificación espectral es muy evidente en la banda 3, los

cambios del estado electrónico del cromóforo BCD afectan también a las otras dos bandas. Una comparación de estos cambios se realiza en las Fig. 2.15 y 2.16 respectivamente.

La primer deprotonación de TC ( $pK_{a1}$ : 3,3) tiene lugar en el  $-OH_3$  del anillo A de la molécula y afecta en forma apreciable a la banda de 270 nm (Duarte et al., 1999).

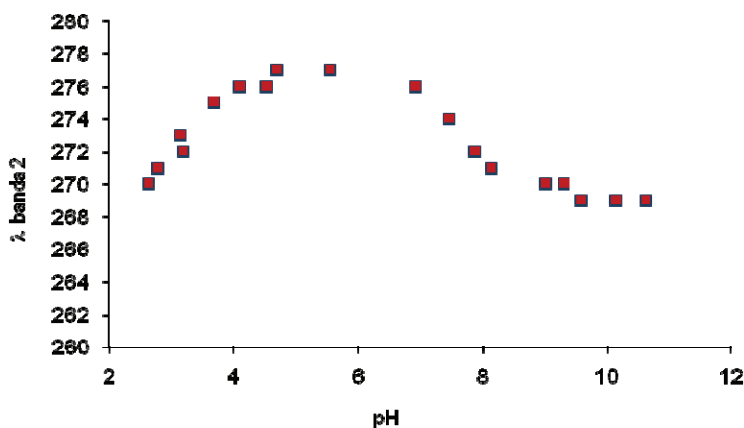


Fig. 2.15.- Efecto del pH en la posición de la banda de 270 nm

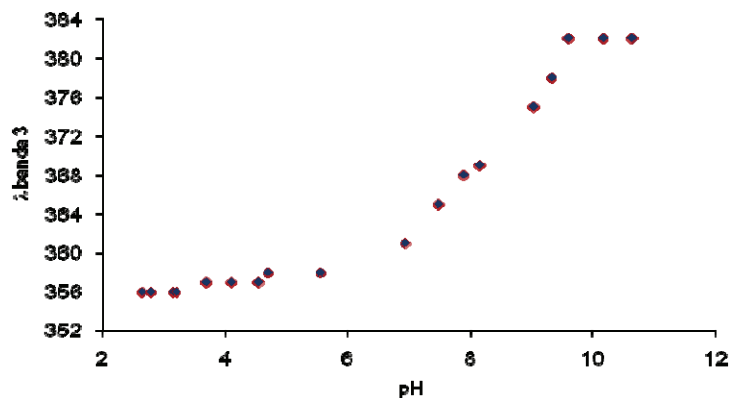


Fig. 2.16.- Efecto del pH en la posición de la banda de 357 nm

El importante corrimiento batocrómico de 25 nm que se observa en la banda 3 corresponde no sólo al estado electrónico de los grupos correspondientes, sino además a un cambio conformacional que tiene lugar a medida que el grupo dimetilamino del C4 se deprotona. Este desplazamiento del equilibrio conformacional de la forma plegada a la extendida afecta la

geometría del cromóforo aumentando su planaridad y es, en parte, responsable del corrimiento batocrómico observado.

Mediante el agregado de HCl a las soluciones alcalinas de TC (pH 10) se disminuyó el pH y se registró nuevamente el espectro de absorción. La Fig. 2.17 muestra la comparación de espectros de soluciones que inicialmente presentaban un pH 3 con el correspondiente a soluciones cuyo pH fue disminuido hasta ese valor.

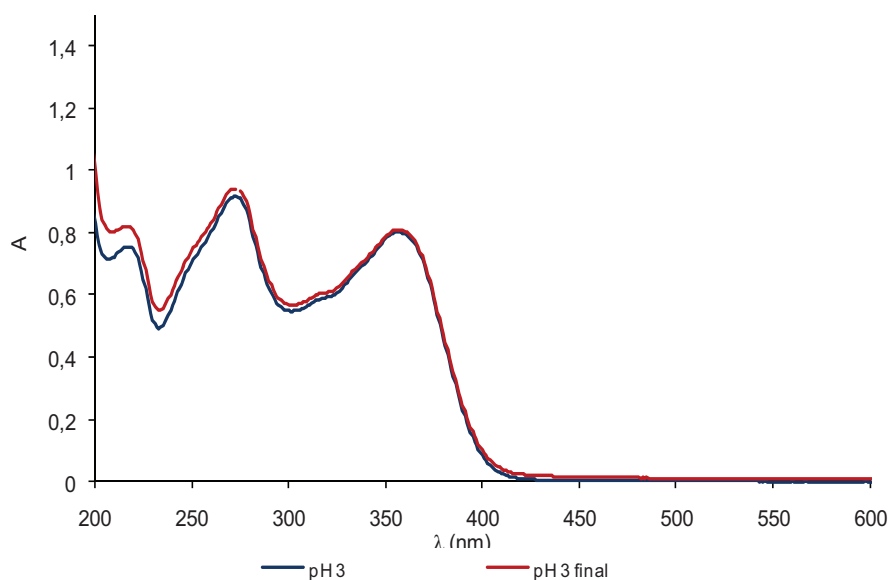


Fig. 2.17- Espectros UV-vis de soluciones de TC ( $5,5 \times 10^{-5}$  M) a pH 3, recientemente preparadas y luego de haber alcanzado el valor de pH 10.

Debido a que no se presentan modificaciones de importancia en las principales bandas de absorción a temperatura ambiente, se descarta la posibilidad de degradación de TC por efecto del pH durante el tiempo del análisis (aproximadamente 2 horas).

La Fig. 2.18 corresponde al espectro de absorción UV-vis de soluciones de TC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en una relación constante Ca:TC (200:1).

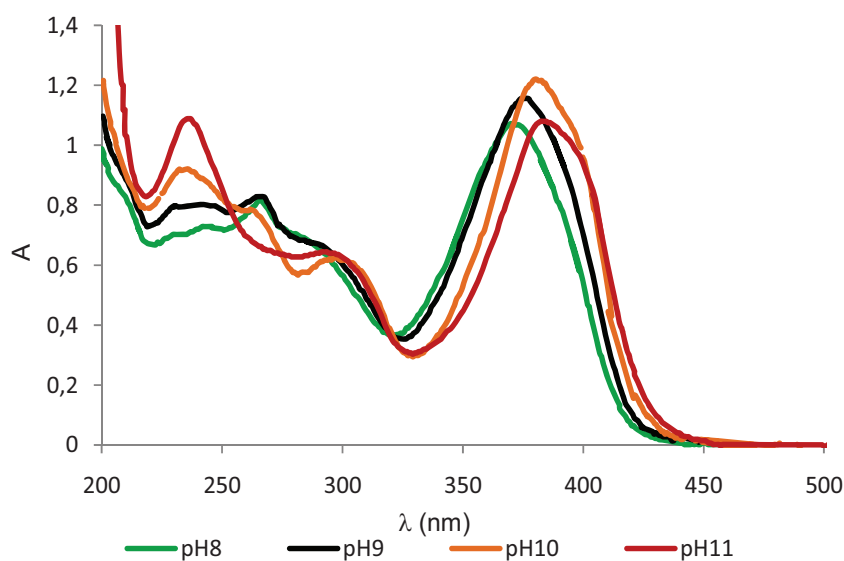


Fig. 2.18.- Espectros UV-vis de soluciones de tetraciclina ( $5,5 \times 10^{-5}$  M) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , relación Ca:TC (200:1), a distintos valores de pH.

Si se comparan los espectros UV-vis de soluciones de TC en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se observa que cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  está presente el corrimiento batocrómico en la banda de mayor longitud de onda es más marcado en el intervalo de pH 8-11. A menores valores de pH no se observaron cambios espectrales en las soluciones de TC con y sin  $\text{Ca}^{2+}$ .

En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la banda 3 del espectro UV-vis presenta un corrimiento de 4nm a pH 8 y 9 respecto de las soluciones de TC a los mismos valores de pH. Para pH 10 y 11, la banda 3 presenta un hombro a la derecha, que no se observa en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la deprotonación del grupo  $-\text{OH}$  ( $\text{pK}_{a2}$ : 7,7) del cromóforo BCD, observándose un nuevo corrimiento en la longitud de onda de máxima absorción para los pH 8 y 9.

La banda 2 del espectro de absorción también sufre modificaciones en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuye la intensidad de la banda a 270 nm y aparece una banda bien definida a 230 nm a medida que aumenta el pH.

Las modificaciones encontradas en los espectros de absorción UV-vis en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  son coincidentes con las informadas por otros autores (Wessels et al., 1998), quienes proponen la formación de complejos 1:2 (TC:Ca) a partir de ambos cromóforos (anillo A y sistema de anillos BCD).

La Fig. 2.19 muestra los espectros UV-vis de soluciones de TC a pH 7 con distintas relaciones molares Ca:TC.

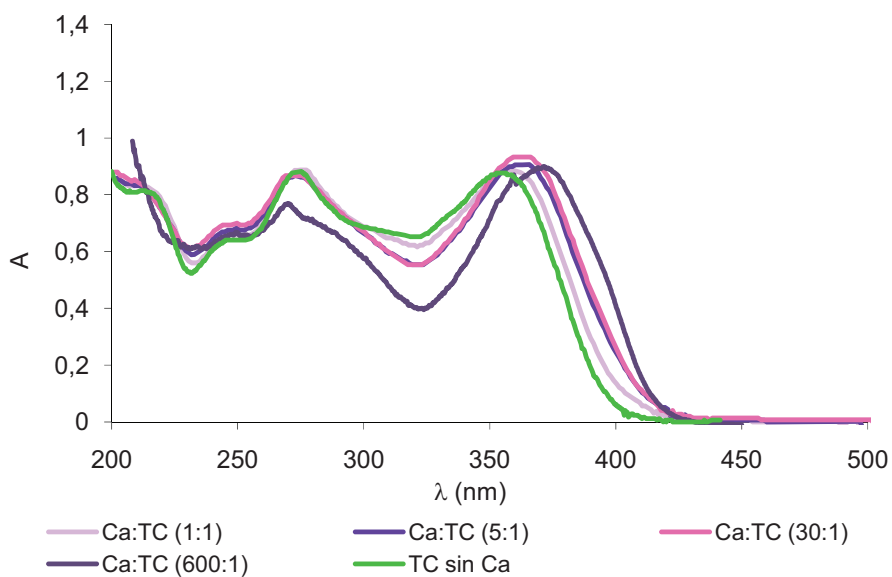


Fig. 2.19.- Espectros UV-vis de soluciones de tetraciclina ( $5,5 \times 10^{-5}$  M) en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se observa corrimiento en la banda de 357 nm y no en la de 270 nm, poniendo en evidencia que el primer sitio de quelación es el anillo BCD. La dependencia de la absorbancia correspondiente a estas dos bandas con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se observa en la Fig. 2.20.

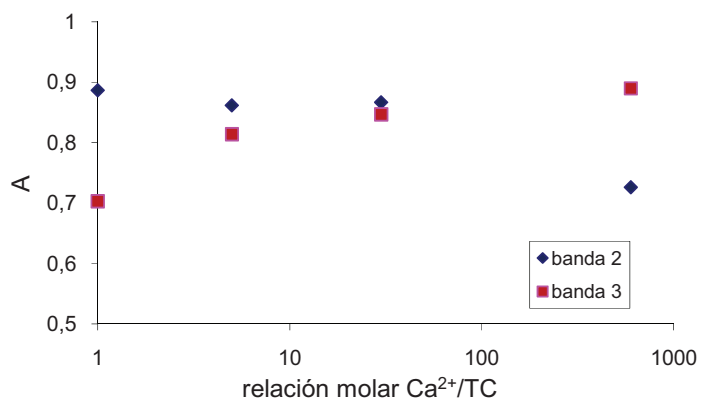


Fig. 2.20.- Densidad óptica (A) de soluciones de TC:Ca<sup>2+</sup> en función de la relación molar Ca<sup>2+</sup>/TC evaluadas a 270 nm (◆) y a 374 nm (■).

Los resultados obtenidos indicarían que en presencia de una elevada relación molar  $\text{Ca}^{2+}:\text{TC}$  se forman complejos 2:1 donde el  $\text{Ca}^{2+}$  interacciona con los grupos del cromóforo BCD (banda 374 nm) y con el sistema de anillos A-BCD (banda 270 nm).

### 2.5.3 Espectroscopia IR. ATR-FTIR.

El espectro IR correspondiente a tetraciclina se muestra en la Fig. 2.21.

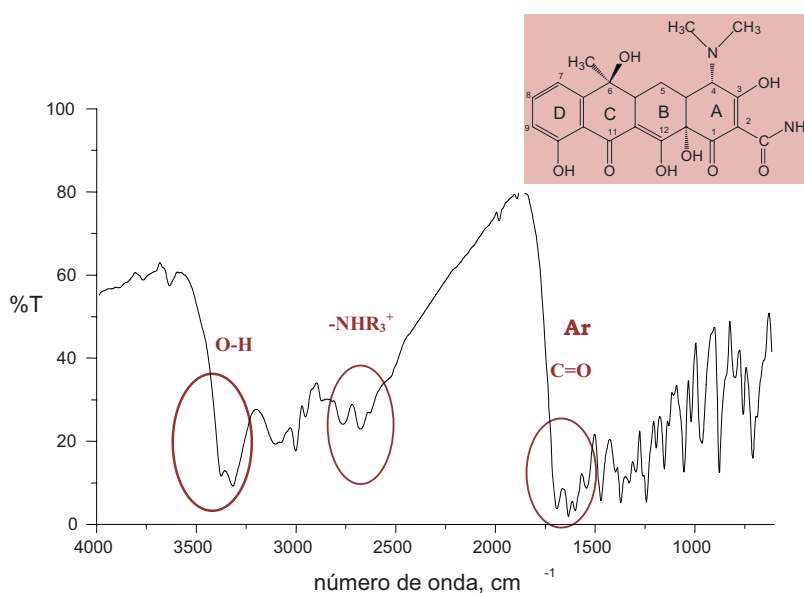


Fig. 2.21.- Espectro IR de tetraciclina en soporte de KBr.

La asignación de las principales bandas del espectro IR se realizó teniendo en cuenta la Tabla 2.4: 3600  $\text{cm}^{-1}$  debida a vibración de tensión del grupo O-H, 2760  $\text{cm}^{-1}$  y 2670  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones de tensión del grupo  $-\text{NHR}_3^+$ , las bandas a 1670, 1618 y 1586 corresponden a los grupos carbonilo: C=O de amida, C=O anillo A y C=O anillo C respectivamente (Chartone-Souza et al., 2005), 1580  $\text{cm}^{-1}$  a vibraciones del anillo aromático, 1526  $\text{cm}^{-1}$  para vibración de deformación del grupo  $-\text{NH}_2$  de amidas, y 1466  $\text{cm}^{-1}$  vibraciones de deformación del grupo  $-\text{CH}_2$  y 1372  $\text{cm}^{-1}$  vibración de tensión del enlace C-NR<sub>2</sub>.

La Fig. 2.22 muestra el espectro ATR-FTIR (1850-1100 $\text{cm}^{-1}$ ) de una solución de TC 0,01 M a distintos valores de pH.

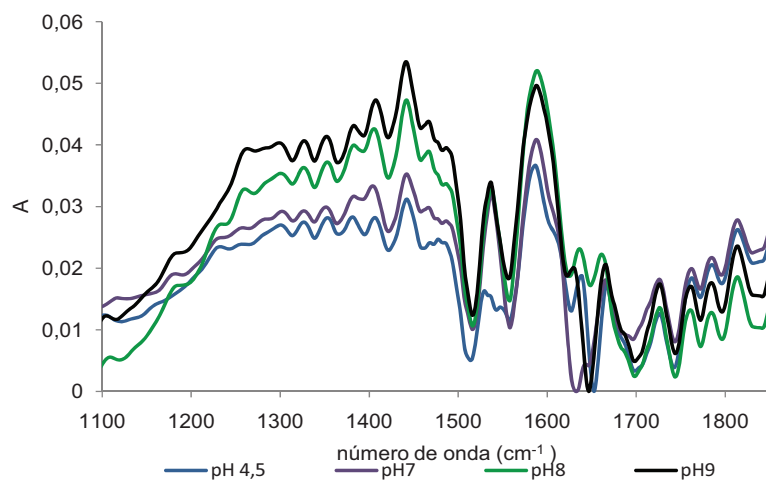


Fig. 2.22.- Espectros ATR-FTIR de soluciones de TC (0,01M).

El análisis matemático de las bandas (Programa PeakFit v4), entre 1500 y 1650  $\text{cm}^{-1}$ , de los espectros a pH 4,5 y 7 se presentan en las Fig. 2.23 y 2.24.

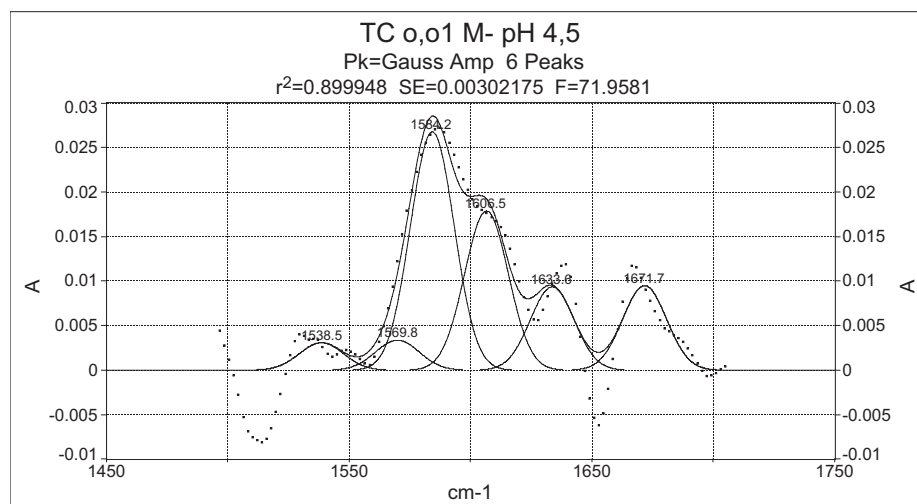


Fig. 2.23.- Descomposición matemática del espectro de absorción ATR-FTIR de una solución de TC (0,01 M) a pH 4,5.

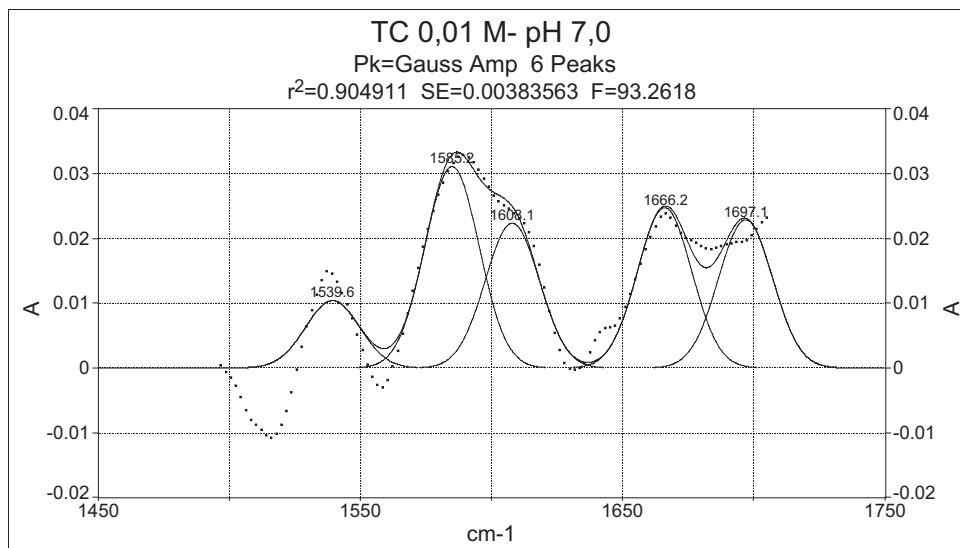


Fig. 2.24.- Descomposición matemática del espectro de absorción ATR-FTIR de una solución de TC (0,01 M) a pH 7,0.

Las bandas de mayor intensidad a  $1584\text{ cm}^{-1}$  y  $1606\text{ cm}^{-1}$  para pH 4,5 y  $1585$  y  $1608\text{ cm}^{-1}$  para pH 7 pueden ser asignadas a los grupos C=O del anillo C y a vibración de tensión del grupo C=O del anillo A respectivamente (Caminati et al., 2002). Los principales efectos del pH del medio se observan para las bandas correspondientes al grupo amida I ( $1670\text{ cm}^{-1}$ ) ya que la deprotonación de los hidroxilos en carbonos próximos a los grupos carbonilo, afecta la energía vibracional del grupo amida.

La Fig. 2.25 muestra el espectro de absorción ATR-FTIR ( $2450\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ ) en la región correspondiente al grupo  $\text{-NHR}_3^+$ , un aumento en el pH disminuye el grado de protonación del grupo trialquilamino y disminuye la intensidad de las bandas.



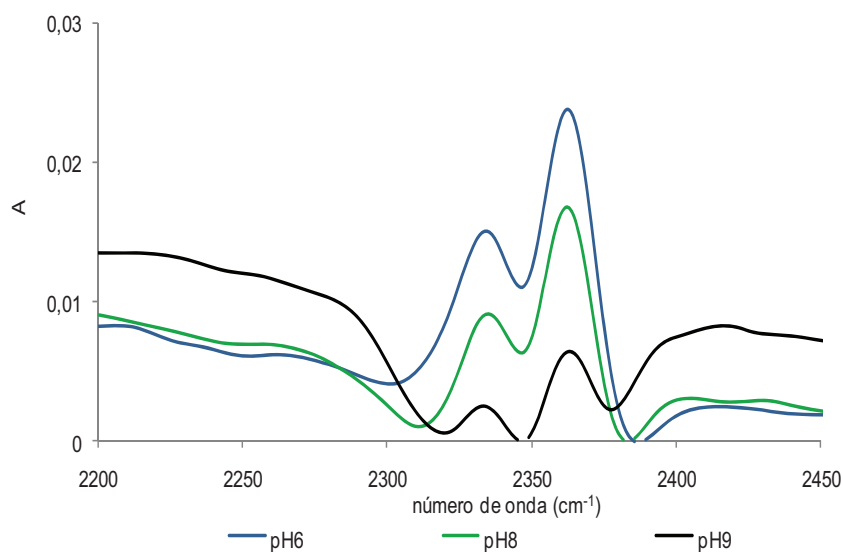


Fig. 2.25.- Espectros ATR-FTIR de soluciones de TC (0,01M).

#### 2.5.4 Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular es observado cuando un haz de luz circularmente polarizado atraviesa un medio ópticamente activo, generalmente una solución de la sustancia ópticamente activa. Las intensidades de las radiaciones incidentes ( $I_0$ ) izquierda y derecha son iguales, sin embargo, debido al efecto de rotación óptica,  $I_{\text{izquierda}} \neq I_{\text{derecha}}$  luego de interactuar con la sustancia ópticamente activa y como consecuencia la luz es elípticamente polarizada (Fig. 2.26).

La forma de la elipse está determinada matemáticamente por el ángulo  $\psi$ , designado elipticidad de la muestra;  $\psi = \arctan(b/a)$  donde  $b$  y  $a$  corresponden el eje menor y mayor de la elipse.

Los coeficientes de absorción de la luz polarizada circularmente a izquierda y derecha son diferentes, por lo tanto en un espectro DC se representa la diferencia del coeficiente de absorción,  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{izquierda}} - \varepsilon_{\text{derecha}}$ , o también en unidades de elipticidad (milgrados) en función de la longitud de onda de la radiación.

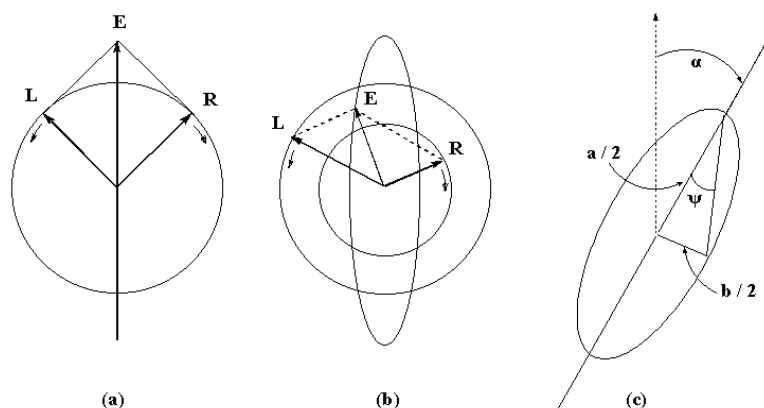


Fig. 2.26.- (a) Haz de luz circularmente polarizado, R y L, y el vector suma, E, oscilando en el mismo plano. (b) Componentes de luz polarizada izquierda y derecha de distinta intensidad. (c) luz elípticamente polarizada. El eje mayor de la elipse rota formando un ángulo  $\alpha$ , debido al efecto de la rotación óptica.

Los cambios espectrales de soluciones de TC debidos a variaciones en el pH del medio se observan en la Fig. 2.27.

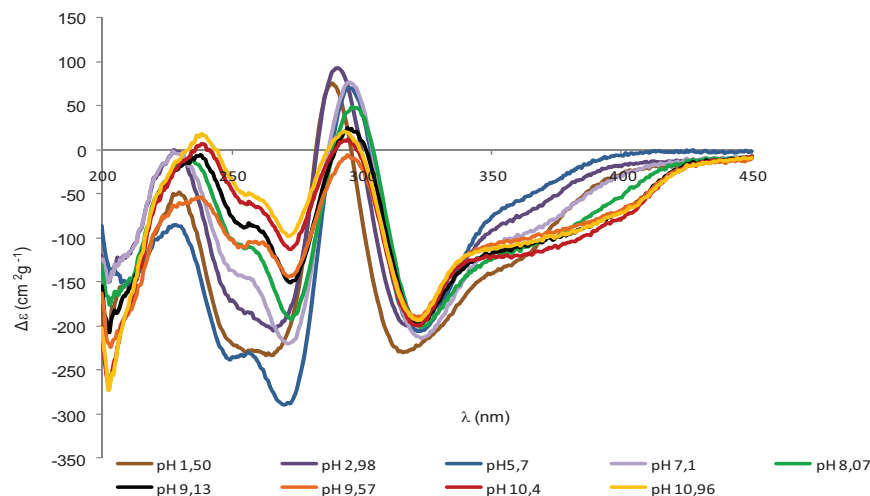


Fig. 2.27.-Espectro de dicroísmo circular de TC ( $5,56 \times 10^{-5}$  M) a distintos valores de pH.

La TC presenta dos bandas negativas a 275 nm, 324 nm y una positiva a 298 nm. Los espectros obtenidos son muy similares a los reportados por Mitscher et al. (1968) y Lambs et al. (1988b) quienes indican que la presencia de una señal positiva a 298 nm y negativa a 270 nm es debida a la quiralidad del excitón por acoplamiento entre las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del sistema tricarbonílico A y el cromóforo BCD en la conformación plegada donde el grupo

dimetilamino de la posición 4 se encuentra sobre el sistema de anillos BCD a fin de liberar el impedimento. El efecto del pH que resulta más evidente se observa en la banda a 275 nm correspondiente al anillo A de la molécula de TC, que es el responsable del cambio conformacional de tetraciclina de plegada a extendida.

A valores de pH inferiores a 3, el grupo  $-OH$  del anillo A está protonado ( $pK_{a1}:3,3$ ) y cambia el perfil de DC respecto de los pH superiores a 3. El corrimiento observado en la banda a 275 nm se corresponde con cambios en el espectro de absorción UV en el mismo intervalo de pH (2-6).

Una vez que los grupos del sistema BCD de la molécula de TC se encuentran deprotonados y en un mismo estado electrónico (a valores de pH superiores a 7,7), los cambios observados en la intensidad del efecto Cotton negativo, corresponden a modificaciones conformacionales que involucran al anillo A, cambiando de la forma plegada a la extendida.

La conformación plegada está asociada con un efecto Cotton altamente negativo a 262 nm (Lambs et al., 1988b). Por lo tanto, a medida que aumenta el pH el equilibrio conformacional se desplaza a la forma extendida, observándose una disminución en la intensidad del efecto Cotton negativo.

Se estudiaron, además, los cambios espectrales en presencia de iones  $Ca^{2+}$  en el intervalo de pH de mayor afinidad TC- $Ca^{2+}$  (6-10,5). Los espectros obtenidos se observan en la Fig. 2.28.

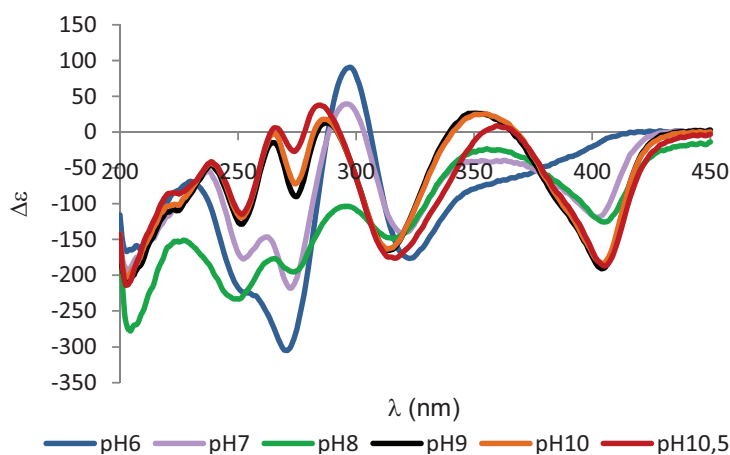


Fig. 2.28.- Espectro de dicroísmo circular de TC ( $5,56 \times 10^{-5}$  M) en presencia de  $Ca^{2+}$ , relación Ca:TC (200:1), a distintos valores de pH.

Se presentan dos nuevos efectos Cotton dependientes de pH del medio en la región visible, una absorción positiva a 360 nm y una negativa a 400 nm. Estas observaciones se corresponden con cambios en el espectro de absorción, registrados a partir de pH 8, para la misma región del espectro y sugiere como sitios de quelación para el  $\text{Ca}^{2+}$  el sistema de anillos BCD, tal como fue propuesto por [Wessels et al. \(1998\)](#). A fin de determinar con mayor claridad el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el espectro de dicroísmo circular de soluciones de TC, se compararon los espectros en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la Fig.2.29 se presenta, a modo de ejemplo, los espectros obtenidos a valores de pH 8, 9, 10 y 10,5 donde se observaron las mayores diferencias.

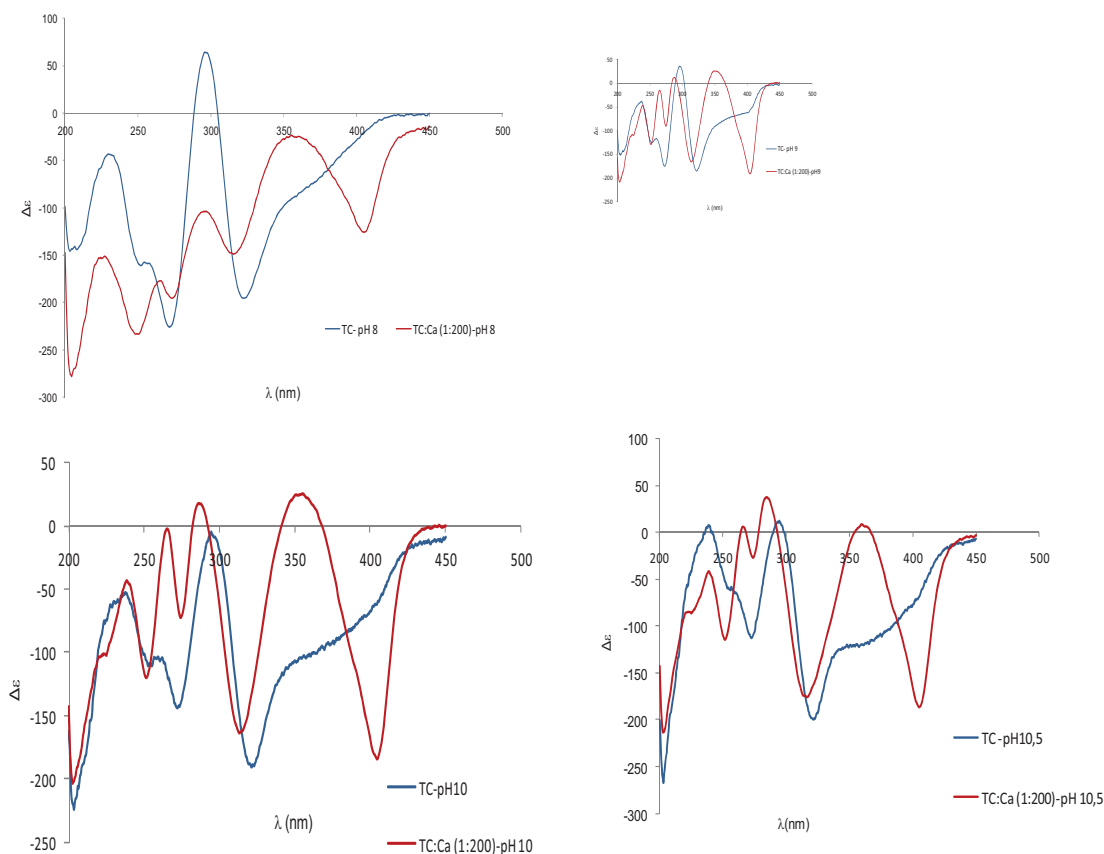


Fig.2.29.- Espectros de dicroísmo circular de TC ( $5,56 \times 10^{-5}$  M) en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto del calcio se pone de manifiesto en las regiones espectrales UV y visible. La aparición de un segundo efecto Cotton en la región visible ha sido informada por otros autores ([Mitscher et al., 1968](#), [Mitscher et al., 1972](#),

Lambs, 1988b) y lo han propuesto como indicativo de que la formación de complejos con  $\text{Ca}^{2+}$  involucra tanto el sistema de anillos A como el BCD (Newman y Frank, 1976).

El efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la asimetría del cromóforo BCD comienza a manifestarse a partir de pH 6, valor de pH inferior al  $\text{pKa}_2$ , siendo otra evidencia de que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  induciría la deprotonación de los grupos  $-\text{OH}$  del cromóforo BCD. En la Fig. 2.30 se observan los valores de elipticidad ( $\theta$ ) obtenidos para la banda de 400 nm en el intervalo de pH analizado.

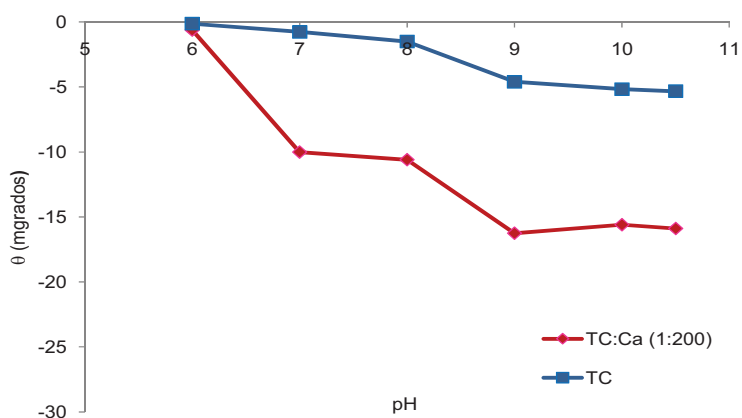


Fig. 2.30.- Efecto del pH en la elipticidad experimental ( $\theta$ ) a 400 nm correspondiente al cromóforo BCD de tetraciclina.

En la región UV se observa que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye la intensidad del efecto Cotton negativo (Fig. 2.29). Este efecto es similar al observado al aumentar el pH en soluciones de TC con ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Teniendo en cuenta que la conformación extendida de la molécula está favorecida a elevados valores de pH, donde prevalece la forma deprotonada de TC, se puede señalar que el  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la forma extendida de la molécula por otro mecanismo, además de la deprotonación de los grupos de carácter ácido del sistema BCD de la molécula, debido a que si se compara el efecto Cotton negativo en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se observa una disminución más marcada en la intensidad del efecto Cotton negativo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un catión  $\text{Ca}^{2+}$  puede coordinar con los oxígenos de las posiciones 1 (cromóforo A) y 12 (cromóforo BCD) de la molécula, involucrando a ambos sistemas y promoviendo la forma extendida (Fig. 2.31). La coordinación del

cación  $\text{Ca}^{2+}$  al grupo trialquilamino en la conformación extendida estaría dificultada por impedimento estérico (Newman y Frank, 1976; Wesseles et al., 1998).

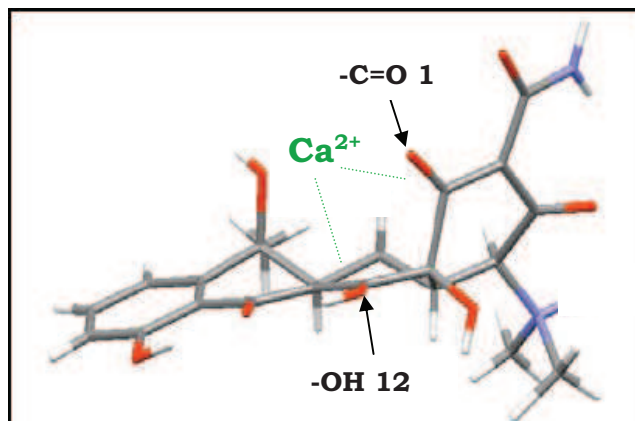


Fig. 2.31.- Interacción de  $\text{Ca}^{2+}$  con los cromóforos A y BCD en la conformación extendida de TC.

Los cambios en la elipticidad experimental ( $\theta$ ) que se producen para el rango de pH 8-10,5 en la región UV (Fig. 2.32) corresponden principalmente a cambios conformacionales debido a que no se producen modificaciones en el estado electrónico del cromóforo BCD, que presenta el grupo -OH mayormente deprotonado en este intervalo de pH.

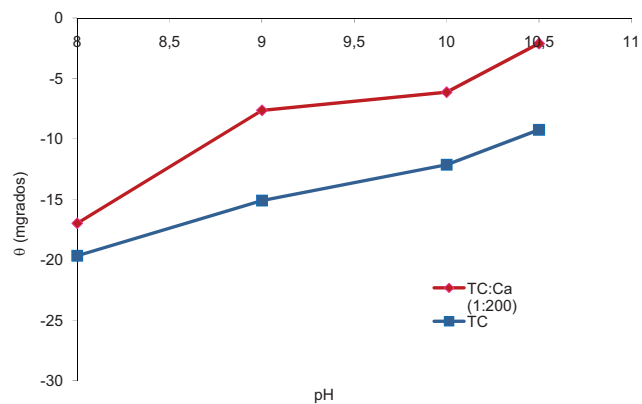


Fig. 2.32.- Efecto del pH en la elipticidad experimental ( $\theta$ ) en la región UV (270 nm).

Cuando el catión divalente es de menor radio iónico, como el  $Mg^{2+}$ , no se observa cambio conformacional en la formación de complejos TC-Mg prevaleciendo la conformación plegada (Lambs et al., 1988a).

### 2.5.5 Difracción de rayos X

En la Fig. 2.33 se presenta el difractograma de tetraciclina en polvo. Las reflexiones diagnósticas halladas en el espectro se presentan en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7.- Reflexiones y espaciados de tetraciclina en polvo.

<b>2-<math>\theta</math></b>	<b><math>d</math> (Å)</b>	<b>I (rel)</b>
11,16	7,9	60
13,73	6,4	50
15,88	5,6	100
19,88	4,5	60
21,50	4,1	35
22,20	4,0	35
23,84	3,7	30
25,95	3,4	30

El espectro de la muestra de TC en polvo coincide con el encontrado en la base de datos (Database JCPDS file 39-1987) lo que corrobora, a través de este método, la pureza de la muestra.

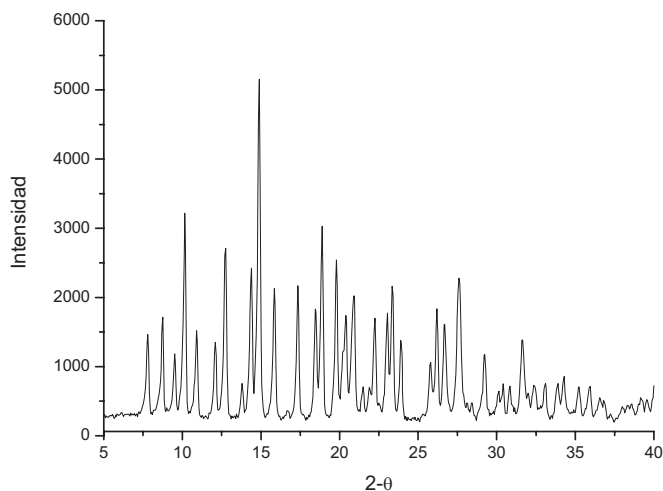


Fig. 2.33.- Diagrama de DRX total de tetraciclina en polvo

Considerando que los estudios de adsorción de TC sobre montmorillonita se llevarán a cabo en sistemas acuosos, se analizó el DRX de una dispersión acuosa saturada de TC sobre vidrio y seca al aire. Las principales reflexiones halladas en el rango en el que posteriormente se analizarán los complejos de adsorción (2 a 40 ° 2 $\theta$ ) se presentan en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8.- Reflexiones y espaciados del sólido obtenido a partir de solución saturada de tetraciclina.

<b>2-<math>\theta</math> (°)</b>	<b><math>d</math> (Å)</b>
8,09	10,9
9,97	8,9
21,50	4,1
23,84	3,7
25,95	3,4

Según se pudo observar, las reflexiones de TC hasta los 10° 2 $\theta$  se superponen a los que presenta la montmorillonita: d001 (6,8° 2 $\theta$ ) y d002 (14,1° 2 $\theta$ ); por lo tanto las reflexiones identificables de TC en dispersión acuosa son aquellas que se encuentran entre los 21° y 26° 2 $\theta$ .



### 2.5.6 Microscopía electrónica de barrido

Los cristales de TC se observaron por microscopía de barrido electrónico para evaluar la morfología de sus partículas.

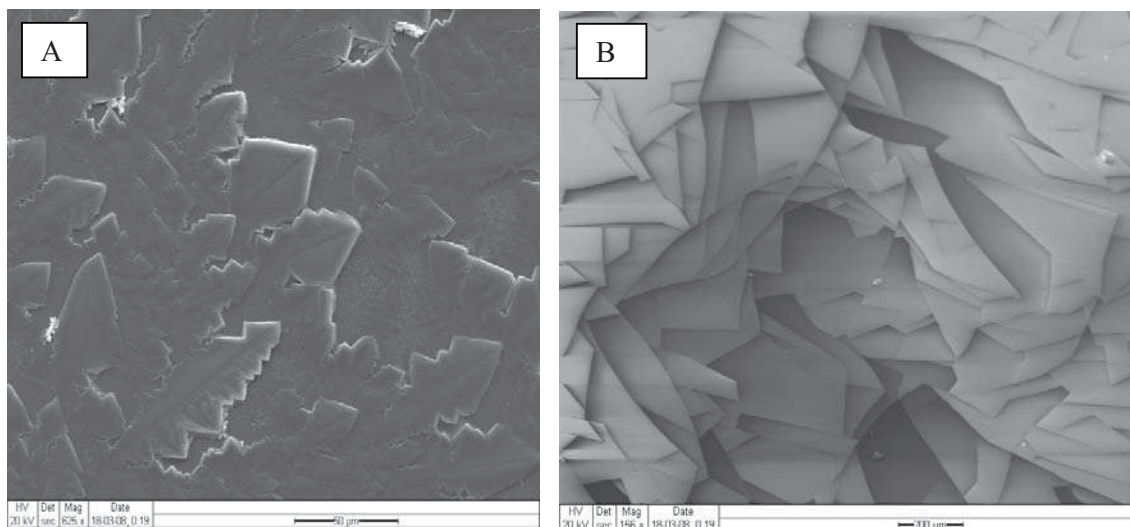


Fig. 2.34.- Microfotografía correspondiente al sólido obtenido a partir de soluciones de TC. A.- solución 1,04 mM. B.- solución saturada.

El hábito de una sustancia cristalina es la forma final que adopta un cristal en función de la saturación de la solución y del espacio disponible para el desarrollo de los mismos, siendo independiente de su estructura interna.

En las Fig. 2.34 A y B se observan las microfotografías de los cristales de TC más representativas de las muestras correspondientes. Los cristales de TC generados con la solución de menor concentración se presentan como láminas con bordes aserrados y extremos símil punta de flecha, todos ellos con disposición basal. Los cristales generados con la solución saturada son de mayor tamaño (>300 μm) y de formas de puntas de flechas con disposición cara-cara.

### 2.5.7 Efecto del pH del medio en la estabilidad de soluciones acuosas de TC.

Las Fig. 2.35 y 2.36 muestran las variaciones en los valores de absorbancia a 357nm (característica del cromóforo BCD) y a 270 nm (característica del cromóforo A) de soluciones de TC (2,78mM), con respecto a

la solución recientemente preparada, a medida que transcurre el tiempo de incubación a diferentes valores de pH.

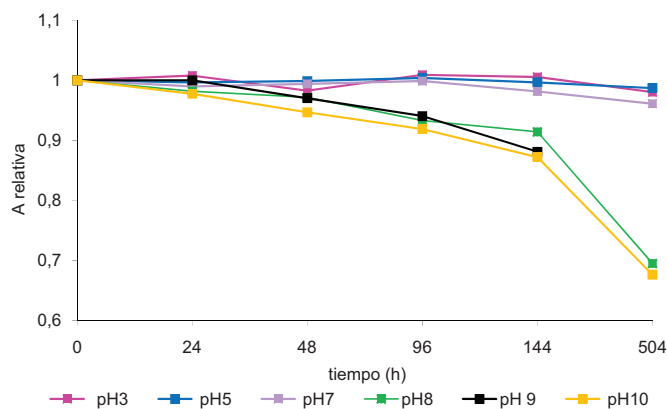


Fig. 2.35.- Variaciones en la absorbancia correspondientes al cromóforo BCD a lo largo del tiempo.

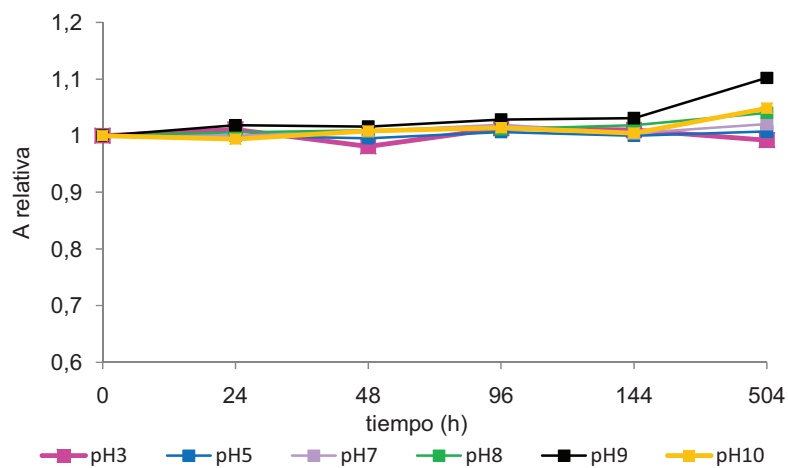


Fig. 2.36.- Variaciones en la absorbancia correspondientes al cromóforo A.

No se observan variaciones significativas en lo que respecta a la absorbancia a 270 nm a ningún pH. Por el contrario, la absorbancia a 357 nm sólo permanece sin cambios a valores de pH iguales o menores a 7, disminuyendo marcadamente con el tiempo de incubación a pH 8, 9 y 10. Estos resultados sugieren que la degradación a pH neutros y bajos no es significativa, pero que sí ocurre degradación apreciable en medio alcalino. Esta

degradación es seguramente debida a la formación de isotetraciclina (Ali, 1984), y afecta principalmente la banda característica del cromóforo BCD.

## 2.6 Conclusiones

Las propiedades fisicoquímicas de TC permiten lograr especies de diferente carga eléctrica según el pH del medio y hacen posible su análisis por diversos métodos espectroscópicos.

La molécula de TC presenta dos cromóforos localizados en el anillo A y en el anillo BCD de la molécula, separados por el enlace C12a-C4a, cuyas orientaciones relativas dependen del estado de protonación de los grupos funcionales o la formación de complejos. El pH del medio y la presencia de cationes divalentes determinan la posición de las bandas de absorción UV-vis.

Las modificaciones encontradas en los espectros de absorción UV-vis en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  son coincidentes con las informadas por otros autores (Wessels et al., 1998), quienes proponen la formación de complejos 1:2 (TC:Ca) a partir de ambos cromóforos (anillo A y sistema de anillos BCD). A bajas concentraciones de Ca se observa corrimiento en la banda de mayor longitud de onda, poniendo en evidencia que el primer sitio de quelación es el sistema de anillos BCD de la molécula. A mayores concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , el catión puede coordinar con los oxígenos de las posiciones 1 (cromóforo A) y 12 (cromóforo BCD) de la molécula, involucrando a ambos sistemas y promoviendo la conformación extendida.

Las soluciones acuosas de TC son estables a distintos valores de pH durante el tiempo en que se llevaron a cabo los estudios de adsorción (24 h).

La TC es un agente coagulante de la montmorillonita aumentando la inestabilidad de la dispersión acuosa, especialmente cuando la relación TC:montmorillonita supera a la CIC del mineral.

---

---

### 3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS CON MINERALES ARCILLOSOS

#### 3.1 Mecanismos de adsorción de compuestos orgánicos sobre minerales arcillosos

Los mecanismos químicos de interacción entre solutos orgánicos y la superficie de minerales arcillosos a escala molecular han sido estudiados por varios autores como [Theng \(1974\)](#), [Lagaly \(1984\)](#), [Raussells-Colom y Serratosa \(1987\)](#), y [McBride \(1994\)](#). Para llevar a cabo estudios sobre procesos de adsorción es necesario determinar las propiedades químicas de la especie adsorbida, su localización en la superficie del adsorbente y sitios superficiales involucrados, qué grupos funcionales del soluto interaccionan con la superficie y su dinámica molecular. En la adsorción de moléculas neutras sobre esmectitas intervienen diversas interacciones químicas: puente hidrógeno, interacciones ión-dipolo, reacciones ácido-base, de transferencia de carga y fuerzas de van der Waals ([Lagaly, 1993](#)). El tamaño molecular, polaridad y carga del soluto orgánico determinan las interacciones con la superficie del mineral.

La adsorción de moléculas orgánicas a la superficie de la montmorillonita involucra la remoción de las moléculas de solutos de la solución y de las moléculas de agua de la superficie del sólido. Las moléculas orgánicas polares o cationes orgánicos de alto peso molecular como la TC se acumulan en la interfaz sólido-solución principalmente debido a que la parte hidrocarbonada de la molécula tiene baja afinidad por la fase acuosa. Para los solutos orgánicos además de las interacciones eléctricas y reacciones químicas con la superficie del mineral, la expulsión hidrofóbica del soluto por interacciones con el solvente, también tiene lugar ([Stumm, 1992](#)).

Cuando el soluto es un *cation orgánico*, las reacciones de intercambio iónico son características y altamente selectivas respecto de los cationes inorgánicos ([Jaynes y Boyd, 1991](#); [Smith et al., 1992](#)). Existen numerosos estudios sobre el comportamiento de adsorción de herbicidas catiónicos ([Ogram et al., 1985](#)), colorantes catiónicos ([Rytwo et al., 1991](#)) y modificaciones hidrofóbicas de superficies de minerales con cationes de alquilamonio ([Bergaya y Lagaly, 2001](#)). A manera de ejemplo, la reacción de

---

intercambio entre el colorante catiónico azul de metileno ( $MB^+$ ) y una montmorillonita sódica (Mont-Na) se representa como:



la ley de acción de masa para esta reacción es:

$$K_{MB} = \frac{(Mont - MB)[Na^+]}{(Mont - Na)[MB^+]}$$

donde  $K_{MB}$  representa la constante de adsorción,  $[Na^+]$  y  $[MB^+]$  representan la concentración de los cationes de la solución en equilibrio.

La mayor afinidad de los minerales arcillosos por los cationes orgánicos sobre los alcalinos y alcalino-térreos es debida a la combinación de fuerzas electrostáticas y no coulombicas. Esta afinidad incrementa a medida que aumenta la extensión de la fracción alquílica en la molécula (Cowan y White, 1960). En relación a los sitios activos del mineral, un catión orgánico interacciona con los sitios de sustitución isomórfica y las cargas de borde por intercambio iónico y con la superficie siloxánica neutra por interacciones de van der Waals. Cuando el soluto orgánico aumenta su tamaño molecular, se incrementa la contribución de las fuerzas de atracción de van der Waals, pudiendo llegar a dominar el proceso de adsorción (Theng, 1974). Sin embargo, si la molécula es de muy grandes dimensiones y el mineral tiene una densidad de carga elevada, el impedimento estérico dificulta el acceso al espacio interlaminar. Para una esmectita, esto ocurre cuando la longitud transversal de la molécula orgánica es de aproximadamente 50 Å (Johnston, 1996). La disposición y orientación del catión orgánico en el espacio interlaminar depende no sólo del tamaño y forma de la molécula sino también de la densidad de carga del mineral arcilloso. La localización de moléculas orgánicas en el espacio interlaminar recibe el nombre de intercalación. Cuando la intercalación tiene lugar desde una solución, puede haber coadsorción de moléculas del solvente o remoción de las mismas desde el espacio interlaminar.

Los minerales arcillosos como las montmorillonitas pueden adsorber cationes orgánicos en una concentración superior a su capacidad de intercambio y esto indica que la interacción mineral-catión no es solamente de

---

tipo electrostático. La contribución de las fuerzas de van der Waals es la responsable de la adsorción en exceso a la capacidad de intercambio del mineral arcilloso (Rytwo et al., 1991). Cuando el catión orgánico reemplaza al catión inorgánico de intercambio, la superficie del mineral cambia su naturaleza hidrofílica a hidrofóbica. Debido a fuertes interacciones con la superficie algunos herbicidas, catiónicos orgánicos, mostraron una menor degradación microbiológica (Ogram et al., 1985).

Cuando el soluto es una *base orgánica* el comportamiento de adsorción depende del pH del medio; se debe tener en cuenta el equilibrio de distribución entre las especies neutra y protonada y el valor de pKa para establecer a qué valores de pH la molécula se encuentra cargada positivamente y es adsorbida como catión orgánico, compitiendo por los sitios de carga negativa del mineral con el catión inorgánico. A valores de pH superiores al pKa del soluto, la adsorción de las bases orgánicas se produce debido a fuerzas de van der Waals y la concentración adsorbida disminuye respecto de los bajos valores de pH.

La superficie de las esmectitas tienen naturaleza ácida debido a la polarización de las moléculas de agua coordinadas al catión de intercambio y facilitan la protonación de especies orgánicas básicas (Mortland, 1967). La protonación de un soluto orgánico sobre la superficie del mineral depende de la naturaleza del catión de intercambio, el grado de hidratación y el valor de pKa de la especie orgánica (Mortland y Raman, 1968). Ciertos solutos orgánicos pueden presentar quimisorción sobre la superficie del mineral, compitiendo con las moléculas de agua que se encuentran coordinadas al catión de intercambio. El desplazamiento de moléculas de agua de esmectitas hidratadas depende del catión de intercambio del mineral y de los grupos funcionales de la molécula que intervienen en el proceso de adsorción. Las moléculas de agua que hidratan cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son desplazados por grupos hidroxilos y no por aminas (Lagaly, 2006).

Para *solutos orgánicos no polares* volátiles, la adsorción a la superficie del mineral depende del estado de hidratación (Rhue et al., 1989). Para bajos grados de hidratación queda expuesta la superficie siloxánica neutra para la interacción con el soluto orgánico presente en fase vapor por fuerzas de van der Waals. La interacción entre un soluto orgánico volátil y la superficie del mineral arcilloso es débil. En presencia de altos contenidos de agua, la superficie del mineral adquiere características hidrofílicas y disminuye la

---

afinidad por el soluto orgánico. En general, los minerales arcillosos tienen baja afinidad por solutos orgánicos no polares en solución acuosa debido a que no pueden competir con el agua por los sitios de adsorción del mineral.

El reemplazo de los cationes intercambiables inorgánicos del mineral por cationes orgánicos de distinta longitud de cadena alquílica, a través de reacciones de intercambio iónico, le concede naturaleza hidrofóbica al mineral y aumenta la afinidad de solutos orgánicos no polares por las arcillas modificadas en suspensiones acuosas.

### 3.2 Métodos analíticos para determinar la interacción de un compuesto orgánico con el mineral arcilloso.

Determinados métodos físicos, como la espectroscopía óptica, pueden proveer información acerca de las interacciones químicas de un adsorbato orgánico con la superficie del mineral. La interacción de un complejo de adsorción con la radiación electromagnética contribuye al conocimiento de la especiación superficial, la conformación del adsorbato y las características del entorno químico en la interfaz sólido/líquido, que difieren de la solución. La posición de las bandas de absorción de las moléculas sobre la superficie del mineral sufre modificaciones respecto de la solución (Schoonheydt y Johnston, 2006). A modo de ejemplo, la Tabla 3.1 muestra las posiciones de las bandas de absorción de varias moléculas orgánicas cuando están en solución acuosa y cuando están adsorbidas en un mineral arcilloso.

Tabla 3.1. Posición de las bandas de absorción de moléculas de colorantes en solución acuosa y sobre la superficie de mineral arcilloso (Schoonheydt y Johnston, 2006).

Colorante catiónico	$\lambda_{\max}$ en agua	$\lambda_{\max}$ sobre superficie de mineral
Azul de metileno	664	670,652
Rodamina 6G	526	533
Rodamina B	555	562
Cristal violeta	595	610
Tionina	595	621
Acridina	490	500

Los dipolos del estado fundamental y del estado excitado interactúan con las moléculas del solvente y con los átomos de oxígeno de la superficie del mineral. La posición de la banda de absorción correspondiente a la transición electrónica está influenciada por estas interacciones.

El espectro de absorción UV-vis de sustancias orgánicas que pueden sufrir reacciones de protonación-deprotonación es sensible al pH de la solución. La presencia de grupos con electrones no enlazantes en la molécula que pueden conjugar con un sistema electrónico  $\pi$ , desplaza las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  a valores de energía menores, observándose un desplazamiento batocrómico en la banda de absorción.

En ausencia de interacciones específicas, el intercambio catiónico del adsorbato conduce a la concentración de las moléculas sobre la superficie del mineral. Las moléculas de adsorbato pueden encontrarse distribuidas sobre la superficie o formar dímeros y agregados. La agregación molecular se traduce en modificaciones espectrales (Traina y Chattopadhyay, 1996) y en un bajo cumplimiento de la ley de Lambert-Beer. La disposición de las moléculas sobre la superficie depende de la concentración adsorbida, el catión de intercambio del mineral, el tipo de mineral arcilloso utilizado como adsorbente y el tiempo de contacto adsorbato-adsorbente (Jacobs y Schoonheydt, 2001).

A partir del análisis de las modificaciones espectrales producidas por agregación molecular de colorantes, se han propuesto varios tipos de agregados. Los agregados tipo H (Fig. 3.1) se forman cuando las moléculas se organizan cara a cara en un eje vertical. La banda de absorción de estos agregados se observa a menor longitud de onda que la banda correspondiente al monómero. Mediante la teoría del excitón molecular se explica la relación entre la orientación relativa del cromóforo y los corrimientos espectrales en agregados moleculares de colorantes (Levinson et al., 1957; McRae y Kasha, 1958; Kasha et al., 1965). De acuerdo a esta teoría, la interacción de la transición dipolar desdobra el estado excitado del agregado molecular en tantos niveles como número de monómeros presente el agregado. Para dímeros se forman dos niveles (Fig. 3.2) con energías e intensidades que dependen de la geometría de la interacción (Katoh et al., 1997).

---



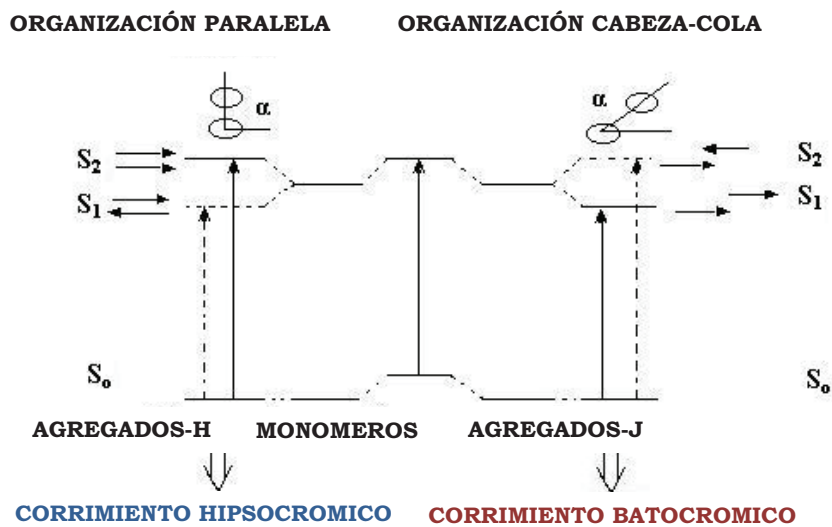


Fig 3.1-Representación esquemática de la relación entre la disposición de los cromóforos y las modificaciones espectrales (Kato et al., 1997).

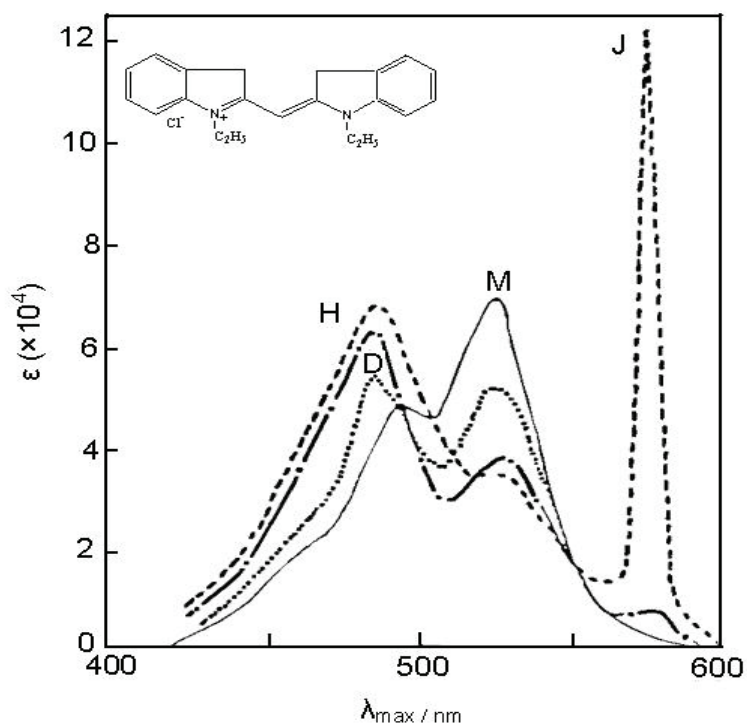


Fig.3.2- Espectros de absorción UV-vis de soluciones de cloruro de 1,1'-diethyl-2,2'-cianina a temperatura ambiente. M, D, H y J corresponden a monómeros, dímeros y agregados respectivamente (Mishra et al., 2000).

El dicroísmo circular (DC) es observado cuando un haz de luz circularmente polarizado atraviesa un medio ópticamente activo. Esta característica la presentan la mayoría de las macromoléculas biológicas. Las soluciones de estas sustancias son ópticamente activas y presentan un espectro de DC que es altamente sensible a la configuración molecular; la imagen especular de un estereoisómero muestra un espectro DC que también es su imagen. Los coeficientes de absorción de la luz polarizada circularmente a izquierda y derecha son diferentes, por lo tanto en un espectro DC se representa la diferencia del coeficiente de absorción,  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{izquierda}} - \varepsilon_{\text{derecha}}$ . Mediante dicroísmo circular se analizó la orientación relativa y distancia entre moléculas quirales y no quirales coadsorbidas sobre saponita (Naka et al., 2003) y las transiciones conformacionales de moléculas de ADN luego de la adsorción a montmorillonitas y caolinitas (Cai et al., 2006).

La absorción de radiación IR por minerales arcillosos depende de las masas atómicas, la longitud y fuerzas de enlace en la estructura del mineral como así también de la simetría de la celda unidad. La interpretación de espectros generalmente se lleva a cabo por asignación empírica de las bandas observadas en los espectros a los modos de vibración del grupo funcional correspondiente. Farmer (1974) desarrolló un completo estudio sobre espectroscopía IR de minerales arcillosos.

La espectroscopía IR es una herramienta muy utilizada para estudiar interacciones entre compuestos orgánicos y minerales arcillosos. Las frecuencias de absorción IR están relacionadas a la polarización de los grupos funcionales de la molécula y directamente influenciadas por el entorno químico. Cambios de la frecuencia de absorción inducida por el catión de intercambio pone en evidencia importantes interacciones ión-dipolo (Yamanaka et al., 1974).

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica estándar de identificación de minerales (Moore y Reynolds, 1997); provee datos muy representativos debido a que cada medida corresponde a un promedio de millones de partículas de mineral arcilloso. Los minerales arcillosos que presentan hinchamiento en medios acuosos como la montmorillonita modifican el espaciado basal, en la dirección del eje *c*, en función de la molécula

---

---

intercalada en los procesos de adsorción. Estos cambios en los espaciados basales pueden ser registrados mediante difracción de rayos X.

Si el tamaño de la muestra es limitado se recurre a la microscopía electrónica para el análisis de partículas individuales del mineral. Para determinar la disposición de la molécula orgánica adsorbida en el espacio interlaminar se considera el tamaño y forma de la molécula adsorbida y los cambios en el espaciado basal observados en los diagramas de difracción de rayos X.

La información obtenida por DRX acerca de la estructura del mineral arcilloso sirve como base para interpretar el análisis morfológico por microscopía óptica de transmisión (TEM). [Vali y Köster \(1986\)](#) presentaron imágenes TEM de minerales arcillosos luego de la intercalación con iones alquilamonio, demostrando ser una técnica útil para investigar arcillas intercaladas con cationes orgánicos.

### **3.3 Experimental: Evidencias de interacción tetraciclina-montmorillonita**

#### **3.3.1 Análisis espectroscópico del sistema de adsorción.**

*Espectroscopía UV-vis:* Se prepararon sistemas de adsorción TC-montmorillonita a pH 3, 4 y 7, utilizando como electrolito una solución de NaCl 0,01 M. Se trabajó con dispersiones acuosas que mantienen al mineral arcilloso en un estado totalmente solvatado y con una concentración de TC que corresponde al 15% de la capacidad de intercambio del mineral, de manera que gran parte de la TC presente en el sistema se encuentre adsorbida a la montmorillonita. El sistema de adsorción se preparó poniendo en contacto, en tubos de centrífuga de 10 mL, 4 mL de dispersión del mineral arcilloso (900 mg L<sup>-1</sup>) en solución de NaCl 0,01 M, previamente agitado y sonicado durante 24 h, 3,8 mL de solución de electrolito y 0,2 mL de solución stock de TC (1,3360 gL<sup>-1</sup>) recientemente preparada para evitar posibles degradaciones. Se agitó posteriormente el sistema y, si fue necesario, se reajustó el pH. Los tubos se prepararon por duplicado y se mantuvieron en oscuridad y agitación constante durante 24 horas.

Posteriormente se registraron los espectros UV-vis de las dispersiones TC-montmorillonita en la región 600-200 nm. Los espectros fueron obtenidos con un espectrofotómetro SHIMADZU 240 y para corregir por interferencias

---

---

debidas a la reflexión de la luz por las partículas del mineral, se preparó una dispersión de referencia con 2mL de la dispersión del mineral arcilloso y 2 mL de solución de NaCl 0,01 M. Los espectros de las dispersiones fueron comparados con los correspondientes a soluciones de TC 0,069 mM, de igual concentración a la presente en el sistema de adsorción, para cada uno de los pH analizados.

A fin de comparar el efecto del catión de intercambio de la montmorillonita en el espectro de absorción del sistema TC-montmorillonita, se prepararon sistemas de adsorción TC-montmorillonita cálcica a pH 7, utilizando como electrolito una solución de NaCl 0,01 M. Los sistemas fueron preparados en las mismas condiciones que para montmorillonita natural sódica. La relación Ca:TC en el sistema de adsorción fue 3,4:1. Para corregir por interferencias debidas a la reflexión de la luz por las partículas del mineral, se preparó una dispersión de referencia a pH 7.

Espectroscopía IR: Se prepararon los sistemas de adsorción de TC-montmorillonita natural (relación inicial 170 mmolesTC/100g montmorillonita) a pH 3 y 7, luego de 24 h de agitación en oscuridad, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos, se separó el sobrenadante y el sólido fue secado en estufa a 40°C durante 48 h. Se prepararon pastillas sobre soporte de KBr (3 mg de muestra en 300 mg de KBr). A partir del sobrenadante se determinó la absorbancia de TC en equilibrio y se calculó la cantidad de TC adsorbida al mineral como diferencia entre la concentración inicial y la correspondiente al equilibrio.

Se preparó además una mezcla de sólidos TC-montmorillonita con la misma relación adsorbato-adsorbente que el complejo de adsorción a pH 3. Los espectros IR fueron registrados utilizando un Espectrofotómetro BUCK 500 (detector DLATGS) en la región 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Espectroscopía ATR-IR: Los espectros de absorción ATR-FTIR fueron registrados utilizando un equipo NICOLET Magna 560 FTIR que cuenta con un detector DTGS, un accesorio Smart RK ATR y un cristal de ZnSe (Fig. 3.4).

---



Fig. 3.4- Espectrofotómetro FTIR con accesorio ATR

Se preparó una dispersión stock de montmorillonita (10 g/L) que fue agitada y sonicada durante 1h y posteriormente se ajustó el pH de la dispersión utilizando soluciones de NaOH y de HCl. Se cubrió el cristal de ZnSe con la dispersión y se dejó secar en un desecador y al vacío para obtener un film homogéneo. Posteriormente se realizaron varios lavados con agua MilliQ, a fin de eliminar el exceso de partículas sólidas sobre el film. Para registrar el espectro correspondiente al blanco, se cubrió el film de montmorillonita con solución de NaCl 0,01 M al pH correspondiente para cada determinación. Luego de registrado el espectro, la solución de electrolito fue reemplazada por una solución de TC  $7,27 \times 10^{-4}$  M al pH correspondiente. Se registraron los espectros en función del tiempo para la región  $800-4000 \text{ cm}^{-1}$ . Cada espectro es el resultado de 256 interferogramas, con una resolución espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Luego de obtenidos los espectros de absorción de IR, se analizaron matemáticamente las bandas de absorción utilizando el programa Peak Fit. Las determinaciones se llevaron a cabo a pH 4,5, 6, 7, 8 y 9.

Dicroísmo circular: A partir de una solución madre de clorhidrato de tetraciclina ( $1,3360 \text{ gL}^{-1}$ ) y de dispersiones de montmorillonita en NaCl 0,01 M ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ), se prepararon sistemas de adsorción TC/montmorillonita sódica y TC/montmorillonita cálcica a pH 7 y 8, con una relación inicial TC/montmorillonita muy inferior a la capacidad de intercambio, de manera de asegurar que las moléculas de TC se encuentren en su mayoría adsorbidas al mineral ( $7,72 \text{ mmoles TC}/100\text{g}$ ). La relación Ca:TC para el complejo de adsorción utilizando montmorillonita cálcica fue de 3,4:1. Se registraron, además, los espectros DC de soluciones acuosas de TC de igual concentración a los complejos de adsorción ( $0,035 \text{ mM}$ ) a pH 7 y 8 y soluciones de TC en presencia de calcio en una relación 200:1 a pH 7 y 8.

---

El control de pH de las soluciones se realizó mediante el agregado de soluciones de NaOH y HCl y se utilizó NaCl 0,01 M como electrolito soporte.

Como espectro *background* se utilizó una dispersión del mineral de igual concentración que la de los sistemas de adsorción para cada uno de los valores de pH analizados.

Los espectros de dicroísmo circular fueron registrados utilizando un espectropolarímetro JASCO (J-810) en un rango de 200-450 nm, se trabajó con un ancho de banda de 3 nm. Los resultados fueron expresados como coeficientes de absorptividad molar ( $\Delta\epsilon$ ) expresado en miligrados  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , siendo:

$$[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$$
$$[\theta] = \theta / c l$$

[ $\theta$ ]=elipticidad específica (miligrados  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )  
c: concentración de la solución (g/100mL)  
l: paso óptico (cm)

### 3.3.2 Difracción de rayos X del sistema de adsorción.

Los diagramas de DRX fueron obtenidos usando un difractómetro Rigaku DII Max Geigerflex con tubo de  $\text{CuK}\alpha$ , a 40 kV y 20 mA. Los registros se realizaron entre  $2^\circ$  y  $40^\circ$  ( $2\theta$ ), con una velocidad de  $2^\circ/\text{min}$ .

Se registraron los diagramas a partir de:

- mezclas del mineral arcilloso y TC en polvo (130 mg TC/500 mg montmorillonita).
- dispersiones en NaCl 0,01 M de complejos de adsorción TC-montmorillonita sódica a pH 3 y pH 7.
- complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica a pH 7.
- complejos de adsorción MC-montmorillonita sódica a pH 3 y 7.

Los diagramas fueron comparados con los obtenidos a partir de dispersiones en NaCl 0,01M de las montmorillonitas correspondientes (15 mg/mL) para cada pH.

Para la preparación de los complejos de adsorción TC-montmorillonita sódica se pusieron en contacto 40 mL dispersión de montmorillonita ( $900 \text{ mg L}^{-1}$ ) con volúmenes variables de solución stock de TC ( $1,336 \text{ gL}^{-1}$ ). El electrolito utilizado fue NaCl 0,01 M y el pH fue controlado mediante soluciones de NaCl y HCl. El sistema se mantuvo en oscuridad a  $20^\circ \text{C}$  y agitación constante

---

---

durante 24 horas. Luego se centrifugó a 8000 rpm (10000 x g) durante 30 minutos, el sobrenadante se separó y se recuperó el residuo con un volumen de NaCl 0,01 M que permita obtener una dispersión de montmorillonita (15 mg/mL).

Las dispersiones fueron colocadas sobre placas de vidrio y secadas bajo condiciones de humedad constante de 36 %, lográndose así un preparado orientado según (001).

A partir del sobrenadante se calculó la concentración de TC en equilibrio ( $C_e$ ) y luego la cantidad de TC adsorbida al mineral ( $C_s$ ), siendo

$$C_s = C_{\text{inicial}} - C_e$$

A fin de estudiar el efecto de la presencia de iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con el complejo TC-montmorillonita cálcica sobre el espacio intercapa del mineral, se prepararon complejos de adsorción TC-montmorillonita en agua destilada y en presencia de electrolito. Se utilizaron soluciones de NaCl 0,01M y  $\text{CaCl}_2$  0,01M como electrolitos. La concentración de TC en los tubos fue  $5,21 \times 10^{-4}$  M y la relación inicial TC:montmorillonita fue el doble a la capacidad de intercambio catiónico del mineral.

### **3.3.3 Evaluación del pH de la dispersión de montmorillonita en presencia de tetraciclina.**

Se preparó la una dispersión del mineral arcilloso (450 mg/500mL) en NaCl 0,01 M que se mantuvo en agitación constante durante 24 horas. El sistema se mantuvo a pH 5, bajo corriente de nitrógeno. Una solución stock de tetraciclina ( $1,3360 \text{ gL}^{-1}$ ), preparada a pH 5 y en NaCl 0,01M, se conservó en las mismas condiciones que la suspensión del mineral. En estas condiciones de pH la tetraciclina se encuentra mayoritariamente como especie zwitteriónica.

Se agregaron alícuotas de 4 mL de solución stock de TC a 80 mL de dispersión del mineral, manteniendo el sistema en agitación constante y bajo corriente de nitrógeno, y luego de 2 minutos de cada agregado de solución de TC se registró el pH del sistema. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

---

De manera similar, se realizaron experiencias donde se agregó solución de TC a 80 mL de una solución de NaCl 0,01 M (en ausencia de montmorillonita). Las experiencias se realizaron por duplicado.

#### **3.3.4 Análisis de Ca<sup>2+</sup> en equilibrio en sistemas de adsorción tetraciclina-montmorillonita cálcica por absorción atómica**

La determinación de Ca<sup>2+</sup> en sobrenadantes de sistemas de adsorción TC-montmorillonita cálcica, se llevó a cabo por absorción atómica utilizando un espectrofotómetro METROLAB 250 AA ( $\lambda=423$  nm, sensibilidad 0,05 ppm y límite de detección 1 ppm).

Se construyó la curva de calibración de Ca<sup>2+</sup> (2-8 ppm) a partir de un patrón de CaCO<sub>3</sub>. Se agregó La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a las soluciones a analizar para el control de interferencias de Si, Al, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Se utilizó agua bidestilada para preparar todas las soluciones.

Se analizó la concentración de Ca<sup>2+</sup> en sobrenadantes de sistemas de adsorción TC-montmorillonita cálcica en función del pH. Se prepararon sistemas de adsorción TC-montmorillonita cálcica (relación inicial 170 mmoles TC/100g montmorillonita) a fuerza iónica constante (NaCl 0,01 M) y distintos valores de pH (2-11,5). Luego del correspondiente ajuste del pH, los sistemas se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos y se separó el sobrenadante para la determinación de Ca<sup>2+</sup>. Se prepararon, además, dispersiones de montmorillonita cálcica a igual concentración que los sistemas de adsorción (22,5 mg/100mL) en NaCl 0,01 M y para cada valor de pH analizado para comparar los resultados obtenidos con las dispersiones de los complejos de adsorción.

#### **3.3.5 Microscopía electrónica de barrido SEM y TEM**

Las muestras analizadas por microscopía electrónica fueron los complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica a pH 7 (60 mmoles TC/100g).

Para el análisis por SEM se retomó el complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica con solución de NaCl 0,01 M y una gota de la dispersión se colocó sobre portamuestra de grafito. La morfología de las partículas del complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica se determinó

---



---

por microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis químico de EDX en un equipo Philips SEM-JEOL-515; las muestras fueron recubiertas con un film conductor de oro, siguiendo la técnica de [Goldstein y Muldoon \(1977\)](#).

Para el análisis por TEM los complejos de adsorción fueron lavados con solución de NaCl 0,01 M para eliminar los excesos de TC, posteriormente secados en estufa a 40 °C y molidos en mortero de ágata.

Las muestras de montmorillonita cálcica y los complejos de adsorción se pusieron en contacto con resina spurr durante 4 h. Posteriormente se colocó la preparación en una estufa a 60° C y se dejó toda la noche a fin de que la resina se solidifique. Los cortes del material sólido se realizaron en un ultra micrótomo LKB a temperatura ambiente, obteniéndose espesores de las secciones de 70 nm. Los cortes fueron colocados en grillas de cobre de 200 mesh para su observación en microscopio electrónico JEOL 100 CXII (voltage de aceleración: 100kV).

### **3.4 Resultados y discusión**

#### *Espectroscopía UV-vis:*

En la Fig. 3.5 se presentan los espectros UV-vis de soluciones de TC (0,069 mM) a pH 3, 4 y 7 y se los compara con los espectros en presencia de montmorillonita (TC 0,069 mM y montmorillonita 0,90 gL<sup>-1</sup>). A estas concentraciones de TC y montmorillonita, aproximadamente el 90 % de TC se encuentra adsorbida y por lo tanto el espectro del sistema corresponde principalmente a TC adsorbida al mineral.

Los espectros de TC en solución, tal como se indicó en el capítulo anterior, muestran las bandas características de TC a 270 nm, correspondiente al sistema tricarbonílico A y a 357 nm del cromóforo BCD ([Mitscher, 1978](#)).

---

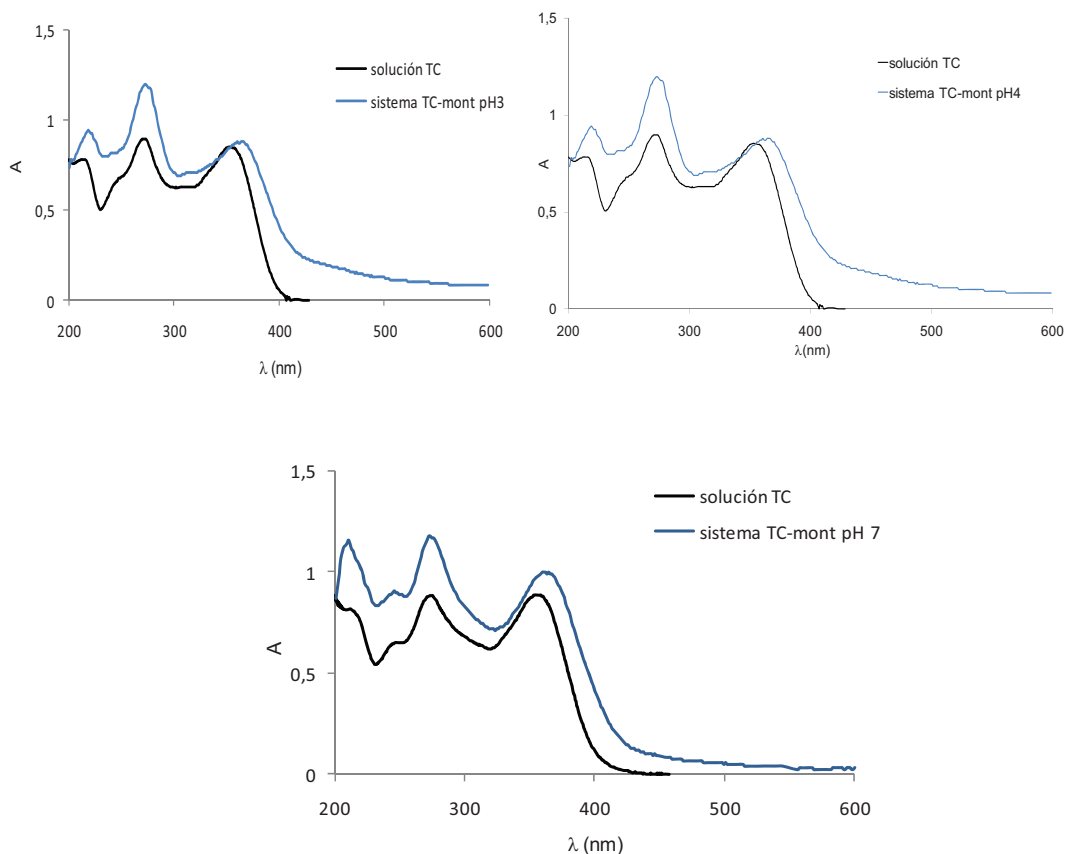


Fig. 3.5.- Espectros de absorción UV-vis de soluciones de TC (0,069 mM) y dispersiones TC-montmorillonita.

Los espectros de los sistemas de adsorción presentan las bandas de absorción UV-vis características de TC, observándose, además, absorción a longitudes de onda mayores a 420 nm debidas a la turbidez causada por la dispersión de montmorillonita. Si se comparan los espectros en ausencia y presencia de montmorillonita se puede observar que la banda de 357 nm es la que sufre los cambios más evidentes a los tres valores de pH analizados; se presenta un corrimiento batocrómico de 7 nm para pH 3 y de 4 nm para los valores de pH 4 y 7. Esta observación constituye una evidencia de interacciones de la tetraciclina con el mineral que podrían involucrar tanto la deprotonación de grupos del cromóforo BCD de la molécula o la interacción con formación de puente H con los grupos superficiales de la montmorillonita. También podría indicar un cambio conformacional inducido por la asociación en la interfase. Las modificaciones en las bandas correspondientes a la molécula de TC se producen debido a diferencias en la polaridad de los sitios

internos y externos del mineral debido a que el corrimiento batocrómico pone de manifiesto que el ambiente del compuesto adsorbido al mineral es más polar que el correspondiente a la solución (Lagaly, 2006). Otros autores como Caminati et al. (2002) observaron similares cambios en los espectros de absorción en la interacción de TC con fosfolípidos y proponen la deprotonación del grupo trialquilamino en posición 4 de la molécula por interacciones electrostáticas, como también cambios conformacionales en la molécula.

Cuando se compara los espectros de sistemas de adsorción de TC con montmorillonita sódica y cálcica (Fig. 3.6) se observa que cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es el catión de intercambio del mineral se produce un corrimiento batocrómico adicional de 7 nm en la banda correspondiente al cromóforo BCD a pH 7. Esto sugiere que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  como catión de intercambio aumenta la interacción entre el adsorbato y el sólido, interacción que probablemente ocurra a través del catión  $\text{Ca}^{2+}$  induciendo la deprotonación del grupo  $-\text{OH}_{12}$  ( $\text{pK}_{a2}$ : 7,7).

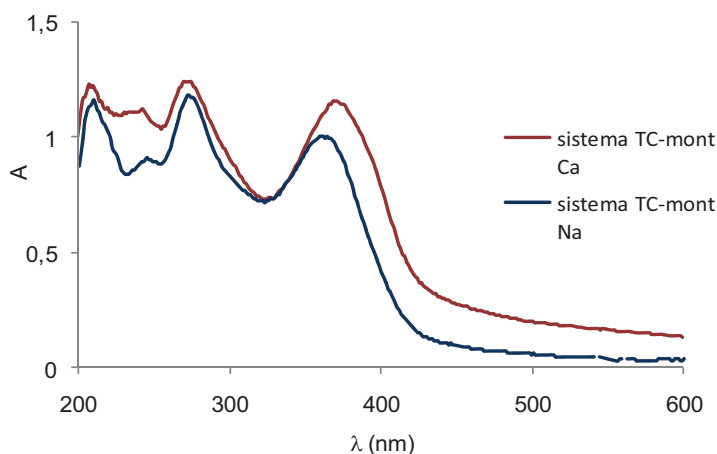


Fig. 3.6.- Espectro UV-vis de TC adsorbida a montmorillonita sódica y cálcica a pH7.

#### Espectroscopía IR:

En la Fig. 3.7 se presentan los espectros IR del mineral arcilloso en presencia y ausencia de TC. En ambas situaciones se observan las bandas a 3622 y 3411  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos  $-\text{OH}$  estructural del mineral y  $-\text{OH}$  de moléculas de agua respectivamente y la banda a 1040  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión del grupo Si-O del mineral (Madejová y Komadel, 2001).

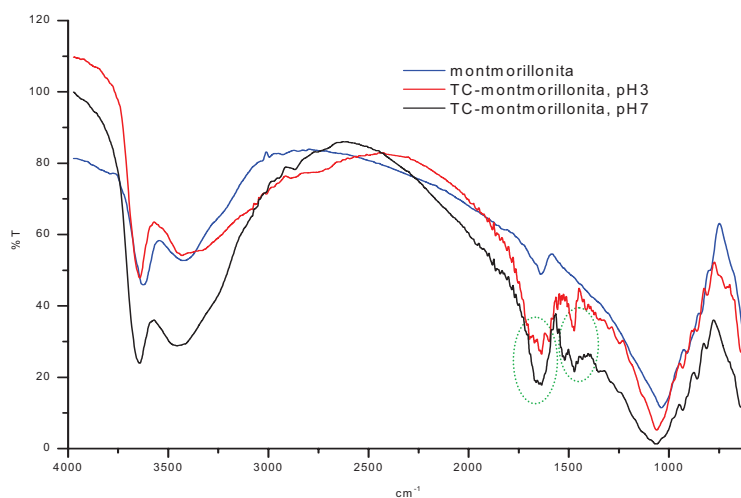


Fig.3.7.- Espectros IR de montmorillonita natural (3mg/300mg KBr) y los complejos de adsorción TC-montmorillonita (82 mmol/100g mineral) a pH 3 y (35 mmol/100g mineral) a pH7.

En el complejo de adsorción se observan algunas de las bandas correspondientes a la molécula de TC (Fig. 3.8) como la del grupo  $-\text{CH}_2$  ( $1466\text{ cm}^{-1}$ ) que no sufren modificaciones respecto del espectro obtenido para TC. Las bandas de los grupos carbonilo de TC a  $1632\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  anillo A) y  $1686\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  de amida) se observan en el complejo de adsorción a pH 3 con un desplazamiento de  $15\text{ cm}^{-1}$  respecto de TC y se presentan como una banda ancha a pH 7. Las bandas del grupo  $\text{NHR}_3^+$  en la región  $2700\text{--}2250\text{ cm}^{-1}$ , la correspondiente al grupo  $\text{C}=\text{O}$  del anillo C ( $1586\text{ cm}^{-1}$ ) y la del grupo  $\text{N-H}$  (amida II) a  $1526\text{ cm}^{-1}$  no son observables en los complejos de adsorción y se observan en la mezcla de sólidos TC/montmorillonita (Fig.3.9). Para estas mezclas la falta de interacción significativa entre moléculas de TC y el mineral hace que las posiciones de las bandas no se modifiquen respecto de las observadas en los espectros de TC pura y de la montmorillonita pura.

Las modificaciones observadas en las bandas correspondientes a los grupos  $\text{NHR}_3^+$  y grupos carbonilo de la molécula de TC indican que estos grupos polares están también involucrados en la interacción con el mineral. La interacción del grupo  $\text{NHR}_3^+$  puede ser fácilmente entendida si se supone atracción electrostática con las cargas estructurales negativas de la montmorillonita o a través de enlaces puente hidrógeno con los grupos superficiales de la misma.

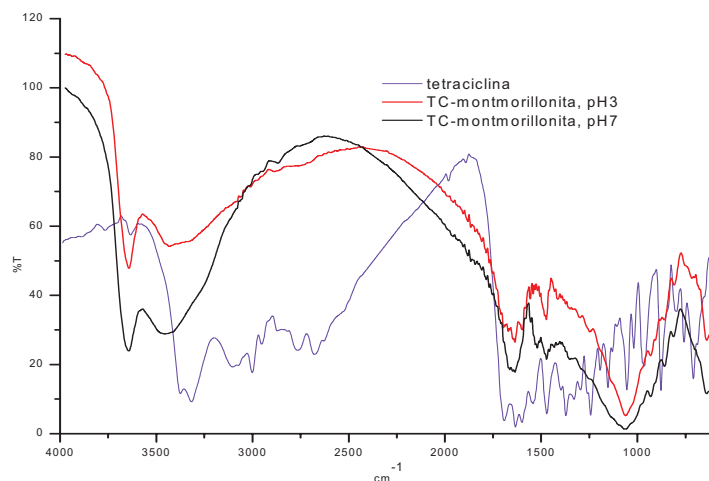


Fig. 3.8.- Espectros IR de tetraciclina (3mg/300 mg de KBr) y los complejos de adsorción TC-montmorillonita (82 mmol/100g mineral) a pH 3 y (35 mmol/100g mineral) a pH7.

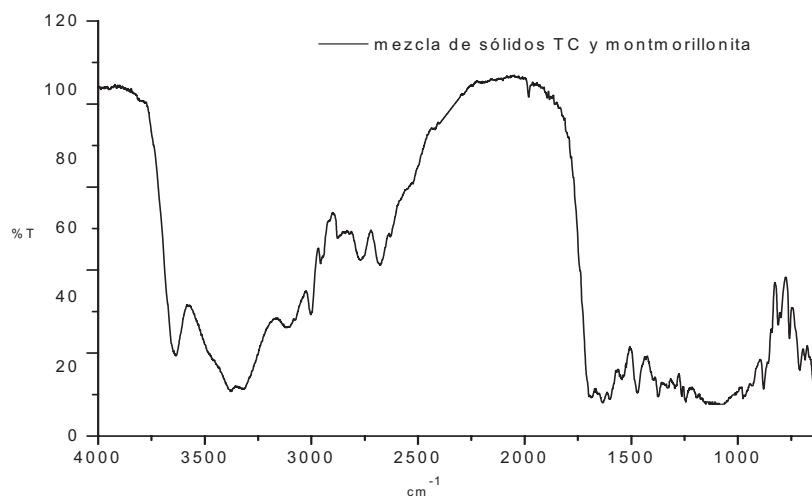


Fig.3.9.- Espectro IR de una mezcla de sólidos TC/ montmorillonita (82 mmol/100g mineral) en KBr.

#### Espectroscopia ATR-FTIR:

La Fig. 3.10 muestra algunos de los espectros obtenidos a diferentes tiempos de adsorción en la región 1200-1800 cm<sup>-1</sup> a pH 4,5 y 7.

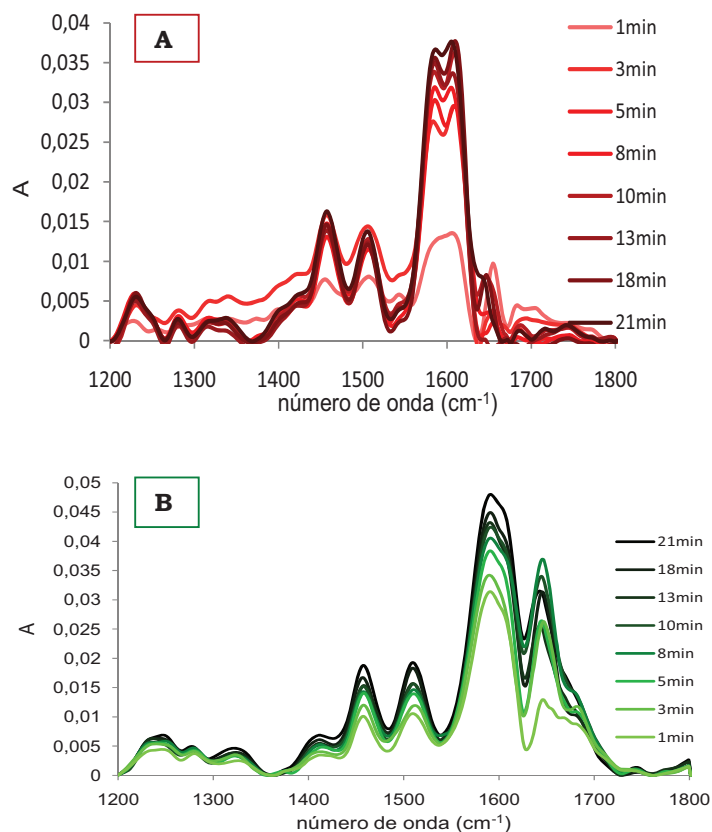


Fig. 3.10.- Espectros ATR-FTIR de tetraciclina ( $7,27 \times 10^{-4}$  M) sobre film de montmorillonita a pH 4,5 (A) y pH 7,0 (B).

Cabe remarcar que este tipo de espectros sólo pueden obtenerse en presencia de un film de arcilla sobre el cristal de ZnSe. En ausencia de arcilla, la concentración  $7,27 \times 10^{-4}$  M de TC es muy baja para dar señales significativas en el espectro. De hecho, los espectros ATR-FTIR mostrados en el capítulo 2 para TC en solución tuvieron que hacerse con concentraciones de alrededor de 0,01M para obtener señales apreciables. Por lo tanto, el espectro obtenido corresponde a TC adsorbida.

La deconvolución espectral a pH 4,5 para el espectro obtenido a los 21 minutos evidenció la presencia de las principales bandas a 1504, 1582, 1609 y 1639 cm<sup>-1</sup> y a pH 7 las bandas a 1510, 1590, 1613, 1641 y 1668 cm<sup>-1</sup>.

---

Si se comparan los espectros de absorción de los complejos TC-montmorillonita a pH 4,5 y la solución de TC a igual pH (Fig. 2.22) se observa que las bandas a 1582 y 1609  $\text{cm}^{-1}$  son las menos afectadas por la presencia del mineral. Estas bandas corresponden a vibraciones del C=O del anillo C y del anillo A de la molécula de TC. Mientras que se observan cambios significativos en las bandas de absorción correspondientes al grupo amida del anillo A y no se observa la banda correspondiente al grupo amino protonado en el complejo de adsorción. Los resultados sugieren que la interacción con la montmorillonita ocurre con participación de los grupos funcionales  $\text{CONH}_2$  y  $\text{NHR}_3^+$  del anillo A principalmente. Aunque en la literatura no se encuentran datos para el sistema TC-montmorillonita, similares resultados fueron encontrados por otros autores para la interacción de tetraciclina con otras sustancias. Para la interacción de tetraciclina con films de fosfolípidos, por ejemplo, [Caminati et al. \(2002\)](#) demostraron la participación de los grupos del anillo A de la molécula de TC con los grupos polares del ácido dipalmitoilfosfatídico por medio de análisis por espectroscopía UV-vis y FTIR/ATR. [Chang et al. \(2009\)](#), por otra parte, encontraron desplazamientos a mayores frecuencias en las bandas de absorción IR del grupo amida en complejos TC-rectorita, lo que también evidencia la participación de este grupo en la interacción con el sólido mencionado.

Comparando los espectros correspondientes al complejo de adsorción a pH 7 y la solución al mismo pH se puede señalar que, además del corrimiento a menor frecuencia en la banda del grupo amida similar al observado anteriormente, un aumento de 5  $\text{cm}^{-1}$  a mayores frecuencias en las bandas correspondientes a los grupos carbonilo de anillos A y C cuando TC se encuentra adsorbida a montmorillonita puede ser debida a la protonación del grupo O12 y pérdida de la deslocalización de electrones en el sistema de anillos BCD de la molécula.

Los estudios de adsorción por ATR-FTIR también fueron utilizados para seguir la cinética de adsorción. Para ello, los datos de absorbancia de la banda correspondiente al carbonilo del anillo C de la molécula de TC (1582  $\text{cm}^{-1}$ ) fueron registrados en función del tiempo de adsorción. Los resultados para pH 4,5 son mostrados en la Fig. 3.11. Se observa que la adsorción ocurre de

---

manera relativamente rápida, y que luego de los 20 minutos de adsorción se alcanza estabilidad en el sistema.

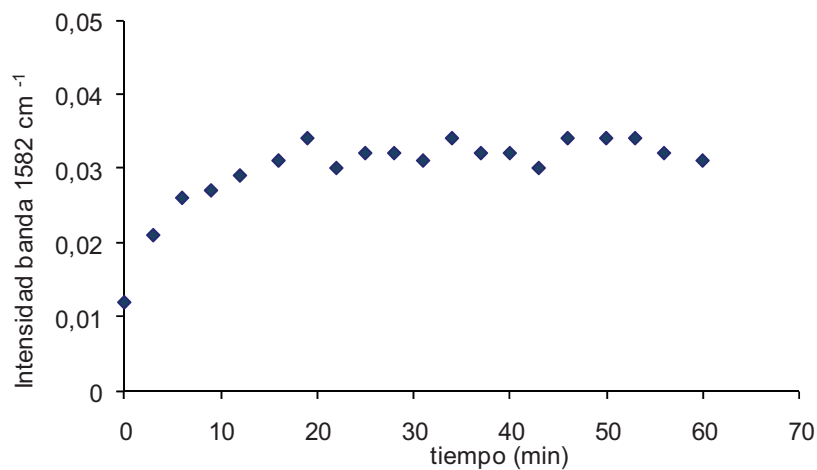


Fig. 3.11.- Cinética de adsorción TC-montmorillonita natural a pH4,5.

#### Dicroísmo circular:

El espectro de DC de TC junto con el espectro de TC adsorbida a montmorillonita sódica en iguales condiciones de concentración y pH se observan en la Fig. 3.12.

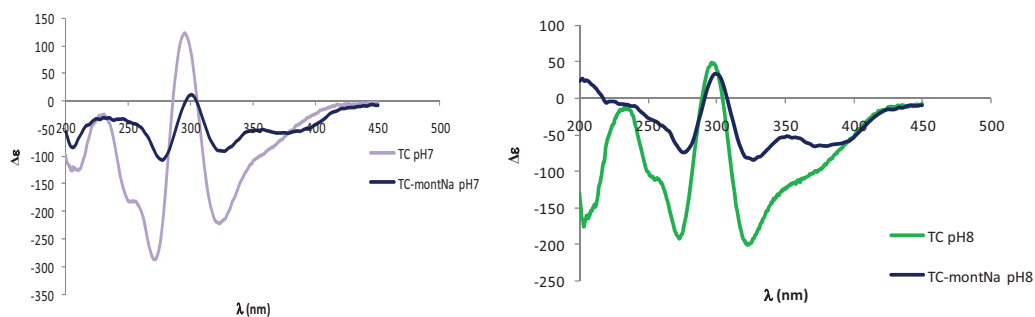


Fig. 3.12.- Espectros DC de una solución acuosa de TC (0,035 mM) y de la dispersión TC-montmorillonita sódica (7,72 mmol/100g) a dos pH diferentes.

Por otra parte, los espectros de DC de soluciones de TC con y sin Ca<sup>2+</sup> junto con el espectro de TC adsorbida a montmorillonita cálcica en iguales condiciones de pH se observan en la Fig. 3.13.



Si bien la presencia de montmorillonita sódica no cambia el perfil del espectro de TC, se observan cambios en los valores de elipticidad en la región UV, lo que indica interacción con el mineral.

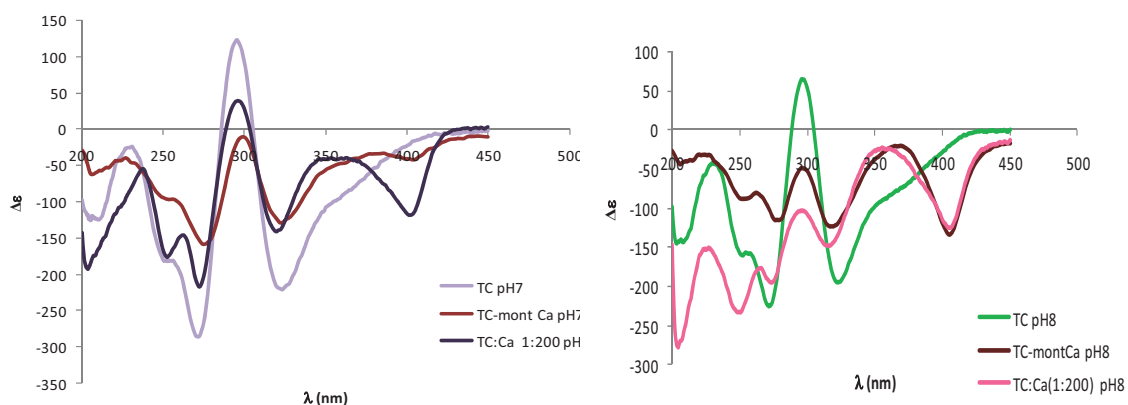


Fig.3.13.- Espectros DC de una solución acuosa de TC (0,035 mM) y de la dispersión TC-montmorillonita cálcica (7,72 mmol/100g) a dos pH diferentes.

Para los valores de pH analizados, la conformación extendida de TC está promovida por el mineral involucrando a los grupos funcionales del anillo A de la molécula de TC en la interacción debido a que es éste anillo el directamente involucrado en el cambio conformacional. En el anillo A se encuentra el grupo trialquilamino protonado que en la conformación plegada se encontraba interaccionando intramolecularmente con el oxígeno deprotonado del C3; es de esperar que la interacción electrostática con la superficie negativa del mineral compita con la interacción intramolecular y favorezca la conformación extendida. La estructura reticular de la hoja tetraédrica de la montmorillonita sería uno de los principales factores que determinan la orientación regular y uniforme de las moléculas adsorbidas (Yamagishi, 1993).

Para la montmorillonita cálcica, también está favorecida la conformación extendida sobre la superficie del mineral. La presencia de un segundo efecto Cotton en la región visible para las dispersiones TC-montmorillonita cálcica a pH 8, sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  actuaría como sitio activo interaccionando con TC para formar el complejo montmorillonita- $\text{Ca}^{2+}$ -TC

debido a que se observó un efecto Cotton similar en la región visible para soluciones de TC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.28).

Difracción de Rayos X del sistema de adsorción:

El diagrama correspondiente a la mezcla mecánica del mineral arcilloso con cristales de tetraciclina se presenta en la Fig. 3.14. Todas las reflexiones diagnósticas de TC se observan en la mezcla. La ausencia de cambios en las posiciones de las reflexiones es de esperar ya que la mezcla está formada por dos fases sólidas separadas, sin contacto íntimo significativo entre ellas.

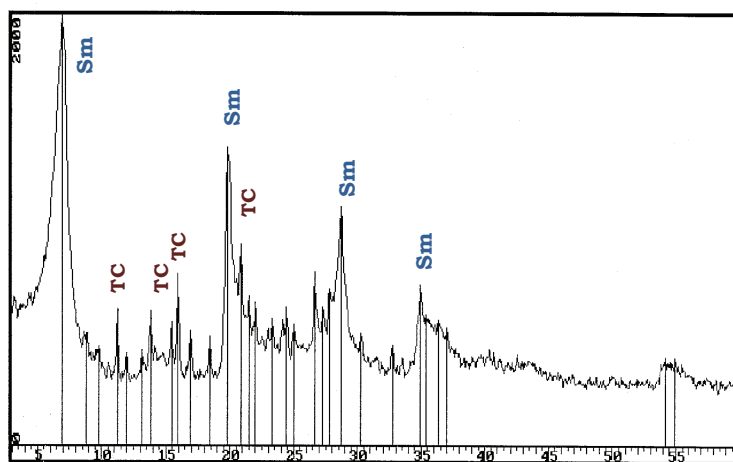


Fig.3.14.- Diagrama DRX de una muestra sólida del mineral arcilloso (Sm) mezclado con TC.

Los diagramas de DRX de los sistemas de adsorción TC-montmorillonita natural sódica preparados a pH 3 se muestran en la Fig. 3.15 y se los compara con el diagrama de la montmorillonita.

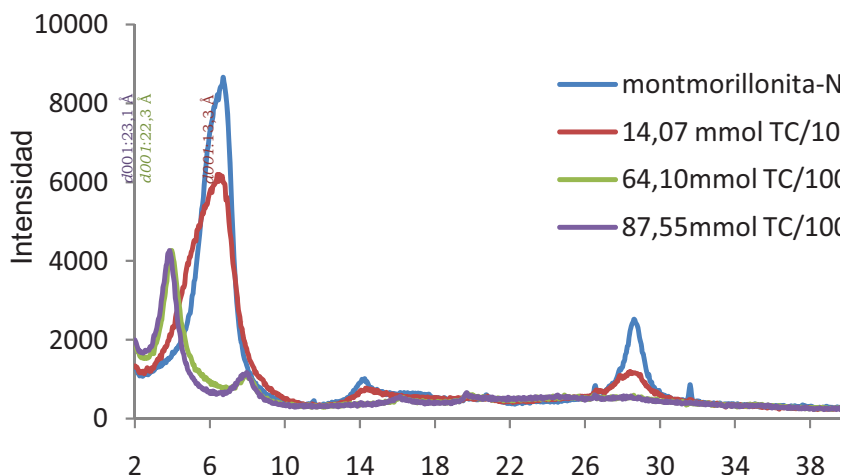


Fig. 3.15.- Diagrama DRX de complejos de adsorción TC-montmorillonita sódica a pH 3.

En estos casos no se observa ninguna reflexión característica de TC indicando que esta sustancia no se encuentra formando una fase sólida pura. La TC debe estar, por lo tanto, adsorbida al mineral. Esto es evidente por los cambios en las posiciones de la reflexión 001 de la montmorillonita en presencia de TC, que corresponden a aumentos en el espacio intercapa.

La descomposición matemática de las reflexiones del sistema de adsorción donde TC se encuentra retenida en una cantidad correspondiente al 10% de la CIC (14,07 mmol/100g) se presenta en la Fig. 3.16. El ajuste entre la curva experimental y la resultante de la suma de curvas gaussianas es de  $R^2=0,97$ . El ensanchamiento del pico evidencia la presencia de regiones interlaminares del mineral con distinto grado de hidratación. La contribución de los picos a  $6,85^\circ$ ,  $6,21^\circ$  y  $4,98^\circ$   $2\theta$  se corresponden con la formación de una monocapa de agua ( $12,9 \text{ \AA}$ ), una bicapa ( $14,2 \text{ \AA}$ ) y una tricapa ( $17,7 \text{ \AA}$ ) respectivamente por lo que la presencia del adsorbato en la dispersión contribuye a la hidratación de la montmorillonita. La contribución con un 5% del área del pico experimental en  $3,73^\circ$   $2\theta$  correspondiente a un espaciado de  $23,7 \text{ \AA}$ , que resulta en un hombro en el pico hacia los bajos ángulos, evidencia la presencia de TC en algunos espacios intercapa.

Cuando la cantidad de TC en el complejo de adsorción corresponde al 61 y 84 % de la CIC del mineral, la reflexión primaria se corre a  $3,96^\circ$  y  $3,82^\circ$   $2\theta$  con espaciados basales de  $22,3 \text{ \AA}$  y  $23,1 \text{ \AA}$  respectivamente (Tabla 3.2), haciendo más evidente la intercalación de TC en el espacio intercapa.

Teniendo en cuenta las dimensiones de la molécula de TC y que el aumento en el espacio intercapa es de aproximadamente 10 Å para los complejos de adsorción, se sugiere que TC se localiza entre las capas de montmorillonita como monocapa donde también se podría encontrar cationes  $\text{Na}^+$  hidratados (Parolo et al., 2008).

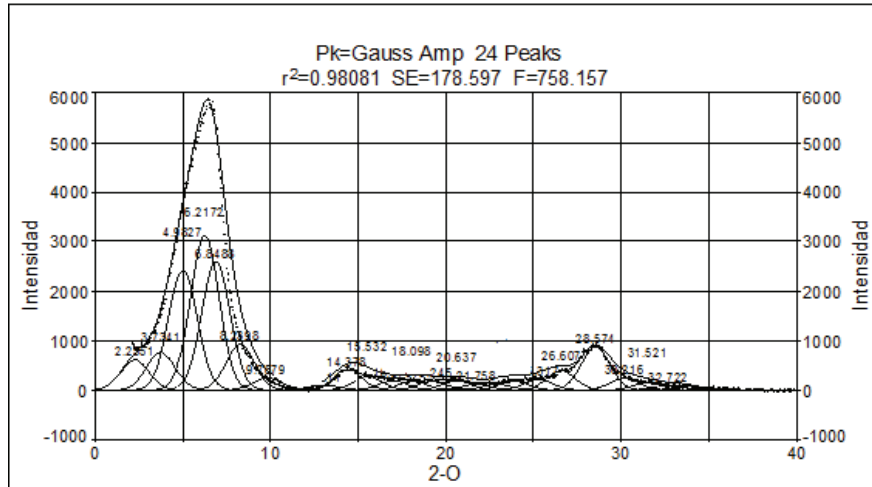


Fig. 3.16.- Descomposición matemática del diagrama DRX de sistema de adsorción TC-montmorillonita (14,07 mmol/100g) a pH 3.

Los diagramas de DRX de los sistemas de adsorción TC-montmorillonita natural sódica preparados a pH 7 se muestran en la Fig. 3.17 y se los compara con el diagrama de la montmorillonita. A este pH la concentración de TC adsorbida fue menor que a pH 3 (Tabla 3.2).

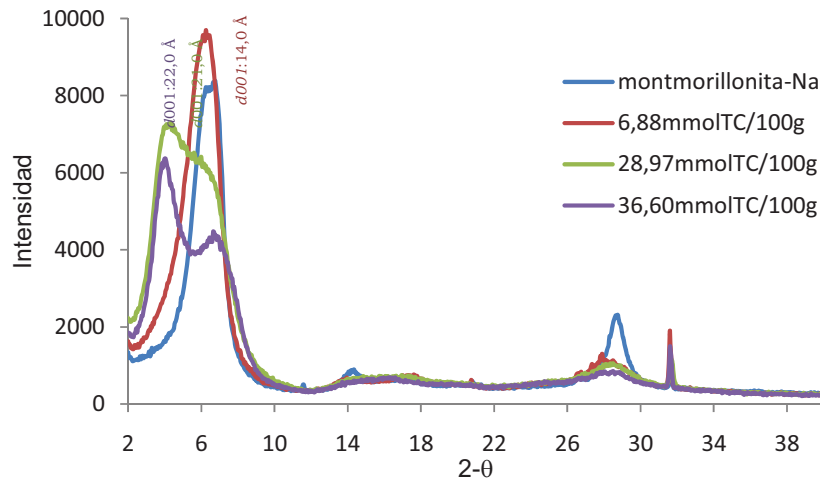


Fig. 3.17.- Diagrama DRX de complejos de adsorción TC-montmorillonita sódica a pH 7.

Los diagramas presentan cambios en la forma de la reflexión de primer orden: a bajas cantidades de TC adsorbida, la reflexión 001 corresponde a  $d=13,7 \text{ \AA}$ ; a medida que aumenta la cantidad de TC se observan picos ensanchados y asimétricos con dos máximos en los rangos de  $d=22,0-21,0 \text{ \AA}$  y  $14,7-13,2 \text{ \AA}$  que corresponden a intercapas con presencia de TC e intercapas con distintos estados de hidratación del mineral. El ensanchamiento de los picos pone de manifiesto defectos en el apilamiento de las capas de montmorillonita a lo largo del eje c. Similares resultados fueron encontrados para la intercalación de TC en montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 (Chang et al., 2009).

Debido a que tanto a pH 3 como 7 existen especies de TC con grupos cargados positivamente y con carga negativa en su estructura, la molécula se localiza seguramente de manera que la carga positiva esté próxima a la superficie del mineral y la carga negativa tan lejos como sea posible de la superficie. La distancia entre el anillo aromático D de la molécula de TC y el grupo metilo unido al nitrógeno que soporta la carga positiva en la conformación extendida de TC y en la disposición mostrada en la Fig. 3.18 es de  $10 \text{ \AA}$ . Para esta posible disposición de la molécula de TC en el espacio intercapa de una montmorillonita sódica, el área molecular expuesta a la superficie es de aproximadamente  $0,80 \text{ nm}^2$ . El área molecular fue calculada para la conformación extendida de TC, considerando que la molécula es un rectángulo de dimensiones  $13,10 \times 8,62 \text{ \AA}$  y forma un ángulo de  $45^\circ$  con la superficie del mineral. El área molecular en la disposición presentada es menor al área superficial disponible para un equivalente de adsorbato catiónico monovalente ( $0,97 \text{ nm}^2$ ) que fue calculada en el capítulo 1. Las moléculas de TC se ubicarían paralelas entre ellas pero lo suficientemente separadas como para evitar la formación de dímeros o agregados moleculares, según indican los espectros UV-vis de los complejos de adsorción. Los grupos amino protonados de moléculas contiguas se enfrentan a caras opuestas del mineral y de ésta manera los grupos polares C=O e -OH se encontrarían enfrentados e interaccionando con cationes inorgánicos y moléculas de agua presentes en la intercapa.

Estudios sobre orientación de moléculas orgánicas intercaladas en el espacio intercapa de micas y minerales relacionados fueron llevados a cabo

por otros autores (Bedzyk y Cheng, 2002; Fenter, 2002) donde se observó que los grupos alquilo y aromáticos no se orientan paralelos a la superficie basal debido a la elevada carga negativa estructural de los minerales analizados y a la coadsorción de cationes orgánicos y aniones inorgánicos (haluros de alquilamonio). Mediante estudios de difracción de rayos X para la adsorción de hexadeciltrimetilamonio intercalado en vermiculita se determinó un ángulo de  $50^\circ$  de la molécula con la superficie del mineral (Slade y Gates, 2004).

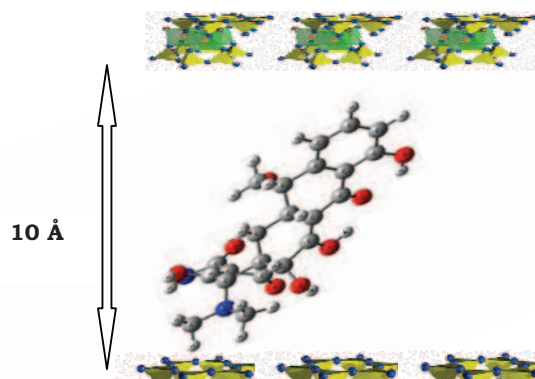


Fig.3.18.- Disposición de TC en su conformación extendida en el espacio intercapa de montmorillonita sódica.

Tabla 3.2.- Reflexiones y espaciados de complejos de adsorción tetraciclina-montmorillonita sódica.

pH sistema	mmoles TC ads/100 g montmorillonita	2- $\theta$	d 001 (Å)
3	14,07	6,64	13,3
3	64,10	3,96	22,3
3	87,55	3,82	23,1
7	6,88	6,33	14,0
7	28,97	6,00	14,7
7	28,97	4,20	21,0
7	36,6	6,71	13,2
7	36,6	4,02	22,0

En la Fig. 3.19 se presentan los diagramas correspondientes a los complejos de adsorción MC-montmorillonita natural a valores de pH 3 y 7,

junto con el diagrama correspondiente a una montmorillonita preparada a partir de una dispersión (15mg/mL) en NaCl 0,01M.

A pH 3 se observa una reflexión (001) en  $4,88^\circ 2\theta$  ( $d=18,1 \text{ \AA}$ ) y (002) en  $9,94^\circ 2\theta$  ( $d=8,9 \text{ \AA}$ ); mientras que a pH 7 se observa la reflexión (001) en  $4,06^\circ 2\theta$  ( $d=21,8 \text{ \AA}$ ) y (002) en  $7,68^\circ 2\theta$  ( $d=11,5 \text{ \AA}$ ).

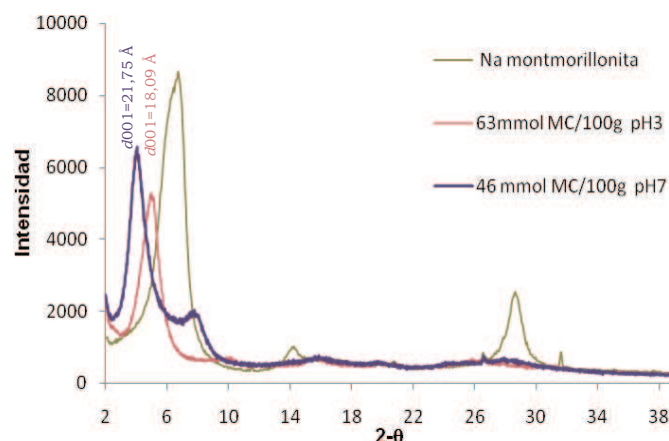


Fig. 3.19.- Diagrama DRX de complejos de adsorción MC-montmorillonita sódica a pH 3 y 7.

Los resultados obtenidos parecen indicar la intercalación de una monocapa de moléculas MC en el espacio interlamilar y diferentes orientaciones de la molécula según las condiciones de pH del medio. Para valores de pH 3 prevalecen las especies catiónicas de MC ( $MCH_4^{2+}$  y  $MCH_3^+$ ) y los grupos de carga positiva se orientan paralelos al plano basal del mineral, mientras que cuando la especie predominante es la zwitteriónica (pH 7) la molécula se orienta de manera tal de acercar los grupos de la carga positiva a la superficie y alejar los grupos cargados negativamente.

En la Fig. 3.20 se muestran los difractogramas de los complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica junto con el correspondiente a la montmorillonita cálcica. Las reflexiones y espaciados basales correspondientes se presentan en la Tabla 3.3. En ausencia de TC se observa una reflexión de primer orden en  $7,06^\circ 2\theta$  ( $d=12,5 \text{ \AA}$ ), característica de la montmorillonita sódica (Moore y Reynolds, 1997). El difractograma es similar para bajas cantidades de TC adsorbida (7,78mmol/100g, 7 % CIC). A mayores cantidades de TC en el complejo, sin embargo, los difractogramas muestran dos reflexiones bien diferenciadas, en el rango de 21,8-21,5  $\text{\AA}$  y 12,3-12,1  $\text{\AA}$ . El hecho que la montmorillonita inicialmente cálcica presente reflexiones

características de una montmorillonita sódica se debe a que las suspensiones fueron preparadas en NaCl y que el  $\text{Na}^+$  compite con el catión calcio intercambiable debido a que se encuentra en concentraciones muy superiores en la solución.

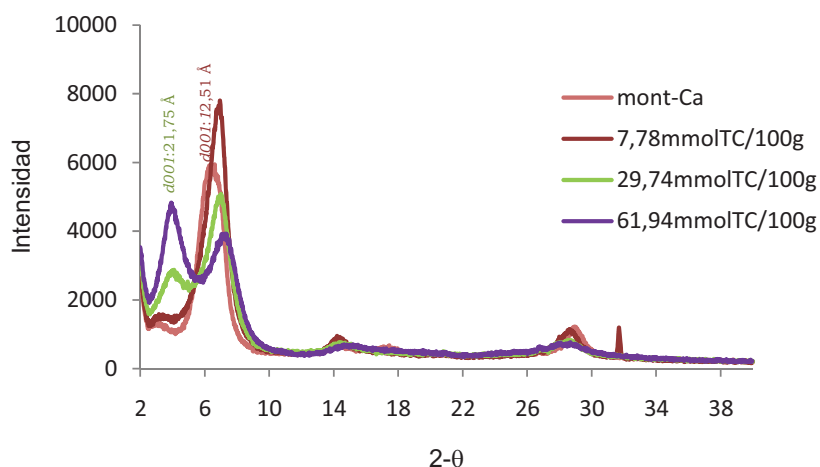


Fig.3.20.- Diagrama DRX de complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica a pH7.

La aparición de una segunda reflexión indica intercalación de TC, por lo que el difractograma muestra una reflexión que corresponde a intercalación de TC (interactuando con cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^+$ ) y otra reflexión debida a intercapas con distintos grados de hidratación.

Tabla 3.3.- Reflexiones y espaciados de complejos de adsorción tetraciclina-montmorillonita cálcica.

pH sistema	mmoles TC ads/100 g montmorillonita	2-θ (°)	d 001 (Å)
7	7,78	7,06	12,5
7	29,74	4,10	21,5
7	29,74	7,20	12,3
7	61,94	4,06	21,8
7	61,94	7,30	12,1

Tal como también lo sugieren la espectroscopía UV-vis y el dicroísmo circular, la formación de complejos con el catión divalente sería responsable de la mayor afinidad de TC por la montmorillonita cálcica. Por lo tanto, los cationes calcio no se encontrarían solos en el espacio intercapa sino que



---

estarían principalmente interactuando con la TC. Es por ello que no se observan las reflexiones características de una montmorillonita cálcica en  $6,00^\circ 2\theta$  ( $d=15,0 \text{ \AA}$ ) en estos sistemas.

Los diagramas correspondientes a los complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica (61,94 mmol/100g) preparados sin control de fuerza iónica y a pH 7 presentan una reflexión primaria a  $4,85^\circ 2\theta$  que corresponde a un espaciado de  $18,2 \text{ \AA}$ . Si se considera que el espesor de una capa 2:1 de montmorillonita es aproximadamente igual a  $9,6 \text{ \AA}$ , la intercalación de TC representa un aumento en el espaciado basal de  $8,6 \text{ \AA}$ , por lo cual la molécula tendría una disposición más paralela al plano basal del mineral que aquellos sistemas que fueron preparados con control de fuerza iónica. La TC compete con las moléculas de la capa de hidratación de  $\text{Ca}^{2+}$  e interacciona con el mineral a través del catión.

En los diagramas de rayos X experimentales correspondiente a los complejos de adsorción se observaron nuevas reflexiones en los bajos ángulos y un ensanchamiento de las mismas. Con el fin de analizar los cambios que se produjeron en la estructura del mineral, componente de los complejos montmorillonita-TC, se modelaron los diagramas utilizando el programa Newmod<sup>®</sup>. Este programa permite obtener diagramas de DRX de sistemas construidos seleccionando minerales, grado de hidratación y composición y comparar dichos diagramas con los obtenidos experimentalmente.

Los diagramas de rayos X se representaron entre  $2$  y  $40^\circ 2\theta$  (step 0,05), se consideró, además, que el mineral presenta 1,7% Fe y una capacidad de intercambio de 104 meq/100g. Bajo estas condiciones se modelaron los difractogramas de rayos X de las muestras preparadas a partir de dispersiones de montmorillonita en solución de NaCl 0,01 M y los complejos de adsorción TC-montmorillonita con distintos cationes de intercambio, concentración de TC adsorbida y bajo diferentes condiciones de pH. Los diagramas para los complejos de adsorción que mejor ajustan a los experimentales corresponden a interestratificados (IE) en diferentes proporciones de los componentes esmectita monohidratada ( $12,4 \text{ \AA}$ ) y esmectita con intercalación de TC ( $22 \text{ \AA}$ ).

Los IE se definen como filosilicatos en los cuales dos tipos de capas se encuentran intermezcladas en una secuencia de apilamiento vertical dentro de un cristal o dominio de difracción. Las capas pueden estar distribuidas en esa estructura en forma ordenada o al azar, en nuestro caso se propone la última

---

opción, respondiendo a lo que se denomina tipo de ordenamiento (R0), donde R=0 para dos componentes A y B, corresponde a un ordenamiento ABAABABBBAA (Reynolds, 1980).

El modelo propuesto permitió explicar la presencia de picos de difracción anchos, no integrales, asimétricos hacia los bajos ángulos y la permanencia de la reflexión a 12,5 Å aunque varíe la cantidad de esmectita en la mezcla, comportamiento que acuerda con el de un IE (capas expansivas/capas fijas), según Moore y Reynolds (1997).

En la Tabla 3.4 se presentan, a manera de ejemplo, los valores de los espaciados basales calculados para los sistemas de mayor cantidad de TC adsorbida.

Tabla 3.4- Espaciados basales calculados utilizando el programa Newmod.

Muestras	d(001)Å Experimental	d(001) Å – d(002)Å calculado Newmod
dispersión de montmorillonita cálcica (15 mg/mL)	14,1	14,4
TC-montmorillonita cálcica, pH7 (62 mmol/100 g)	22,5-12,5	22,3-12,1
TC-montmorillonita sódica, pH3 (88 mmol/100 g)	23,1-11,1	22,7-11,4

En la Fig. 3.21 se presentan los diagramas obtenidos a partir de la dispersión de montmorillonita cálcica en solución de NaCl 0,01 M (15 mg/mL) y el calculado utilizando el programa Newmod®. El mejor ajuste obtenido responde a un modelado de mineral puro (diesmectita cálcica con dos moléculas de agua en el espacio intercapa).

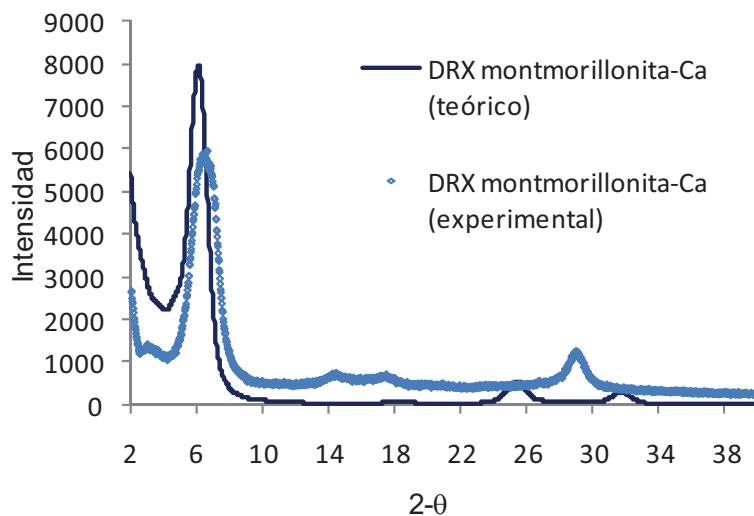


Fig. 3.21.- Diagrama de DRX correspondiente a la dispersión de la montmorillonita cálcica y el calculado utilizando el programa Newmod®.

En el diagrama DRX experimental correspondiente al sistema de adsorción TC-montmorillonita cálcica (62 mmol/100g) se observa que la reflexión más intensa corresponde a  $d_{001}=22,0 \text{ \AA}$  (Fig. 3.22) que fue modelado bajo la forma de interestratificado de diesmectita con intercalación de TC y diesmectita monohidratada en una relación 53:47.

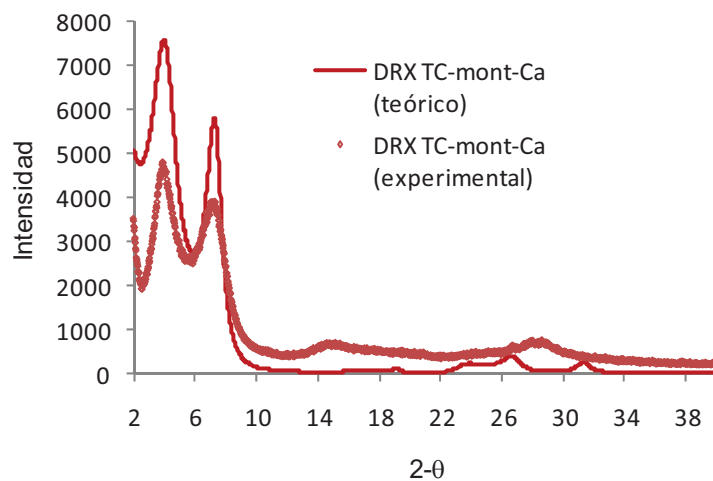


Fig. 3.22.-Diagrama de DRX correspondiente a la dispersión del complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica (62 mmolTC adsorbido/100g) y el calculado utilizando el programa Newmod®.

Para los sistemas TC-montmorillonita sódica (Fig. 3.23), los diagramas de DRX modelados concuerdan con un patrón de interstratificado diesmectita con intercalación de TC y diesmectita monohidratada (60:40).

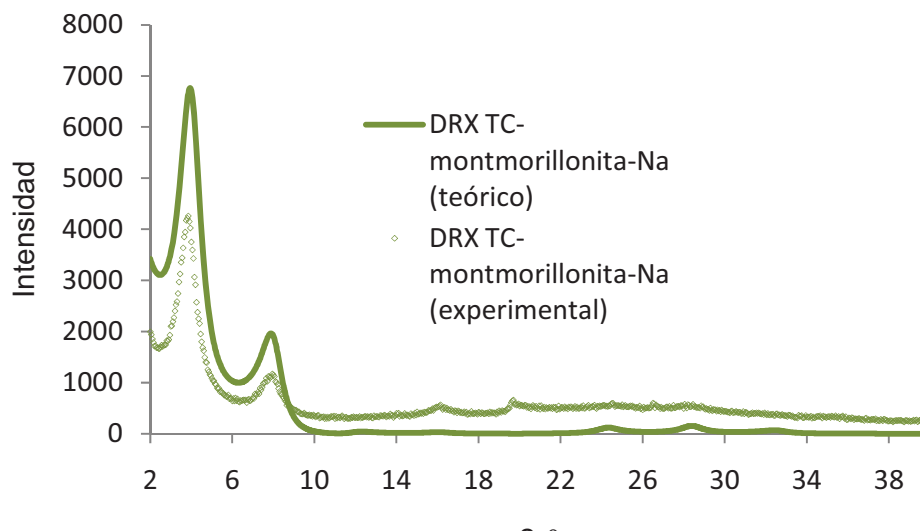


Fig. 3.23.-Diagrama de DRX correspondiente a la dispersión del complejo de adsorción TC-montmorillonita sódica (88 mmolTC adsorbido/100g) y el calculado utilizando el programa Newmod®.

El ensanchamiento de los picos está determinado por la imperfección del cristal y/o por la presencia de subgranos muy pequeños, los que son considerados el dominio de difracción. Este dominio está determinado por el número de celdas elementales, entre 2 y 15; cuanto más bajo sea éste número más ancho será el pico a media altura (Moore y Reynolds, 1997). El ensanchamiento de los picos observado en algunos de los diagramas modelados se obtuvo modificando el tamaño de celda elemental (en el modo estándar el parámetro N es Low (L)= 1 y High (H)= 14). Por ejemplo, para el diagrama de montmorillonita cálcica el tamaño de la celda fue L1-H6, con lo cual al disminuir el tamaño de la partícula, se produce un ensanchamiento del pico y una ligera asimetría del mismo.

### 3.4.1 Evaluación del pH de la dispersión de montmorillonita en presencia de tetraciclina.

El pH del sistema aumenta gradualmente con el agregado de TC a una dispersión de montmorillonita desde un valor de pH 5 a 5,4, como se observa en la Fig 3.24. Cuando se agrega al sistema 123,47 mmoles TC/100 g de

mineral se alcanza el máximo valor de pH del sistema. Posteriores agregados de TC no modifican el pH de la dispersión. Este aumento en el pH indica que la adsorción de TC ocurre conjuntamente con una coadsorción de protones.

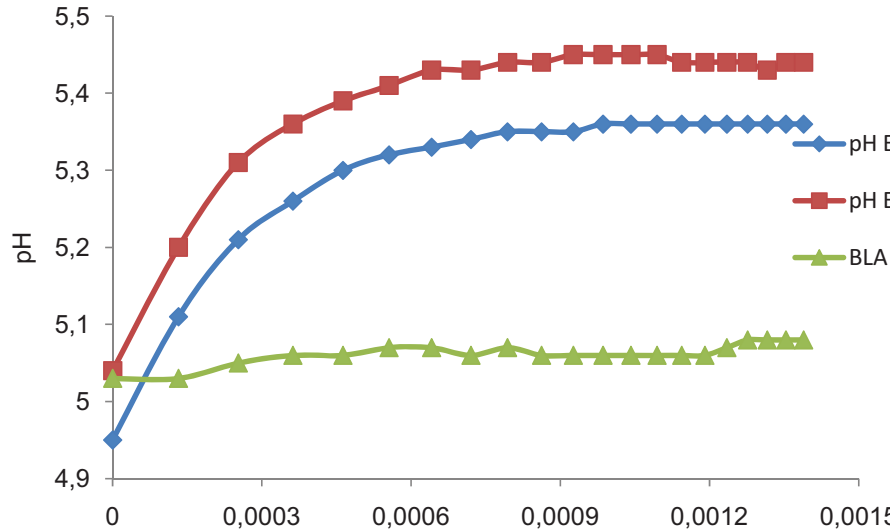


Fig. 3.24.- Efecto del agregado de TC en el pH de una dispersión de montmorillonita ( $0,90 \text{ g L}^{-1}$ )

Los aumentos en el pH registrados con el agregado de TC a una dispersión de montmorillonita, conjuntamente con el uso de una isoterma de adsorción de TC a pH 5, permiten calcular la cantidad de protones que se coadsorben por mol de TC adsorbida. Los datos así calculados se muestran en la Fig. 3.25.

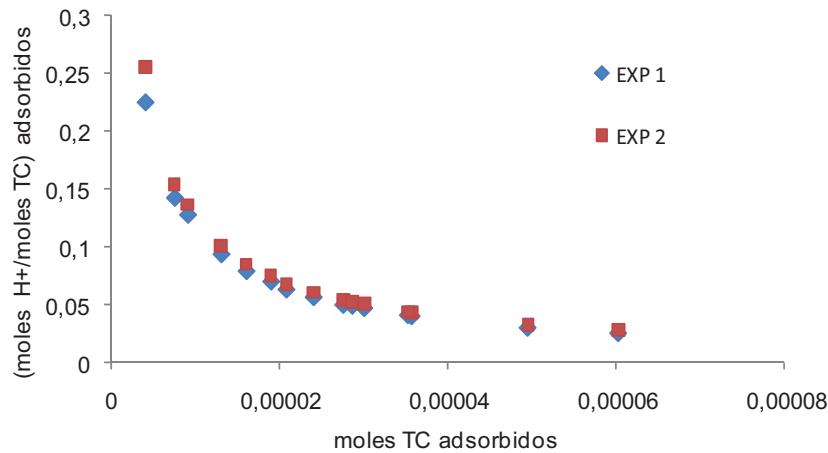
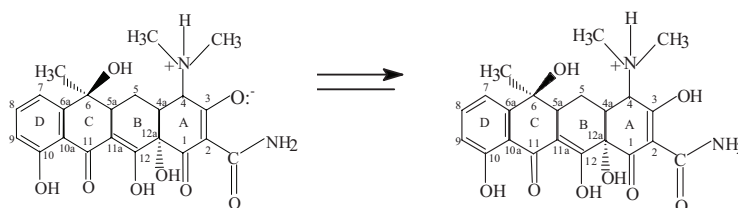


Fig. 3.25.- Coadsorción de TC y  $\text{H}^+$  a la superficie del mineral

Los resultados obtenidos demuestran que la TC toma protones del medio o de la capa de hidratación de cationes de intercambio del mineral al acercarse a la superficie. Las características ácidas de la capa de hidratación se ponen de manifiesto cuando la molécula accede a sitios reactivos del mineral. Bajo las condiciones en que se llevó a cabo la experiencia, la protonación de TC implica un desplazamiento del equilibrio de la forma zwitteriónica a la totalmente protonada de TC.



La coadsorción de protones disminuye a medida que aumenta la concentración de TC adsorbida (Fig.3.26).

### 3.4.2 Análisis de $\text{Ca}^{2+}$ en equilibrio en sistemas de adsorción tetraciclina-montmorillonita cálcica por absorción atómica

La Fig. 3.26 muestra la concentración de cationes calcio en equilibrio con el complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica y en equilibrio con la montmorillonita cálcica, estando ausente en este último caso la TC.

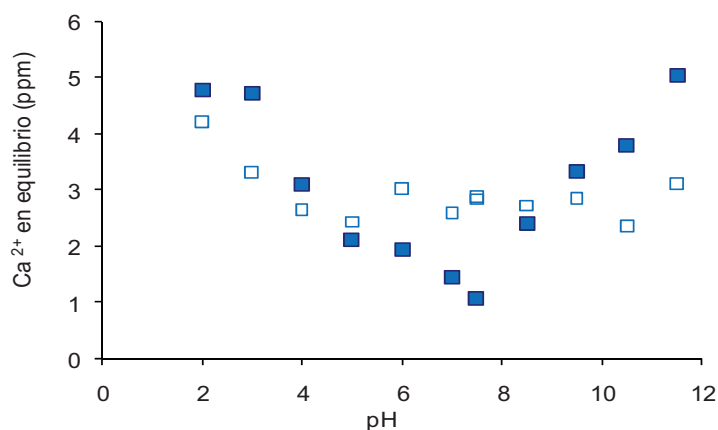
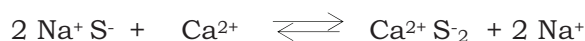


Fig. 3.26.- Efecto del pH en la concentración del catión  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con el sistema de adsorción TC-montmorillonita-Ca (■) y con la dispersión de montmorillonita-Ca (□).

En ausencia de TC, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con el mineral arcilloso disminuye en el intervalo de pH 2-4 y luego permanece aproximadamente constante hasta pH 11,5. En presencia de TC el comportamiento es diferente: la concentración disminuye de pH 2 a pH aproximadamente 8, donde se encuentra un mínimo, y luego aumenta hasta pH 11,5.

La teoría de la doble capa eléctrica predice que la afinidad de un intercambiador iónico sólido, como la superficie de las montmorillonitas, por cationes divalentes es mayor que para iones monovalentes y que la selectividad por iones de mayor valencia disminuye cuando incrementa la fuerza iónica de la solución (Stumm, 1992). La afinidad relativa puede ser definida cuantitativamente aplicando la ley de masa a la reacción de intercambio, por ejemplo para una montmorillonita sódica ( $\text{Na}^+\text{S}^-$ ) en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en solución:



A bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , la superficie del mineral muestra una fuerte preferencia por los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la selectividad disminuye a medida que aumenta la concentración de  $\text{Na}^+$  en solución. Si el pH de la dispersión es bajo, los protones también pueden competir con los cationes sodio y calcio por los sitios de intercambio.

Para el análisis de la Fig. 3.26 es necesario considerar que ambos sistemas fueron preparados con control de fuerza iónica utilizando solución de  $\text{NaCl}$  0,01M que aporta 0,8 mmoles de  $\text{Na}^+$  al sistema. Por otra parte, teniendo en cuenta la capacidad de intercambio del mineral y que los sistemas de adsorción fueron preparados a partir de 18 mg de montmorillonita cálcica es posible calcular que 0,009 mmoles de cationes de intercambio  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran también en el sistema. En el intervalo de bajos valores de pH la presencia de  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$  en solución representan una competencia para el catión  $\text{Ca}^{2+}$  que, si bien es catión divalente, está a una concentración 100 veces inferior que el de  $\text{Na}^+$  aproximadamente. Es por ello que en todos los casos se encuentra  $\text{Ca}^{2+}$  en el sobrenadante. En ausencia de TC, la constancia en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH superiores a 4 indica que el único catión que

compite con el calcio es el sodio. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH bajos muestra que en estas condiciones los protones también pueden intervenir en la competencia.

En presencia de TC y a medida que aumenta el pH prevalecen las especies  $\text{TCH}_2^-$  y  $\text{TCH}^-$  que si bien no son especies catiónicas interactúan con la superficie del mineral probablemente por su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  entre los dos sistemas promovidas por la presencia de tetraciclina, se observa más claramente si se grafica la diferencia entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con el complejo de adsorción y con la montmorillonita (Fig. 3.27). Entre pH 5 y pH 8,5 la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TC es inferior a la concentración en ausencia de TC.

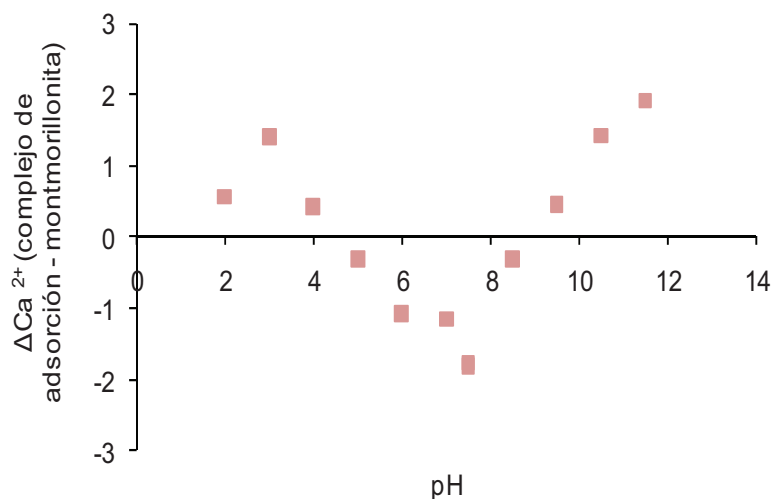


Fig. 3. 27.- Diferencia entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en sistemas de adsorción TC-montmorillonita-Ca y la correspondiente a la dispersión del mineral.

Tal como lo sugieren los estudios espectroscópicos realizados, la formación de complejos con el  $\text{Ca}^{2+}$  sería responsable de la mayor afinidad de TC por la montmorillonita cálcica por lo que estos cationes divalentes estarían principalmente interactuando con la TC en el espacio intercapa del mineral.

A partir de los valores de concentración de cationes  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie del mineral y de los resultados de adsorción de TC a montmorillonita cálcica a pH 7, se puede determinar que la relación de concentración Ca/TC es aproximadamente 1 en el espacio intercapa del mineral. La formación de complejos 1:1 (Ca:TC) modifica la carga de las especies  $\text{TCH}_2^+$  y  $\text{TCH}^-$  y



aumentaría la afinidad de TC por la montmorillonita en el intervalo de pH 5-8,5. A medida que las especies de TC en equilibrio con el complejo de adsorción sufren deprotonación del grupo trialquilamino, que le otorga carga positiva a TC hasta elevados valores de pH ( $pK_a=9,5$ ), la afinidad por el mineral disminuye y las especies de TC en solución con carga neta  $-2$  favorecen el desplazamiento del equilibrio de intercambio catiónico  $Na^+$  por  $Ca^{2+}$ , aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  en solución. Los resultados obtenidos parecen indicar que los complejos Ca-TC se forman en el espacio intercapa cuando la TC se aproxima a la superficie del mineral.

### 3.4.3 Microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

La Fig. 3.28 muestra la microfotografía SEM de TC adsorbida a montmorillonita cálcica en una relación inicial de concentraciones superior a la capacidad de intercambio del mineral.

La diferencia de tamaño y formas de las partículas de la esmectita (Sm) y su adsorbato (TC) conducen a la morfología de deposición que se presenta en la Fig. 3.28. Se observa una superficie continua de textura lisa, correspondiente a un exceso de TC en la superficie, con craquelados que permiten identificar el argilomineral por debajo de la misma (Fig.3.29 A). El análisis EDX sobre esta superficie mostró que el elemento mayoritario es Si y luego en menor abundancia el Al, Fe, Ca, corroborando la presencia de montmorillonita en el complejo de adsorción.

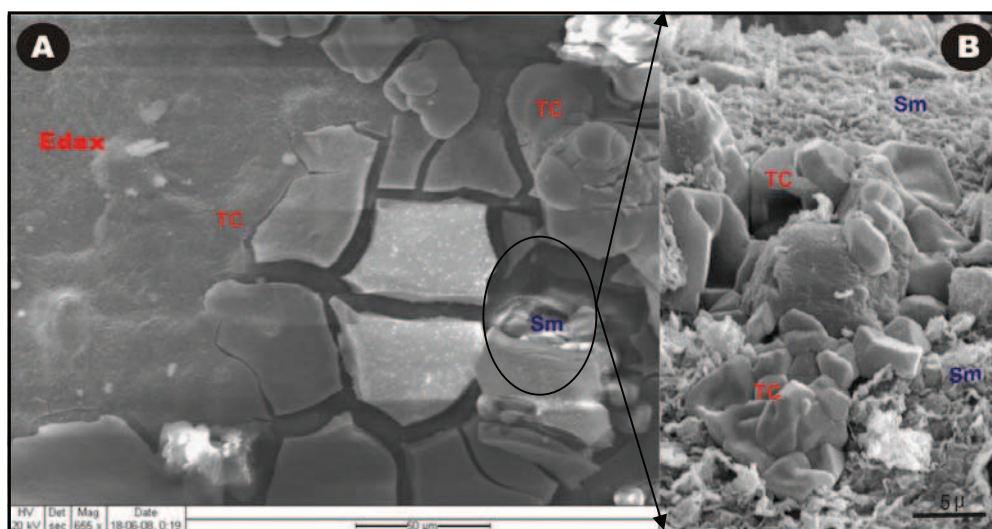


Fig. 3.28- Microfotografía SEM de TC adsorbida a montmorillonita- $Ca^{2+}$

En un corte transversal de la muestra se observa en la parte inferior la esmectita distribuída homogéneamente con partículas con una morfología de hábitos laminares y bordes crenulados, con contactos borde-cara y cara-cara y la TC ocupando algunos espacios distribuídos irregularmente con formas globulares (Fig. 3.29 B). En la parte superior del preparado se depositan los cristales de TC, orientados paralelos según la mayor superficie de los mismos.

La Fig. 3.29 muestra la microfotografía TEM correspondiente a la montmorillonita homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$  y la correspondiente a TC adsorbida a montmorillonita cálcica.

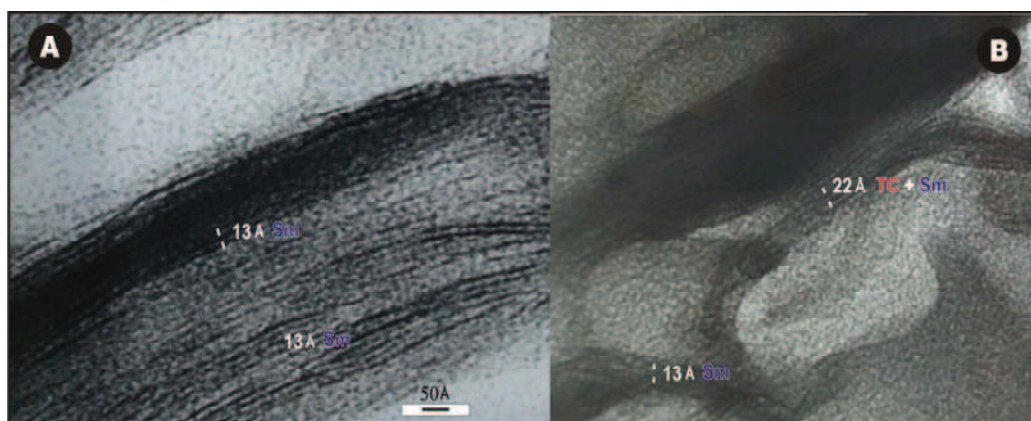


Fig. 3.29- Microfotografía TEM, **A**: montmorillonita homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$ , **B**: TC adsorbida a montmorillonita-Ca (60 mmoles TC /100g).

En la muestra correspondiente a la montmorillonita cálcica se midieron espaciados  $d=13,0 \text{ \AA}$  (software NIKON-NIS-Elements Basic Research, versión 3.0). Para el complejo de adsorción TC-montmorillonita se observaron dos espaciados interlaminaares diferentes,  $d=13,0 \text{ \AA}$  y  $d= 22,0 \text{ \AA}$ . Esta metodología de análisis permitió aportar información que apoya el diagnóstico realizado por DRX donde se observaban difracciones que corresponden a intercapas con presencia de TC interaccionando con el mineral a través del catión  $\text{Ca}^{2+}$  e intercapas con distintos estados de hidratación del mineral.

Los resultados obtenidos de las observaciones correspondientes a microscopia electrónica demuestran que la adsorción de TC ocurre con intercalación entre las capas de montmorillonita.

### 3.5 Conclusiones

Mediante diversas técnicas como la espectroscopia óptica, difracción de rayos X y microscopía electrónica se obtuvo información acerca de las interacciones químicas entre tetraciclina y montmorillonita.

La interacción TC-montmorillonita es claramente evidenciada por los cambios observados en los espectros UV-vis de los sistemas de adsorción. La formación puente H con los grupos superficiales de la montmorillonita a través de los grupos -OH del cromóforo BCD de la molécula como también el cambio de conformación inducido sobre la superficie del mineral, serían responsables del efecto batocrómico observado en la banda de mayor longitud de onda. El catión de intercambio  $\text{Ca}^{2+}$  es un posible sitio de interacción de la montmorillonita induciendo la deprotonación del grupo -OH12 (sistema de anillos BCD) y produciendo un efecto batocrómico adicional en el espectro de absorción y un efecto Cotton adicional en la región visible a valores de pH donde el grupo -OH12 se encuentra mayormente deprotonado.

Las modificaciones observadas a diferentes valores de pH en el espectro de absorción IR de los complejos de adsorción para las bandas correspondientes a los grupos  $\text{NHR}_3^+$ , el grupo amida y grupos carbonilo de los anillos A y C de la molécula de TC son una evidencia de que estos grupos polares están involucrados en la interacción con el mineral.

Los cambios observados en la intensidad del efecto Cotton negativo en la región UV ponen de manifiesto que la conformación extendida de TC está promovida por el mineral, involucrando a los grupos funcionales del anillo A de la molécula de TC en la interacción. La interacción electrostática entre el grupo amino protonado (N4) de TC con la superficie negativa del mineral compite con la interacción intramolecular (N4-O3) y favorece la conformación extendida. Además, la interacción intermolecular entre estos grupos se encuentra desfavorecida debido a que el O3 toma protones del medio o de la capa de hidratación de cationes de intercambio del mineral al acercarse a la superficie, tal como lo demuestra los resultados obtenidos en la experiencia de coadsorción de protones.

---

---

Los resultados obtenidos por difracción de rayos X y las observaciones correspondientes a microscopía electrónica demuestran que la adsorción de TC ocurre con intercalación entre las capas de montmorillonita.

La intercalación de TC en la intercapa produce un aumento en el espaciado basal que corresponde a una monocapa de moléculas. Las especies de TC seguramente orientan su grupo funcional con carga positiva próximo a la superficie del mineral y alejan la carga negativa. Para esta posible disposición de la molécula de TC, el área expuesta a la superficie es de 0,80 nm<sup>2</sup>, inferior al área disponible para un equivalente de adsorbato catiónico monovalente (0,97 nm<sup>2</sup>). La ausencia de reflexiones correspondientes a montmorillonita cálcica en los complejos de adsorción a pH 7 indica que, en estas condiciones experimentales, los cationes calcio se encuentran interaccionando con TC y no compitiendo por un sitio en el mineral.

---

## **4 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ADSORTIVAS DE SISTEMAS MONTMORILLONITA-AGUA.**

### **4.1 Optimización de los parámetros de adsorción**

La transferencia de sustancias de la fase móvil (líquida o gaseosa) a la fase sólida gobierna la movilidad de sustancias en medios acuosos. El estudio de la retención de una sustancia en un sólido a distintas concentraciones constituye una de las principales herramientas para describir y predecir la distribución de sustancias en el medio ambiente (Limousin et al., 2007). Por otro lado, las reacciones de solutos con la superficie de minerales controlan las características geoquímicas de sistemas naturales. En particular, los procesos de adsorción afectan la reactividad y la carga superficial de las partículas de sólidos suspendidos y determinan su agregación y transporte (Stumm, 1992).

Tal como se indicó en el capítulo anterior, los métodos espectroscópicos y microscópicos son muy importantes para determinar interacción entre iones o moléculas y la superficie de minerales. Sin embargo, los métodos que cuantifican la adsorción permiten conocer la magnitud de la adsorción en diferentes condiciones experimentales. Con la aplicación de métodos cuantitativos se pueden obtener isothermas de adsorción y/o desorción, medidas de adsorción en función de otras variables como pH, fuerza iónica, temperatura, etc. Los procesos de adsorción/desorción presentan generalmente un importante control cinético, por lo que la dependencia del tiempo debe ser especificada.

Debido a las características macroscópicas y empíricas de las isothermas de adsorción no es posible obtener información respecto de los mecanismos de adsorción involucrados. Para explicar y predecir la capacidad adsorptiva del material en muy variadas condiciones experimentales es importante completar el estudio con la elección de modelos que describan la adsorción.

La selección de las mejores condiciones experimentales para la adsorción de una sustancia deben incluir el análisis de las propiedades superficiales del mineral expuesto a la solución como el área, la densidad de carga y las propiedades ácido-base como así también la composición de la solución soporte (*background*), especialmente cuando los procesos de

---

adsorción/desorción son controlados por mecanismos competitivos tales como intercambio iónico (Limousin et al., 2007).

A fin de evaluar la afinidad que las tetraciclinas presentan por la superficie del mineral arcilloso bajo diferentes condiciones experimentales, se llevaron a cabo experiencias donde se analizaron el efecto del pH, fuerza iónica y catión de intercambio en el proceso de adsorción.

## 4.2 Isotermas de adsorción

El proceso de adsorción es frecuentemente descripto mediante isotermas. La representación de la cantidad de especies sorbidas en función de su concentración en solución bajo condiciones de equilibrio y a temperatura constante se denomina isoterma de sorción. Donde el término sorción se usa de manera general, sin tener en cuenta el tipo de retención, para referirse ya sea a un proceso de adsorción o a uno de absorción (Spósito, 1984). Los procesos que se consideran de aquí en adelante, como la interacción entre moléculas de antibióticos y la superficie de montmorillonita, son considerados procesos de adsorción, por lo que en general se usará este último término. En una isoterma típica se observa que la cantidad adsorbida aumenta a medida que aumenta la concentración de adsorbato en el sobrenadante, hasta que la cantidad adsorbida llega a un valor de saturación (plateau), donde se han ocupado todos los sitios disponibles del adsorbente. Una isoterma típica de adsorción se muestra en la Fig. 4.1.

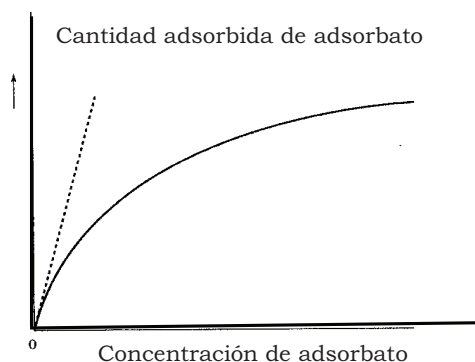


Fig. 4.1.- Representación general de una isoterma de adsorción. La pendiente de la línea punteada corresponde al coeficiente de distribución  $K_d$  (Langmuir, 1997).

Giles et al. (1974) propusieron un modelo general de clasificación de isotermas de adsorción, de las cuales cuatro isotermas son las observadas con más frecuencia:

- La isoterma “C” es lineal, la relación entre la cantidad de sustancia que permanece en solución y adsorbida ( $K_d$ ) es la misma para toda concentración.
- La isoterma “L” donde se observa una progresiva saturación del adsorbente debido a que disminuye la relación entre la concentración de la sustancia en solución y adsorbida.
- La isoterma “H” es un caso particular de la isoterma “L”, se observa una pendiente inicial muy elevada debida a una elevada afinidad de la sustancia por el adsorbente.
- La isoterma “S” es una curva sigmoideal que presenta un punto de inflexión. Esta isoterma se observa cuando tienen lugar mecanismos de adsorción muy diferentes.

Las isotermas cóncavas “L” o “H” son las encontradas con mayor frecuencia y es común utilizar para estos casos algunos modelos simples para sistemas que han alcanzado el equilibrio como el de Freundlich y el de Langmuir.

Las ecuaciones de las isotermas de Langmuir y Freundlich han sido ampliamente aplicadas en estudios de adsorción con soluciones diluidas. El ajuste de los datos experimentales a las isotermas de adsorción, en la gran mayoría de los casos, no representa evidencias respecto de cuál es el mecanismo responsable de la separación del soluto de la solución, pero permite una buena cuantificación con una ecuación simple del proceso de adsorción.

Isoterma de Langmuir: Para los supuestos más simples del proceso de adsorción los sitios del adsorbente (S) son ocupados por el adsorbato (A) bajo una estequiometria 1:1 generando especies superficiales SA (Ec.4.1).





La ecuación de Langmuir deriva de la aplicación de la ley de acción de masa correspondiente:

$$\frac{[SA]}{[S][A]} = K_{\text{ads}} = e^{(-\Delta G^{\circ} \text{ ads})/RT} \quad (\text{Ec.4.2})$$

se asume que el coeficiente de actividad superficial es igual a la unidad, S y SA pueden ser expresados en molL<sup>-1</sup> o molm<sup>-2</sup>.

La cantidad máxima de sitios superficiales (S<sub>T</sub>) del mineral se calcula como:

$$S_T = [S] + [SA]$$

entonces:

$$[SA] = S_T \frac{K_{\text{ads}}[A]}{1 + K_{\text{ads}}[A]} \quad (\text{Ec.4.3})$$

si se define la densidad superficial de adsorbato (Γ) como:

$$\Gamma = [SA] / \text{masa de adsorbente}$$

la Ec.4.3 puede representarse de la siguiente manera:

$$\Gamma = \Gamma_{\text{max}} \frac{K_{\text{ads}}[A]}{1 + K_{\text{ads}}[A]} \quad (\text{Ec.4.4})$$

frecuentemente la ecuación de Langmuir se representa:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = K_{\text{ads}}[A] \quad (\text{Ec.4.5})$$

donde  $\theta = [SA] / S_T$ , llamado grado de cubrimiento o grado de saturación superficial.

Las condiciones bajo las cuales es válida la aplicación de la ecuación de Lagmuir son las siguientes:

- ✓ El equilibrio térmico se alcanza con la formación de una monocapa de adsorbato ( $\theta=1$ ). La existencia de una adsorción máxima indica la presencia de sitios de adsorción finitos.



- ✓ La energía de adsorción es independiente de  $\theta$  debido a que todos los sitios del adsorbente presentan la misma actividad.
- ✓ Los solutos no interaccionan entre sí sobre la superficie del adsorbato.

La constante del equilibrio de adsorción y la máxima concentración adsorbida se pueden determinar a partir de los datos experimentales (Fig. 4.1) aplicando la Ec.4.4.

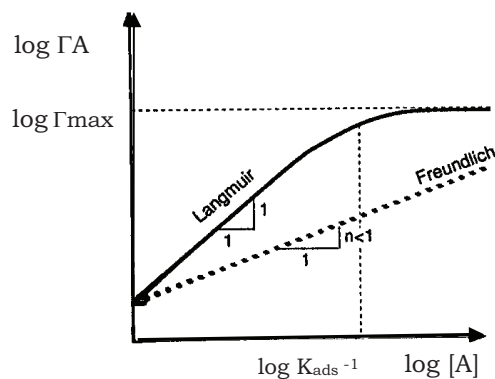


Fig. 4.2.- Isotermas de adsorción de Freundlich y Lagmuir (Stumm, 1992).

La competencia de adsorbatos por un mismo sitio del adsorbente ha sido explicada con el modelo de Langmuir mediante ecuaciones individuales para cada especie adsorbida (Allison et al., 1991).

Isoterma de Freundlich: La ecuación de Freundlich (Ec.4.6) fue una de las primeras ecuaciones propuestas en química superficial y se aplica fundamentalmente para sólidos con propiedades superficiales heterogéneas, donde disminuye la tendencia a la adsorción cuando aumenta  $\theta$ . Para el modelo de Freundlich la entalpía de adsorción disminuye logarítmicamente con el recubrimiento. Esta isoterma, a diferencia de la de Langmuir, no predice que el mineral pueda alcanzar un estado de saturación.

$$\Gamma = m [A]^n \quad (\text{Ec.4.6})$$

---

donde m y n son constantes.

La constante n puede adoptar valores entre 0,6 y 3,3, aunque generalmente se encuentra entre 0,9 y 1,4 (Lyman et al., 1982). Cuando n=1:

$$m=K_d=\Gamma/[A] \quad (\text{Ec.4.7})$$

$K_d$  se denomina constante de distribución y es la pendiente al origen de la isoterma. La isoterma de Freundlich y  $K_d$  suponen la existencia de infinitos sitios de sorción en el sólido (Langmuir, 1997).

Para resolver si los datos experimentales de adsorción obedecen el modelo matemático de Freundlich se linealiza la isoterma aplicando logaritmo a la expresión de la Ec.4.6.

En sistemas donde la adsorción y desorción son completamente reversibles, y los datos de adsorción son obtenidos cuando se ha alcanzado el equilibrio, las isotermas de adsorción y desorción deben ser superponibles. El valor de la constante de reacción es el mismo si el equilibrio se alcanza en la dirección de la adsorción o de la desorción. En muchos casos, las isotermas no son superponibles y muestran histéresis para cierta concentración de adsorbato en la solución, encontrándose que la concentración adsorbida es mayor en la dirección de la desorción. La histéresis observada en las isotermas de desorción de adsorbatos orgánicos es en general debida a factores cinéticos (Sawhney, 1996). En diversos sistemas se observó una rápida adsorción seguida de una desorción lenta (Hamaker y Thompson, 1972; Pignatello y Xing, 1996). El mecanismo de la lenta desorción puede involucrar procesos de difusión molecular desde los sitios de adsorción del mineral, formación de complejos de esfera interna que requieren mayor energía de activación en la dirección de la desorción respecto de la adsorción, o cristalización en la superficie del adsorbente. En estos casos es más conveniente hablar de “pseudo-histéresis” o “histéresis cinética” (Strawn y Sparks, 1999).

---

### **4.3 Experimental:**

#### **4.3.1 Efecto del pH del medio en la adsorción de tetraciclinas.**

Se llevaron a cabo estudios de adsorción en batch donde se evaluó el efecto del pH del medio en la adsorción de tetraciclina y minociclina sobre montmorillonita sódica natural.

Los sistemas de adsorción fueron preparados en tubos plásticos de 10 mL por triplicado, a partir de una solución stock de TC (2,78 mM) y de MC (2,70 mM) preparadas al pH correspondiente y una dispersión de montmorillonita (900 mgL<sup>-1</sup>) que se mantuvo en agitación y al valor de pH correspondiente para cada determinación 24 h antes de su utilización. Se utilizó como electrolito soporte una solución de NaCl 0,01M y los valores de pH de las soluciones fueron ajustados con NaOH o HCl.

Las concentraciones iniciales de TC (0,76 mM), MC (0,74 mM) y la cantidad de montmorillonita (3,6 mg) en los tubos se mantuvieron constantes en los sistemas de adsorción preparados y los valores de pH variaron entre 2 y 11,5. Una vez preparados los sistemas se volvió a ajustar el pH correspondiente para cada determinación cuando fue necesario y luego los tubos se mantuvieron a 20°C, en oscuridad y agitación constante durante 24 horas. Estudios de cinética de adsorción llevados a cabo a distintos valores de pH demostraron que 24 horas es un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio. Posteriormente las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm (7100 x g) durante 30 minutos, utilizando una centrífuga Sorvall RC 5C, y los sobrenadantes fueron separados para ser analizados por espectroscopia UV-vis, a fin de determinar la concentración del antibiótico en equilibrio mediante el registro de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción. Para la cuantificación de los antibióticos se construyeron curvas de calibración (1x10<sup>-5</sup>-8x10<sup>-5</sup> M) para cada valor de pH analizado y para la absorbancia correspondiente a la banda asignada al cromóforo BCD de las moléculas.

La cantidad de antibiótico adsorbida fue calculada por diferencia entre la concentración inicial y la concentración correspondiente al sobrenadante (Ec.4.8).

---

$$C_{ads} = \frac{100V(C_i - C_{eq})}{m} \quad (\text{Ec.4.8})$$

donde  $C_{ads}$  es la concentración de TC adsorbida en mmol/100 g de adsorbente,  $C_i$  y  $C_{eq}$  es la concentración inicial y de equilibrio de TC en mmolL<sup>-1</sup>, V es el volumen del sistema en L y m es la masa de adsorbente en g.

#### 4.3.2 Efecto de la fuerza iónica del medio

Se llevaron a cabo estudios de adsorción en batch donde se evaluó el efecto de la fuerza iónica del medio en la adsorción de tetraciclina sobre montmorillonita sódica natural a valores de pH 4, en el que se encuentra un 15% de la especie catiónica (TCH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y un 85 % de la forma zwitteriónica (TCH<sub>2</sub><sup>±</sup>) y a pH 7 donde las especies TCH<sup>-</sup> y TCH<sub>2</sub><sup>±</sup> se encuentran presentes en un 15 y 85 % respectivamente.

Para el control de la fuerza iónica del medio se utilizaron soluciones de NaCl (10<sup>-4</sup>M-1M) y los valores de pH se ajustaron con soluciones de NaOH y HCl.

Los sistemas de adsorción fueron preparados por triplicado en tubos plásticos de 10 mL, a partir de una solución stock de TC (2,78 mM) y una dispersión de montmorillonita (900 mgL<sup>-1</sup>). Una vez preparados los sistemas de adsorción donde la concentración de TC se mantuvo constante (0,76 mM), se controló el pH cuando fue necesario y luego los tubos se mantuvieron a 20°C, en oscuridad y agitación constante durante 24 horas. Posteriormente las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm (7100 x g) durante 30 minutos y los sobrenadantes fueron separados para ser analizados por espectroscopia UV-vis.

La cantidad de antibiótico adsorbida fue calculada como se indicó en la Ec.4.8.

#### 4.3.3 Efecto del catión de intercambio del mineral arcilloso

A fin de evaluar el efecto del catión de intercambio del mineral en la adsorción de TC, se llevaron a cabo estudios de adsorción en batch a partir de una dispersión de montmorillonita cálcica (900 mgL<sup>-1</sup>) y una solución stock de TC (2,78 mM) con el objeto de comparar los resultados con los obtenidos con

montmorillonita sódica. La concentración de TC en los sistemas de adsorción (0,76 mM) se mantuvo constante y los valores de pH variaron entre 2 y 11,5. Se utilizó como electrolito una solución de NaCl 0,01M y los valores de pH de las soluciones fueron ajustados con NaOH o HCl. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los sistemas de adsorción se mantuvieron en agitación constante, a 20°C y en oscuridad durante 24 horas, luego fueron centrifugados a 8000 rpm (7100 x g) durante 30 minutos y los sobrenadantes fueron separados para ser analizados por espectroscopia UV-vis a fin de determinar la concentración de TC en equilibrio. Para la cuantificación de TC se construyeron curvas de calibración ( $1 \times 10^{-5}$ -  $8 \times 10^{-5}$  M) para cada valor de pH analizado.

La cantidad de antibiótico adsorbida fue calculada como se indicó en la Ec.4.8.

#### **4.3.4 Efecto de la presencia de iones $\text{Ca}^{2+}$ en el electrolito soporte.**

Se llevaron a cabo estudios de adsorción en batch a partir de una dispersión de montmorillonita cálcica ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ) y una solución stock de TC (2,78mM) utilizando como electrolito una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. Los sistemas de adsorción fueron preparados por triplicado como se indicó anteriormente; la concentración de TC en los sistemas (0,76 mM) se mantuvo constante y los valores de pH variaron entre 2 y 11,5.

Para la cuantificación de TC por espectroscopia UV-vis se construyeron curvas de calibración a partir de soluciones de TC ( $1 \times 10^{-5}$ -  $8 \times 10^{-5}$  M) en  $\text{CaCl}_2$  0,01 M y para cada valor de pH analizado.

#### **4.3.5 Cinética de adsorción**

Para estudiar la cinética de adsorción de TC en montmorillonita natural bajo diferentes condiciones experimentales, se prepararon sistemas de adsorción a fuerza iónica controlada (0,01M de NaCl) y a pH 3, 4 y 7. Se utilizaron tubos plásticos de 10 mL para preparar los sistemas de adsorción poniendo en contacto 2,2 mL de solución stock de TC (2,78 mM), 1,8 mL de solución de NaCl 0,01 M y 4 mL de suspensión de montmorillonita ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ). Los tubos se mantuvieron a 20°C en agitación y oscuridad durante 0,5,

---

1, 6, 15, 24 ó 48 horas según corresponda. Posteriormente fueron centrifugados 30 minutos a 8000 rpm (7100 x *g*) y la concentración de TC en el equilibrio se determinó espectrofotométricamente a 357 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **4.3.6 Isotermas de adsorción**

Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita natural: Las isotermas de adsorción se realizaron a cuatro valores de pH (3, 4, 5 y 7). Los sistemas de adsorción se prepararon a partir de series de tubos de centrífuga de 10 mL con 4 mL de dispersión de montmorillonita (900 mgL<sup>-1</sup>), al pH correspondiente y utilizando como electrolito NaCl 0,01 M, y distintos volúmenes de solución stock de TC obteniéndose un rango de concentraciones totales entre 0,07 y 0,90 mmolL<sup>-1</sup>. Cuando fue necesario se ajustaron nuevamente los valores de pH con soluciones de NaOH y HCl. Los tubos fueron agitados en oscuridad durante 24 horas para permitir que el sistema alcance el equilibrio. Luego las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm (7100 x *g*) durante 30 minutos y se removió el sobrenadante para el análisis espectroscópico a 357 nm. La cantidad de TC adsorbida fue calculada como se indicó en la Ec.4.8.

Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica: Las isotermas de adsorción se realizaron a pH 4 utilizando NaCl 0,01 M como electrolito y a pH 7 con NaCl 0,01 M y CaCl<sub>2</sub> 0,01 M como electrolito soporte. Los sistemas de adsorción se prepararon a partir de series de tubos de centrífuga de 10 mL con 4 mL de dispersión de montmorillonita cálcica (900 mgL<sup>-1</sup>), al pH y en el electrolito correspondiente, y distintos volúmenes de solución stock de TC obteniéndose un rango de concentraciones totales entre 0,07 y 0,50 mM. Cuando fue necesario se ajustaron los valores de pH con soluciones de NaOH y HCl. Los tubos fueron agitados en oscuridad durante 24 horas para permitir que el sistema alcance el equilibrio. Luego las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm (7100 x *g*) durante 30 minutos y se removió el sobrenadante para el análisis espectroscópico. La cantidad de TC adsorbida fue calculada como se indicó en la ecuación 4.8.

---

Para la cuantificación de TC por espectroscopia UV-vis se construyeron curvas de calibración a partir de soluciones de TC ( $1 \times 10^{-5}$ -  $8 \times 10^{-5}$  M) en NaCl 0,01 M a pH 4 y 7, y en CaCl<sub>2</sub> 0,01 M a pH 7.

#### **4.3.7 Isotermas de desorción de tetraciclina.**

Las isotermas de desorción se obtuvieron a valores de pH 3 y 7 para los sistemas de adsorción inicialmente preparados en un rango de concentraciones de TC de 0,07 a 0,90 mM. Cuando fue necesario se ajustaron nuevamente los valores de pH con soluciones de NaOH y HCl. Los tubos fueron agitados en oscuridad durante 24 horas para permitir que el sistema alcance el equilibrio. Luego las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm (7100 x *g*) durante 30 minutos y se removió completamente el sobrenadante para determinar la concentración de TC adsorbida mediante el análisis por espectroscopia UV-vis. Se repuso el sobrenadante con el mismo volumen de solución de NaCl 0,01M al pH correspondiente. El complejo resuspendido se mantuvo en agitación a 20°C durante 24 horas; la dispersión fue centrifugada a 8000 rpm (7100 x *g*) y se determinó la cantidad de TC que permanece adsorbida a montmorillonita luego del proceso de desorción, como diferencia entre la cantidad inicialmente adsorbida y la cantidad de TC desorbida que se encuentra en equilibrio con el complejo de adsorción.

### **4.4 Resultados y Discusión**

#### **4.4.1 Efecto del pH del medio en la adsorción de tetraciclinas.**

En la Fig. 4.3 se presenta el efecto del pH en la adsorción de TC sobre montmorillonita sódica natural.

---

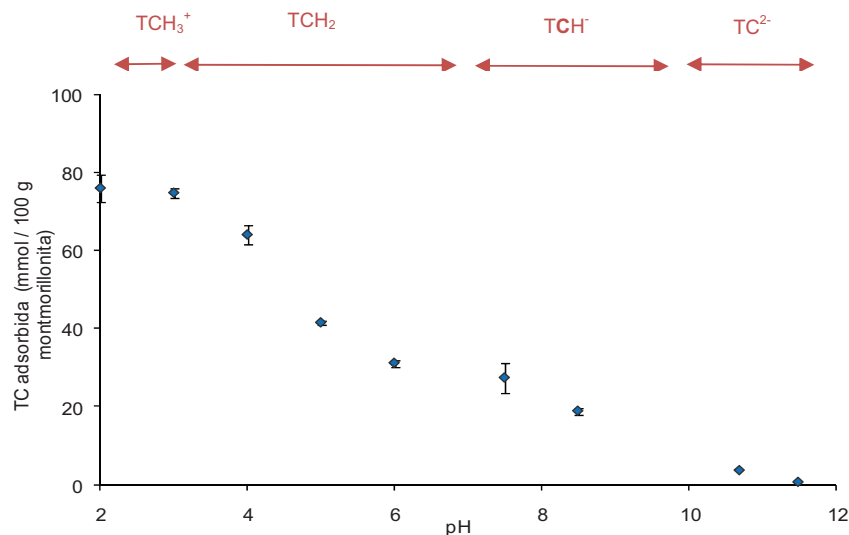


Fig.4.3.- Efecto del pH del medio en la adsorción de TC a montmorillonita sódica natural. Las flechas dobles indican los pH donde predominan en solución cada una de las diferentes especies de TC.

La adsorción de TC es relativamente alta en el intervalo de pH 2-4 y luego disminuye constantemente con el aumento de pH, haciéndose muy pequeña a valores de pH superiores a 10. Similares resultados fueron publicados para la adsorción de TC sobre varios minerales arcillosos (Browne et al., 1980), donde se propuso que el efecto del pH del medio en la adsorción de TC es debido a la interacción de la especie catiónica ( $TCH_3^+$ ) con la superficie del mineral, cuya concentración disminuye al aumentar el pH. A partir de pH 3 comienza el predominio de la especie zwitteriónica de TC, donde la carga negativa en la estructura contrarresta la tendencia al intercambio catiónico con el mineral. Es necesario notar que si bien la especie zwitteriónica tiene una carga neta igual a cero, posee todavía al grupo trialquilamino de posición 4 con una carga positiva. La disposición de la molécula orientando este grupo con carga positiva hacia la superficie, tal como se postuló en el capítulo 3, hace que la adsorción sea todavía favorable aunque menor en magnitud que en el caso de la adsorción de la especie  $TCH_3^+$ . Siguiendo la misma línea de razonamiento, la especie  $TCH^-$  que también posee al mismo grupo con carga positiva y que prevalece en el intervalo de pH 7-10, también se adsorbe sobre el mineral aunque en menor medida que la especie zwitteriónica. Por último, la especie  $TC^{2-}$  no posee ningún grupo con carga positiva en su estructura y su adsorción es mínima.



El razonamiento aplicado en el párrafo anterior supone interacciones puramente electrostáticas entre las diferentes especies de TC y la superficie de la montmorillonita. Sin embargo, es probable que interacciones que no son consideradas del tipo puramente electrostático como la formación de puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas también contribuyan a la adsorción. La participación de interacciones no electrostáticas en la adsorción de sustancias orgánicas a la superficie de minerales ha sido informada por varios autores (Raussell-Colom y Serratosa, 1987; Rodriguez et al., 2003; Ötker y Akmehmet-Balcioğlu, 2005), encontrándose una mayor afinidad para los cationes orgánicos respecto de los inorgánicos con idéntica carga.

El efecto del pH en la adsorción de MC sobre montmorillonita se presenta en la Fig. 4.4.

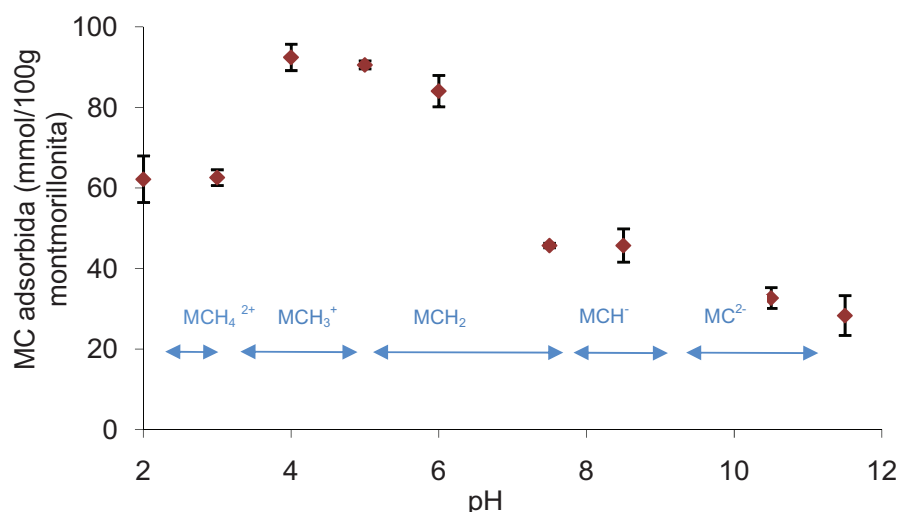


Fig. 4.4.- Efecto del pH del medio en la adsorción de MC a montmorillonita natural. Las flechas dobles indican los pH donde predominan en solución cada una de las diferentes especies de MC.

La adsorción de MC es menor que la de TC a pH 2 y 3, pero se hace mayor desde pH 4 en adelante. El comportamiento a pH 2 y 3 puede comprenderse si se supone que las interacciones electrostáticas prevalecen en estas condiciones. A valores de pH comprendidos entre 2 y 3, MC predomina como catión orgánico divalente. La existencia de esta especie química en solución conduce a que la superficie del mineral adsorba una cantidad inferior de MC que de TC (63 mmol/100g y 75 mmol/100g respectivamente) debido a

que en estas condiciones de pH cada molécula de MC interacciona con dos sitios de carga negativa del mineral. La mayor adsorción de MC a pH 4 o superiores se explica teniendo en cuenta que en el caso de la MC las especies con carga positiva participan en un intervalo de pH más amplio respecto de TC.

A diferencia de TC, la cantidad de MC adsorbida a valores de pH superiores a 10 es de 30 mmol/100g de mineral, lo que pone de manifiesto la participación de interacciones no electrostáticas con la especie  $MC^{2-}$  que presenta un grupo amino más en su estructura respecto de TC para estas interacciones.

#### 4.4.2 Efecto de la fuerza iónica del medio

El efecto de la fuerza iónica del medio en la adsorción de TC sobre montmorillonita se observa en la Fig. 4.5.

La adsorción de TC sobre montmorillonita se mantiene constante a bajas fuerzas iónicas ( $[NaCl] < 0,01$  M) y disminuye al aumentar la concentración de electrolito para los dos valores de pH analizados. El efecto de la fuerza iónica es más marcado a pH 4, donde la especie cargada positivamente de TC ( $TCH_3^+$ ) interacciona electrostáticamente con la superficie del mineral.

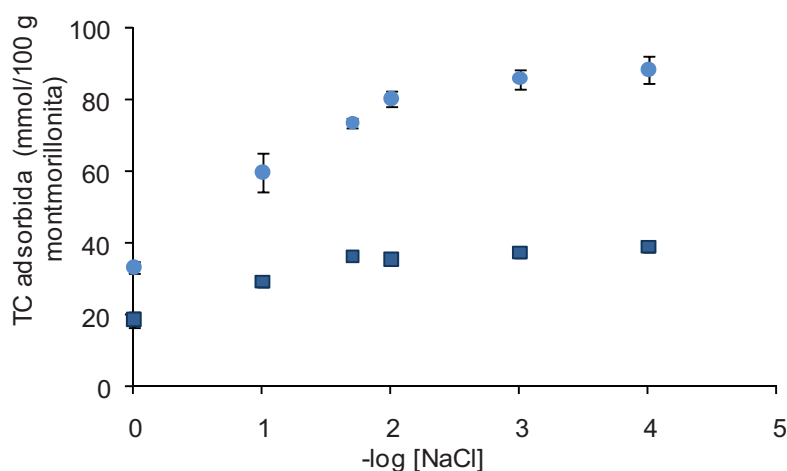


Fig. 4.5.- Efecto de la fuerza iónica del medio en la adsorción de TC sobre montmorillonita natural a pH 4 (●) y a pH 7 (■).

Los resultados experimentales ponen de manifiesto la competencia entre las especies de TC y el  $\text{Na}^+$  por los sitios superficiales del adsorbente.

Cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  es alta, la adsorción de TC es baja, y a medida que disminuye la concentración de  $\text{Na}^+$  la adsorción se hace cada vez más elevada. A pH 4 existe seguramente un intercambio entre sodio y las especies cargadas positivamente de TC. A pH 7, sin embargo, la concentración de especies de TC con carga neta positiva es ínfima respecto de la concentración de otras especies, lo que sugiere que también hay competencia entre sodio y esas otras especies. Por otra parte, se puede observar en la Fig.4.5 que a concentraciones tan altas de  $\text{Na}^+$  como 1M, la cantidad de TC adsorbida es considerable. Esto no podría ser posible si la TC se une a la superficie sólo por interacciones electrostáticas; ya que concentraciones de  $\text{Na}^+$  más de 1000 veces superiores a las de TC implicarían un completo desplazamiento de TC por  $\text{Na}^+$ . Los datos sugieren entonces que las especies de TC se unen a la superficie por interacciones no electrostáticas además de las interacciones electrostáticas.

#### 4.4.3 Efecto del catión de intercambio del mineral arcilloso

En la Fig. 4.6 se observan los resultados de las experiencias de adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica en un intervalo de pH 2-11,5.

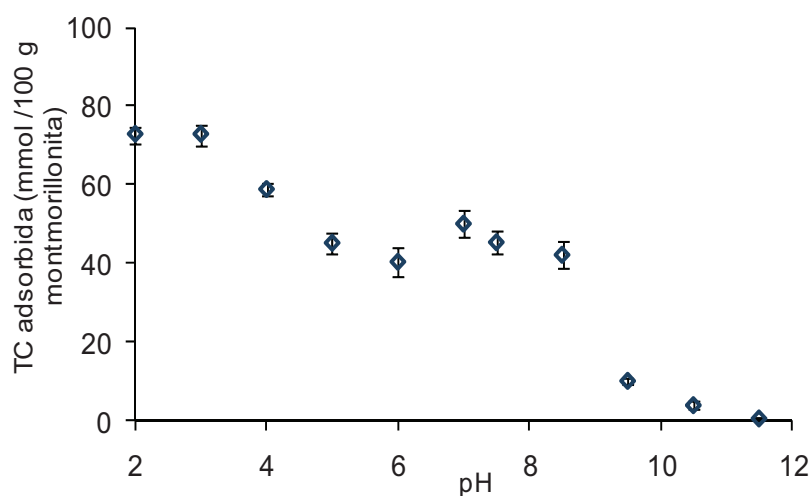


Fig. 4.6.- Adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica.

Nuevamente se observa una marcada dependencia del pH en la adsorción de TC sobre el mineral.

Para una mejor comprensión del efecto de la presencia de calcio, en la Fig. 4.7 se comparan los resultados experimentales de la adsorción de TC sobre montmorillonita sódica y cálcica a distintos valores de pH. No se observan diferencias en la afinidad de TC por el mineral, con sodio o calcio como principal catión de intercambio, a pH por debajo de 5 y por encima de 9,5. Sí se encuentran diferencias significativas entre pH 5 y 9,5, donde se observa una mayor adsorción de TC en el caso de la montmorillonita cálcica.

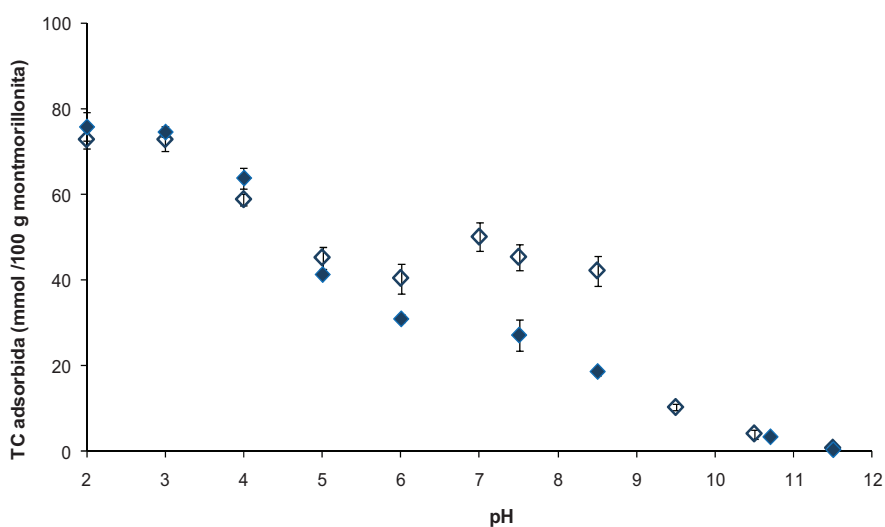


Fig. 4.7.- Adsorción de TC sobre montmorillonita sódica natural (◆) y sobre montmorillonita cálcica (◇).

La cantidad de TC adsorbida sobre el mineral es aproximadamente constante (45 mmoles/100g) en el intervalo de pH 6-8,5. La concentración del catión divalente en el mineral calculada a partir de la CIC y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con la montmorillonita cálcica (Fig. 3.27) es 44 mmoles/100g, lo que sugiere la formación de complejos 1:1 (TC:Ca) sobre la superficie de la montmorillonita. Los complejos 1:1 son los que predominan en solución en presencia de calcio de acuerdo a la distribución de especies mostrada en el capítulo 2, por lo que es probable que este tipo de complejos también se forme en la superficie de la montmorillonita. Además, teniendo en cuenta que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con el complejo de adsorción es menor que la correspondiente a la dispersión de la montmorillonita cálcica

en el mismo intervalo de pH (Fig. 3.27), se espera que la afinidad de TC aumente a causa de la formación de complejos de la especie  $\text{TCH}^-$  con el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la superficie del mineral.

A pH 7 existe un 20% de la especie  $\text{TCH}^-$ , donde la carga negativa adoptada es producto del segundo paso de deprotonación ( $\text{pK}_a=7,7$ ) de los grupos funcionales (O11 y O12) de la molécula. Estos grupos actúan como dadores de electrones en la interacción con el catión  $\text{Ca}^{2+}$  (Mitscher et al., 1972).

#### 4.4.4 Efecto de la presencia de iones $\text{Ca}^{2+}$ en el electrolito soporte.

En la Fig. 4.8 se compara el efecto del pH en la adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica en presencia de  $\text{NaCl}$  y  $\text{CaCl}_2$  como electrolitos.

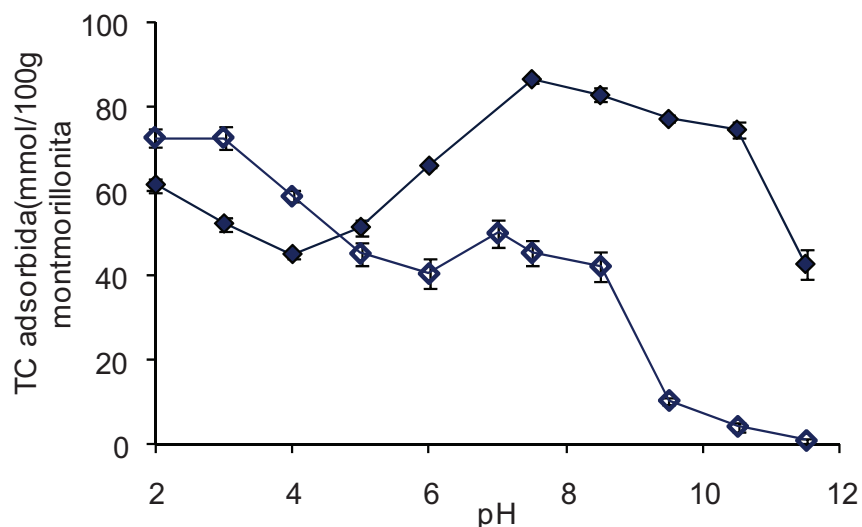


Fig. 4.8.- Efecto del pH en la adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica en presencia de electrolito  $\text{CaCl}_2$  0,01M (◆) y electrolito  $\text{NaCl}$  0,01M (◇).

Se observa que en los sistemas preparados con  $\text{CaCl}_2$  como electrolito soporte la adsorción de TC es menor entre pH 2 y 4,5 que en el sistema que contiene  $\text{NaCl}$ , y mayor por encima de pH 4.

La disminución en la adsorción de TC observada en el intervalo de pH 2-4,5 para los sistemas preparados con  $\text{CaCl}_2$  como electrolito debe ser principalmente producto de la competencia entre  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{TCH}_3^+$ , mientras que los resultados obtenidos a partir de pH 4,5 sugieren la formación de complejos TC-Ca en solución que se adsorben a la montmorillonita (Fig. 4.9).

En estos sistemas el  $\text{Ca}^{2+}$  y la TC se encuentran en una relación molar 26:1, pudiéndose formar complejos con estequiometría 1:1 y 2:1 (Ca:TC) donde un catión  $\text{Ca}^{2+}$  interacciona con los grupos donores de electrones de los sistemas de anillos BCD y A (oxígenos de las posiciones 12 y 12) de la molécula, que se encuentra mayormente en conformación extendida (Fig. 2.30) y un segundo catión interacciona con los grupos N4-12a fundamentalmente a altos valores de pH donde el N4 se encuentra deprotonado (Lambs et al., 1988).

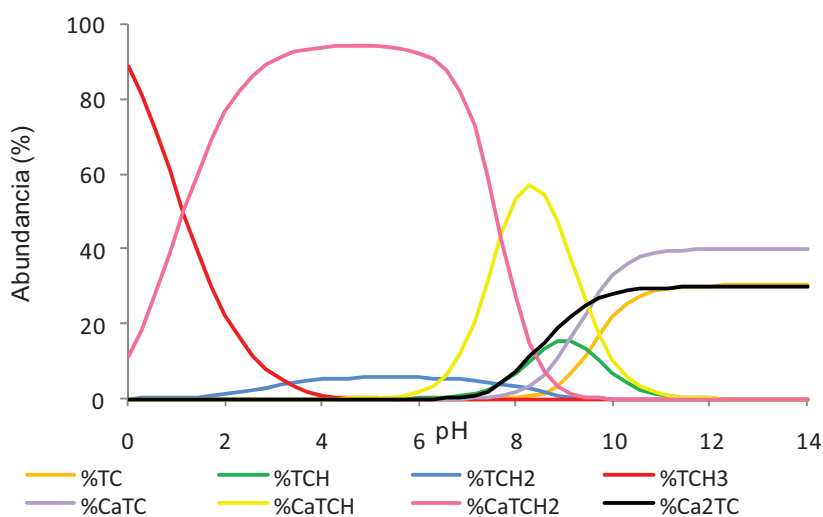


Fig. 4.9.- Diagrama de distribución de especies de TC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución (TC: 0,01M y  $\text{Ca}^{2+}$ : 0,26 M), calculadas utilizando el programa MINEQL.

La alta afinidad de TC por el mineral a pH superiores a 4,5 sugiere que la formación de complejos con  $\text{Ca}^{2+}$  cambia la carga de las especies neutras y negativas de TC formándose los complejos  $\text{CaTCH}_2^{2+}$ ,  $\text{CaTCH}^+$  y  $\text{Ca}_2\text{TC}^{2+}$  con mayor afinidad por la superficie del mineral cargada negativamente. En especial, la formación del complejo  $\text{Ca}_2\text{TC}^{2+}$  explicaría la adsorción de TC a pH

superior a 9, donde en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se observó que la retención de TC es despreciable (Fig. 4.7).

#### 4.4.5 Cinética de adsorción

Los estudios cinéticos de la adsorción de TC sobre montmorillonita natural se llevaron a cabo a tres pH diferentes. Los resultados son mostrados en la Fig. 4.10.

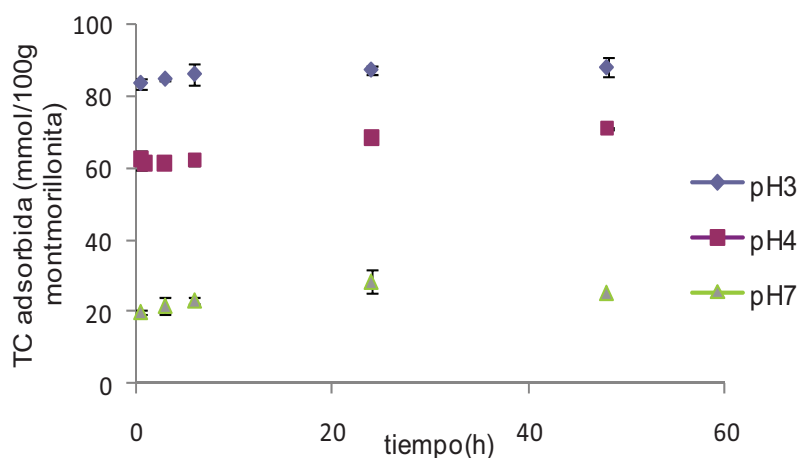


Fig. 4.10.- Cinética de adsorción de TC sobre montmorillonita sódica natural.

Para los tres valores de pH analizados se observó que prácticamente no hay variación en la cantidad de TC adsorbida con el tiempo (Fig. 4.10). La adsorción de TC ocurre mayoritariamente antes de los 30 minutos a todos los pH estudiados por lo que el equilibrio de adsorción se alcanza rápidamente.

En los estudios de adsorción se consideró que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es de 24 horas.

#### 4.4.6 Isotermas de adsorción

El diseño experimental correspondiente a las isotermas de adsorción comprende relaciones TC-montmorillonita entre 0 y 170 mmol/100g de mineral, relaciones que se encuentran por debajo y por encima de la CIC del mineral.

Las isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita natural se muestran en la Fig. 4.11. Los resultados obtenidos muestran una mayor adsorción de TC a bajos valores de pH, tal como se observó en la Fig.4.4.

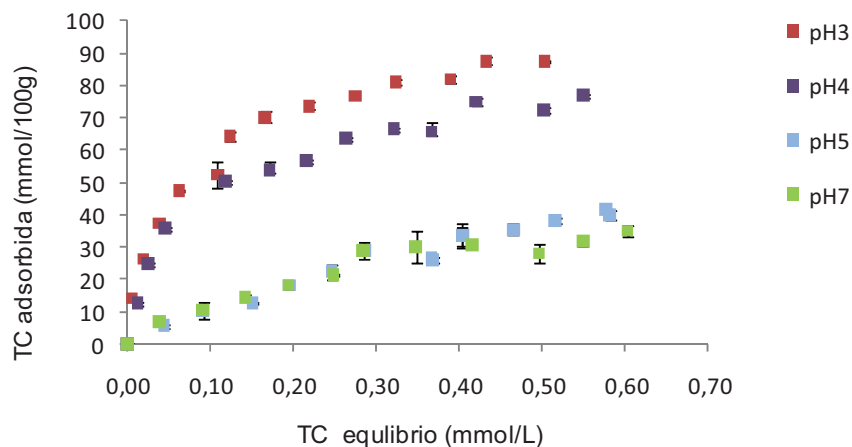


Fig. 4.11.- Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita natural a pH 3, 4, 5 y 7.

El plateau de adsorción a pH 3 se alcanza a un valor de TC adsorbida de 87 mmol/100g, ligeramente inferior a 104 mmol/100g que corresponde a la capacidad de intercambio del mineral, debido a que en estas condiciones de pH predomina la especie  $\text{TCH}_3^+$  (aproximadamente 70%).

Para los valores de pH 5 y 7 se alcanzan adsorciones de alrededor de 35 mmol/100g de mineral. La especie que predomina en este intervalo de pH es  $\text{TCH}_2^-$  donde la carga negativa, adoptada por deprotonación del grupo  $-\text{OH}$  próximo al sitio catiónico de TC, hace que la afinidad por la superficie sea menor. En la Fig. 4.12 se presentan las isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$ .



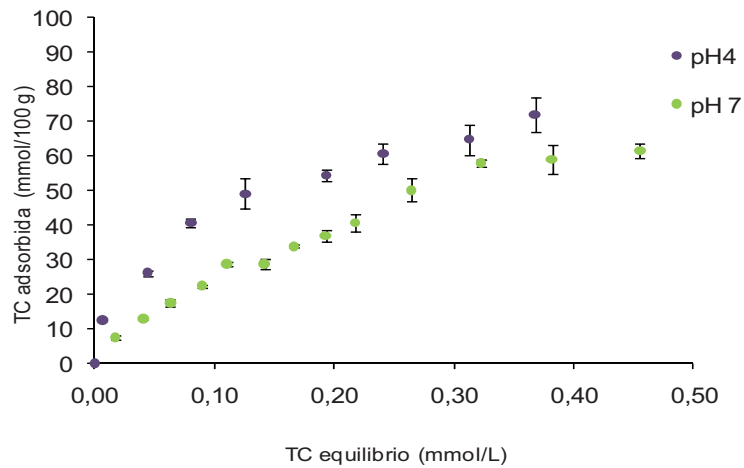


Fig. 4.12.- Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica a pH 4 y 7.

La concentración de TC adsorbida alcanza, para este mineral, valores promedios de 70 y 60 mmoles/100g para pH 4 y 7 respectivamente. Los efectos del pH en la adsorción ya fueron discutidos previamente y no necesitan ser analizados nuevamente aquí. Cabe destacar, sin embargo, que estos efectos se manifiestan en todo el intervalo de concentraciones estudiados (0-0,60 mmol/L), y que la isoterma a pH 7 se encuentra siempre por debajo de la isoterma a pH 4. El efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución de electrolito para la adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica a pH 4 se observa en la Fig. 4.13 y a pH 7 en la Fig. 4.14.

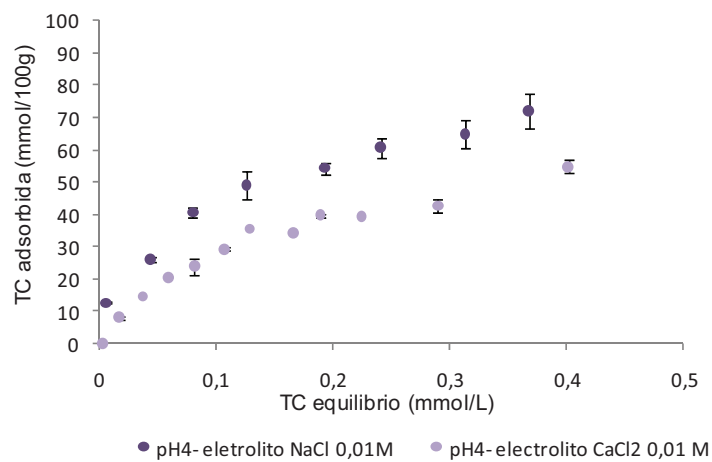


Fig. 4.13.- Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica a pH 4 y con distintos electrolitos.

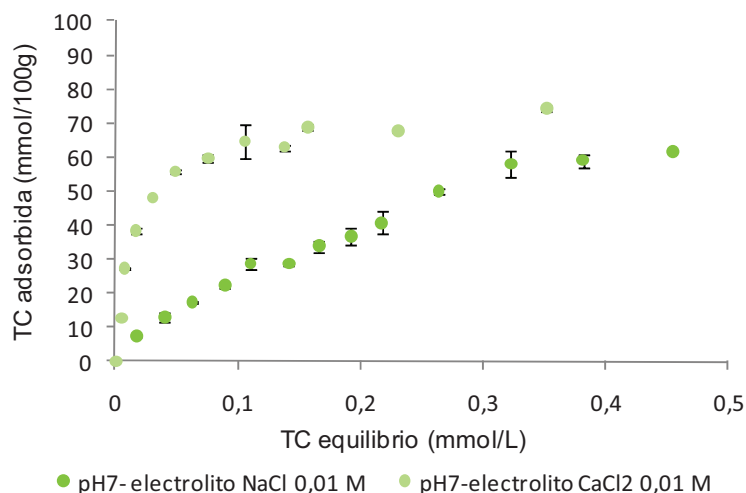


Fig. 4.14.- Isothermas de adsorción de TC sobre montmorillonita cálcica a pH 7 y con distintos electrolitos.

A pH 4 las especies de TC presentes en solución son  $\text{TCH}_3^+$  y  $\text{TCH}_2^+$  (15 y 85%) y la adsorción se debe principalmente a interacciones electrostáticas con intercambio catiónico. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución a bajos valores de pH representa una competencia para el intercambio catiónico sobre la montmorillonita, disminuyendo la adsorción de TC.

A pH 7 las especies que prevalecen son  $\text{TCH}_2^-$  y  $\text{TCH}^-$  y el incremento en la afinidad de TC por el mineral pone de manifiesto la formación de complejos con  $\text{Ca}^{2+}$ . La formación de complejos como  $[\text{CaH}_2\text{TC}]^{2+}$  y  $[\text{CaHTC}]^+$  disminuyen la concentración de las especies zwitteriónica y aniónica de TC en solución (Fig.2.7) y explican el comportamiento de adsorción en condiciones de pH donde TC tiene una baja afinidad por la montmorillonita.

El análisis de las isothermas de adsorción pone de manifiesto que el efecto del Ca observado en las experiencias anteriores ocurre en todo el intervalo de concentraciones de TC estudiado (0-0,40 mmol/L).

#### 4.4.7 Isothermas de desorción de tetraciclina

En las Fig. 4.15 y 4.16 se presentan las isothermas de adsorción y desorción de TC del complejo TC-montmorillonita natural a pH 3 y 7 respectivamente.

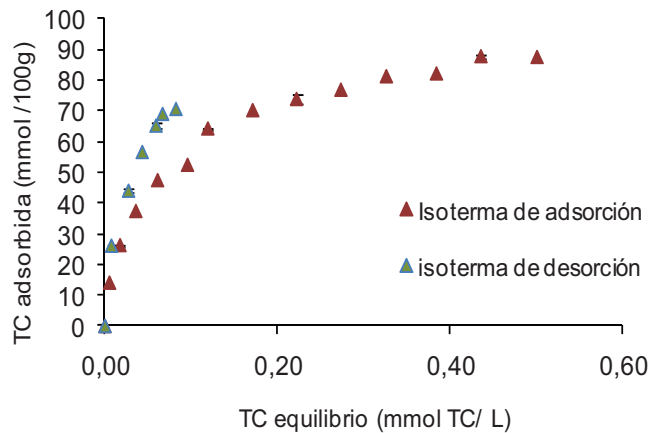


Fig. 4.15- Isotermas de adsorción y desorción de TC en montmorillonita sódica natural a pH 3.

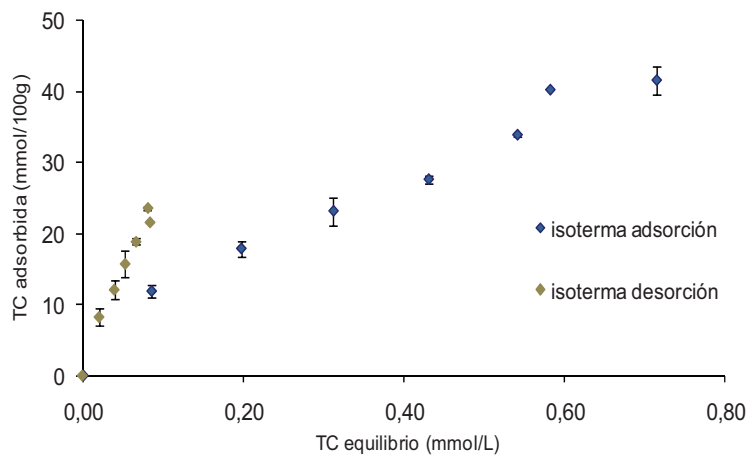


Fig. 4.16- Isotermas de adsorción y desorción de TC en montmorillonita sódica natural a pH 7.

En los dos casos hay una falta de coincidencia entre las isotermas de adsorción y desorción. Para una dada concentración en equilibrio de TC, la cantidad adsorbida es menor en la isoterma de adsorción que en la de desorción, resultando en histéresis. Esta histéresis indica que cierto mecanismo involucrado en el proceso de adsorción puede ser irreversible o muy lentamente reversible. Las causas de la menor velocidad de desorción puede ser la mayor energía de activación requerida en la dirección de la desorción debida a la ruptura de fuertes enlaces entre el adsorbato y la superficie (McBride, 2000, Appel y Ma, 2002) como también la formación de fases precipitadas durante el proceso de adsorción (Ainsworth et al., 1987).

Existen en la literatura numerosos estudios del proceso de adsorción-desorción sobre minerales arcillosos y diversas interpretaciones de histéresis. [Barriuso et al. \(1994\)](#) observaron que la adsorción de moléculas neutras en esmectitas es generalmente reversible y proponen que la histéresis positiva encontrada en la desorción de atrazina de esmectitas con alta densidad de carga podría ser debida al entrapamiento de la molécula en la estructura cristalina de esmectita. [Gu et al. \(2007\)](#) estudiaron la interacción de TC con ácidos húmicos y obtuvieron isotermas de desorción con mayor pendiente que las isotermas de adsorción para distintas fuerzas iónicas; la histéresis observada fue atribuida al entrapamiento físico de la molécula en la matriz orgánica o a cambio conformacional en los ácidos húmicos que se produce luego de la interacción con el antibiótico. Por otro lado, [Morton et al. \(2001\)](#) encontraron que la irreversibilidad en la adsorción de cobre sobre montmorillonita se debe a la coordinación del catión a sitios superficiales de alta energía del mineral.

En el caso particular de la adsorción de TC sobre montmorillonita, no hay reportes en la literatura con los que se puedan comparar los resultados mostrados en las figuras anteriores. La histéresis observada es probablemente debida a uno o varios de los factores mencionados anteriormente o a otros no nombrados. De hecho, si la adsorción ocurre inicialmente sobre un sistema relativamente delaminado como es el de una montmorillonita sódica, esta adsorción induce agregación de las láminas de arcillas quedando la TC en el espacio intercapa. La lenta difusión de la TC en el espacio intercapa que tendría que tener lugar durante la etapa de desorción podría ser la causante de la histéresis.

En las Fig. 4.17 y 4.18 se presentan las isotermas de adsorción y desorción de TC del complejo TC-montmorillonita cálcica a pH 4 y pH 7 respectivamente.

---

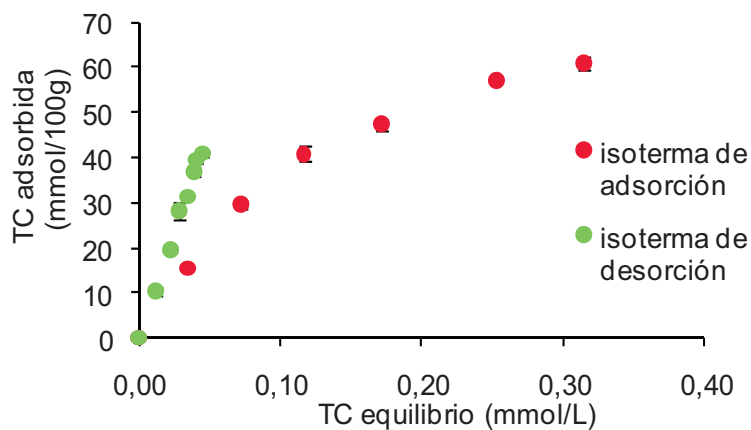


Fig. 4.17- Isotermas de adsorción y desorción de TC en montmorillonita cálcica a pH 4.

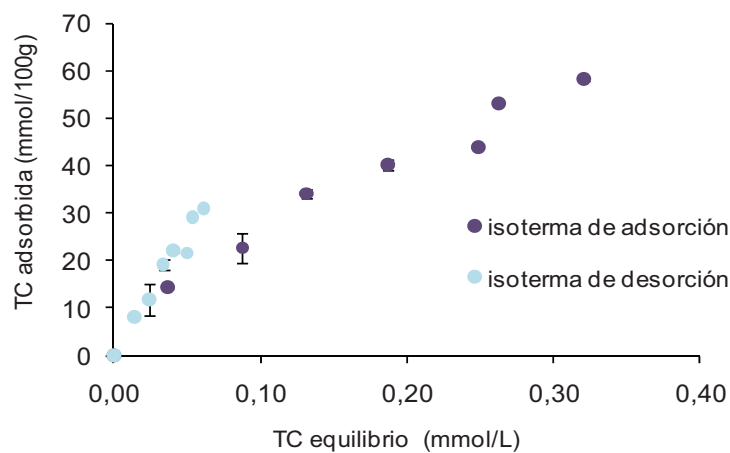


Fig. 4.18- Isotermas de adsorción y desorción de TC en montmorillonita cálcica a pH 7.

Para la montmorillonita cálcica también se observa histéresis en las dos condiciones de pH estudiadas.

Para los sistemas de mayor concentración de TC adsorbida se calcularon los % de desorción (Tabla 4.1), teniendo en cuenta la cantidad de TC adsorbida correspondiente a la isoterma de adsorción y la cantidad de TC que permanece adsorbida luego del proceso de desorción (isoterma de desorción).

Tabla 4.1.- Efecto del pH del medio y del catión de intercambio en la desorción de TC.

Sistema	pH	% Desorción
TC-montmorillonita-Na	3	20
TC-montmorillonita-Na	7	43
TC-montmorillonita-Ca	4	34
TC-montmorillonita-Ca	7	46

Los resultados obtenidos sugieren que a bajos valores de pH intervienen fuerzas de adsorción entre TC y la montmorillonita, obteniéndose para la montmorillonita natural y cálcica los menores % de desorción. Similar efecto del pH fue observado en la desorción de nicotina a partir de complejos nicotina-esmectita (Pongjanyakul et al., 2009).

#### 4.5 Interpretación del comportamiento de adsorción de tetraciclina sobre montmorillonita natural mediante un modelo matemático.

Los resultados experimentales de adsorción de TC sobre montmorillonita natural fueron ajustados con un modelo matemático que considera la interacción de las especies de TC con la superficie de la montmorillonita. Se asume que el mineral presenta sitios superficiales activos para la adsorción de TC ( $S^-$ ), cuya densidad superficial representa la densidad de carga estructural de la montmorillonita, dada por su valor de CIC. De acuerdo al modelo propuesto, cada especie de TC ( $TCH_3^+$ ,  $TCH_2^+$ ,  $TCH^-$ ) y los cationes  $Na^+$  del electrolito soporte, interaccionan con los sitios del mineral y compiten por ellos. No se considera el aporte a la adsorción de TC de la especie  $TC^{2-}$ , con ausencia de grupos con carga positiva en la molécula, debido a que no interaccionaría significativamente con el mineral.

En la Ec.4.9 se representa la adsorción de la especie totalmente protonada  $TCH_3^+$  a la superficie de la montmorillonita.



donde  $S^-$  es el sitio de unión de  $TCH_3^+$  a la montmorillonita y  $S^-TCH_3^+$  es la especie superficial formada por la unión de  $S^-$  y  $TCH_3^+$ .

La ley de acción de masa correspondiente a la reacción anterior es representada como:

$$K_{TCH_3} = \frac{(S^-TCH_3^+)}{(S^-)[TCH_3^+]} \quad (\text{Ec.4.10})$$

donde  $K_{TCH_3}$  es la constante de adsorción,  $(S^-TCH_3^+)$  y  $(S^-)$  representan la concentración superficial en mmol/100g y  $[TCH_3^+]$  representa la concentración de la especie en solución en mol/L.

De manera análoga, se pueden formular las reacciones de adsorción de  $TCH_2$  y  $TCH^-$  para obtener las especies superficiales  $S^-TCH_2$  y  $S^-TCH^-$  respectivamente, y la reacción de  $S^-$  con  $Na^+$  para dar la especie superficial  $S^-Na^+$ . El catión  $Na^+$  está presente en el sistema de adsorción debido a que es el principal catión de intercambio de la montmorillonita y a que el electrolito utilizado en el control de la fuerza iónica es NaCl. La ley de acción de masa para las reacciones correspondientes se representa en las Ec.4.11, 4.12 y 4.13 respectivamente.

$$K_{TCH_2} = \frac{(S^-TCH_2)}{(S^-)[TCH_2]} \quad (\text{Ec.4.11})$$

$$K_{TCH} = \frac{(S^-TCH^-)}{(S^-)[TCH^-]} \quad (\text{Ec.4.12})$$

$$K_{Na} = \frac{(S^-Na^+)}{(S^-)[Na^+]} \quad (\text{Ec.4.13})$$

El modelo se completa con el balance de masa para los sitios superficiales del mineral,  $N_s$ :

$$N_s = (S^-) + (S^-TCH_3^+) + (S^-TCH_2) + (S^-TCH^-) + (S^-Na^+) \quad (\text{Ec.4.14})$$

el valor de  $N_s$ , que representa la densidad de sitios cargados en la superficie, se consideró igual a la CIC del mineral (104 mEq/100g).

La Ec.4.14 indica que los sitios de carga estructural están presentes como sitios libres  $S^-$  o sitios unidos a iones  $Na^+$  o a especies de TC. La concentración de especies de TC adsorbidas y cationes  $Na^+$  en la superficie del

mineral puede ser calculada para cada valor de pH por combinación de las Ec.4.10 a 4.14:

$$(S^-TCH_3^+) = \frac{N_S K_{TCH_3} [TCH_3^+]}{D} \quad (\text{Ec.4.15})$$

$$(S^-TCH_2) = \frac{N_S K_{TCH_2} [TCH_2]}{D} \quad (\text{Ec.4.16})$$

$$(S^-TCH^-) = \frac{N_S K_{TCH} [TCH^-]}{D} \quad (\text{Ec.4.17})$$

$$(S^-Na^+) = \frac{N_S K_{Na} [Na^+]}{D} \quad (\text{Ec.4.18})$$

donde el denominador D de las ecuaciones es:

$$D = 1 + K_{TCH_3} [TCH_3^+] + K_{TCH_2} [TCH_2^{2-}] + K_{TCH} [TCH^-] + K_{Na} [Na^+] \quad (\text{Ec.4.19})$$

El modelo, tal como está propuesto, representa un conjunto de isotermas de Langmuir para las diferentes especies de TC que se adsorben y para  $Na^+$ , todos ellos compitiendo por los mismos sitios superficiales.

El sistema de ecuaciones 4.15–4.19 puede ser resuelto si se conocen los valores de  $N_s$  (104 mEq/100g), las concentraciones de cada especie de TC en solución y los valores de las diferentes constantes de adsorción. Los cálculos fueron realizados mediante el programa Microsoft EXCEL; las concentraciones en solución de las diferentes especies de TC se calcularon para cada valor de pH a partir de sus valores de pKa.

Los valores de las constantes de reacción  $K_{TCH_3}$ ,  $K_{TCH_2}$ ,  $K_{TCH}$  y  $K_{Na}$  obtenidos son los que presentaron el mejor ajuste a los datos experimentales y se presentan en la Tabla 4.2.



Tabla 4.2.- Constantes de adsorción de las especies de TC y Na<sup>+</sup> sobre montmorillonita. Las unidades de K son L/mol.

Especies de TC	log (K)
<b>TCH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	<b>4.20 ± 0.05</b>
<b>TCH<sub>2</sub></b>	<b>2.93 ± 0.05</b>
<b>TCH<sup>-</sup></b>	<b>2.60 ± 0.05</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>0.60 ± 0.05</b>

Las Fig. 4.19 y 4.20, por otra parte, muestran las predicciones del modelo para la adsorción de TC a distintos valores de pH y para las isothermas de adsorción, a partir de los valores de constantes de reacción presentados en la Tabla 4.2. El análisis de correlación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo se realizó con el programa STATISTICA 6.0.

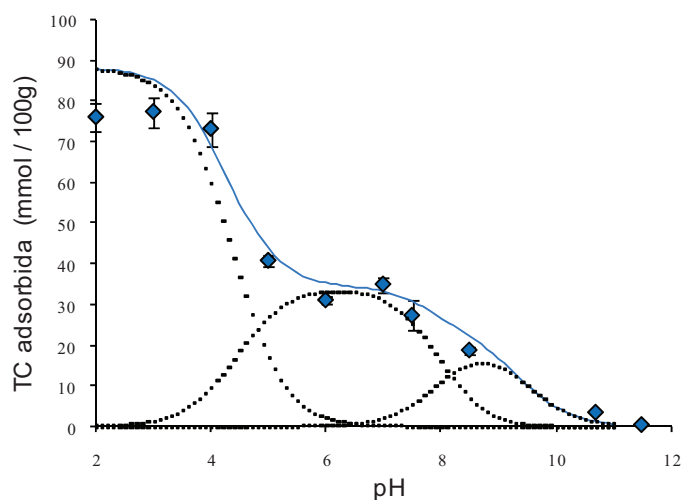


Fig. 4.19.- Adsorción de TC a montmorillonita en función del pH. ◆: datos experimentales. Línea sólida: predicción de la adsorción de TC según el modelo,  $r = 0,99$  ( $p < 0.05$ ). Líneas punteadas: contribución de las diferentes especies de TC a la adsorción total.

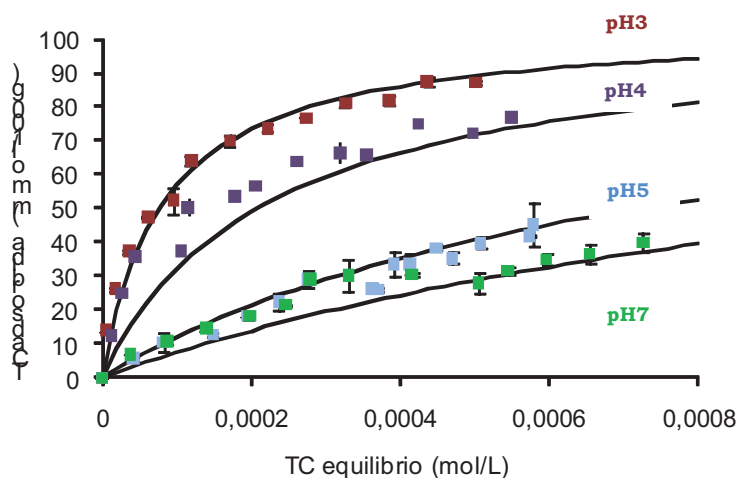


Fig.4.20.- Isotermas de adsorción de TC sobre montmorillonita. Las curvas teóricas (líneas sólidas) fueron obtenidas a partir del modelo propuesto para cada valor de pH;  $r = 1,00$  ( $p < 0.05$ ) para pH3,  $r = 0,98$  ( $p < 0.05$ ) para pH 4,  $r = 0.98$  ( $p < 0.05$ ) para pH 5 y  $r = 0,96$  ( $p < 0.05$ ) para pH7.

El modelo propuesto describe satisfactoriamente la adsorción de TC sobre montmorillonita, aún cuando se observa una pequeña sobreestimación en la adsorción a bajos valores de pH. Esta falta de ajuste puede ser debida a que el modelo propuesto no considera la competencia que representa una alta concentración de protones por los sitios de adsorción a esos valores de pH. De acuerdo a las constantes de reacción obtenidas, la afinidad de las especies de TC por la montmorillonita muestra el siguiente orden  $TCH_3^+ > TCH_2^+ > TCH^-$  como se deduce de la disminución en las correspondientes constantes ( $K_{TCH_3} > K_{TCH_2} > K_{TCH}$ ).

Las constantes de adsorción para cada especie, reflejan la existencia de fuerzas de atracción al mineral de diferente magnitud. Las especies con carga positiva  $TCH_3^+$  y  $Na^+$  son atraídas electrostáticamente a la superficie cargada negativamente. Sin embargo, si sólo se considera en el modelo la adsorción de especies catiónicas como  $TCH_3^+$  y  $Na^+$ , el ajuste de los resultados experimentales es muy pobre y no se puede predecir la adsorción a pH mayor a 6 (datos no mostrados), ya que la concentración de  $TCH_3^+$  es despreciable a esos valores de pH.

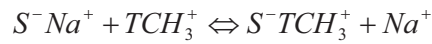
Si se considera solo la atracción electrostática al mineral se debe tener presente que las especies  $TCH_2^+$  y  $TCH^-$ , con carga neta 0 y -1, mantienen el grupo amino protonado en sus moléculas. Este grupo con carga positiva se

orientará próximo a la superficie mientras que los grupos cargados negativamente se ubicarán tan alejados como sea posible de la superficie. Mientras más grupos con cargas negativa posea la especie de TC, menor será su afinidad por la superficie y menor su K, hecho que concuerda con los resultados obtenidos ( $K_{TCH3} > K_{TCH2} > K_{TCH}$ ). Este análisis revela que la atracción electrostática juega un rol importante en la adsorción no sólo de  $TCH_3^+$  sino también de  $TCH_2^+$  y  $TCH^-$ .

Tal como se mencionó anteriormente, interacciones que no son consideradas del tipo puramente electrostático como la formación de puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas también deben contribuir a la adsorción. Esto puede deducirse a partir de la mayor afinidad que posee el catión orgánico ( $TCH_3^+$ ) respecto del inorgánico ( $Na^+$ ) por la superficie de la montmorillonita. Combinando las Ec.4.10 y 4.13 se obtiene la constante de intercambio ( $K_{int}$ ).

$$K_{int} = \frac{K_{TCH3}}{K_{Na}} = \frac{(S^-TCH_3^+)[Na^+]}{(S^-Na^+)[TCH_3^+]}$$

correspondiente al siguiente proceso:



Si se considera que  $Na^+$  y  $TCH_3^+$  solo interactúan electrostáticamente con la superficie del mineral, las constantes de reacción  $K_{TCH3}$  y  $K_{Na}$  debería ser similares y  $K_{int}$  tendría que tener un valor muy cercano a 1. En el sistema estudiado  $K_{TCH3}$  es mucho mayor que  $K_{Na}$  y  $K_{int}$  adopta el valor 4000, revelando mucho mayor afinidad de  $TCH_3^+$  por la superficie que la de  $Na^+$ . La mayor afinidad de la especie  $TCH_3^+$  por la superficie del mineral está dada por la participación de interacciones puente hidrógeno e hidrofóbicas que tienen lugar no sólo con  $TCH_3^+$  sino también con  $TCH_2^+$  y  $TCH^-$ , y que dirigen la adsorción de éstas especies. Estos mecanismos de interacción son frecuentemente encontrados en la adsorción de sustancias orgánicas iónicas sobre la superficie de minerales (Ötker y Akmehmet-Balcioğlu, 2005).

---

#### **4.6 Modo de adsorción propuesto para tetraciclina sobre montmorillonita.**

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la adsorción de TC sobre montmorillonita ocurre en los sitios superficiales del mineral, encontrándose las moléculas de antibiótico intercaladas en el espacio intercapa como una monocapa.

Las especies de TC y los cationes inorgánicos en solución compiten por los sitios reactivos del mineral, que son principalmente sitios de carga negativa estructural.

La competencia entre TC y  $\text{Na}^+$  resulta más evidente a valores de pH donde TC existe como especie catiónica, por lo que el intercambio iónico es el mecanismo operante a bajos valores de pH. La mayor afinidad que presenta la especie  $\text{TCH}_3^+$  respecto de  $\text{Na}^+$  indica que la interacción con el mineral no es únicamente electrostática. Para moléculas orgánicas complejas como la tetraciclina, pueden operar simultáneamente varios tipos de interacciones que incluyen interacciones puente hidrógeno y fuerzas de van der Waals, además de las interacciones electrostáticas. Estos tipos de interacciones explican la adsorción de TC en un amplio intervalo de concentraciones, de pH y de fuerza iónica.

A valores de pH donde la TC presenta grupos funcionales deprotonados ( $\text{TCH}_2^+$  y  $\text{TCH}^-$ ) la molécula orientaría los grupos cargados positivamente, acercándolos a la superficie del mineral y alejando los grupos con carga negativa y de esta manera los incrementos en los espaciados basales dependen de la carga neta de la especie adsorbida.

El  $\text{Ca}^{2+}$  como catión de intercambio del mineral actúa como sitio activo interaccionando con las especies de TC que presentan los grupos  $-\text{OH}$  deprotonados ( $\text{TCH}_2^+$  y  $\text{TCH}^-$ ) y aumentando la cantidad de TC adsorbida para el intervalo de pH 5-9,5. Estos grupos actúan como dadores de electrones y son los responsables de la coordinación de TC con el catión. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en solución ( $\text{CaCl}_2$  como electrolito) compite con la especie  $\text{TCH}_3^+$  que existe a bajos valores de pH. A medida que el pH del sistema aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  forma complejos con TC en solución, cambia la carga de la especie de TC y se adsorbe el complejo TC-Ca, por lo que aumenta la afinidad de TC por el mineral a valores de pH superiores a 6.

---

---

## 5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS ADSORBIDOS A MONTMORILLONITA

### 5.1 Minerales arcillosos en sistemas de liberación de fármacos.

Las montmorillonitas pueden ser agregadas a productos farmacéuticos tanto como excipientes o sustancias activas (Wang et al., 2008). La intercalación de sustancias orgánicas en el espacio intercapa de éste tipo de sólidos inorgánicos permite preparar sistemas híbridos orgánico-inorgánicos con propiedades tanto del adsorbente inorgánico como de la sustancia orgánica en un mismo material (Mohanambe y Vasudevan, 2005).

En los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de esmectitas intercaladas con diferentes principios activos, debido a que estos sistemas presentan óptimas propiedades fisico-químicas. Zheng et al. (2007) estudiaron la intercalación de ibuprofeno en una montmorillonita con el objeto de obtener un sistema de liberación continua. Joshi et al. (2009) utilizaron montmorillonita para la liberación de maleato de timolol *in vitro*. Lin et al. (2002) prepararon sistemas 5-fluorouracil–montmorillonita y Park et al. (2008) sistemas donepezil-esmectitas. Fejer et al. (2001) estudiaron la intercalación y liberación de cloruro de prometacina y clorhidrato de buformina de montmorillonita.

En estudios farmacológicos se ha encontrado que las montmorillonitas adsorben bacterias como *Escherichia coli* y *S. aureus* e inmovilizan toxinas (Zhou et al., 2004; Hu y Xia, 2006). Algunos autores han encontrado que los minerales arcillosos naturales no muestran efecto antibacteriano pero sí lo presentan cuando el mineral adsorbe sustancias con actividad antimicrobiana (Jantova et al., 1997; Wang et al., 2008).

La absorción oral de varias drogas puede ser reducida por la presencia de agentes estabilizantes como las arcillas. En la bibliografía existen varias investigaciones respecto de la disminución en la biodisponibilidad de fármacos por coadministración con antiácidos (trisilicato de magnesio), antidiarreicos (atapulgita y caolinita) y agentes estabilizadores de suspensiones (talco, bentonita) (Thoma et al., 1966; Jain y Kakkar, 1992; Vatieer et al., 1994). Sin embargo, los minerales arcillosos pueden ser utilizados con beneficios tecnológicos y biofarmacéuticos como es su utilización en sistemas de liberación

---

modificada (Aguzzi et al., 2007). En dichos sistemas se provee niveles terapéuticos de una sustancia activa al sitio de acción y se mantienen estos niveles a lo largo del tratamiento (Ding et al., 2002). En un sistema de liberación modificada se altera la velocidad, el tiempo y/o el sitio de liberación del fármaco en comparación con formulaciones convencionales (Aguzzi et al., 2007).

Los sistemas de liberación modificada pueden ser de *liberación retardada*, en los cuales el fármaco se libera después de un cierto tiempo, *liberación extendida o prolongada* donde la disposición de la sustancia se extiende luego de la administración y *liberación de la sustancia activa a un sitio específico* o receptor biológico adecuado (Ding et al., 2002). De esta manera los excipientes de formulaciones farmacéuticas no son sólo sustancias inertes, sino que participan activamente en la modificación y control de la actividad de la droga utilizada.

Los procesos de intercambio iónico se encuentran entre los principales mecanismos de interacción entre fármacos y minerales arcillosos (Vikas et al., 2001). Como se vio en capítulos anteriores, estos minerales son intercambiadores naturales de cationes inorgánicos y pueden también intercambiar cationes orgánicos en solución, donde el grado de ionización de las moléculas determina directamente la interacción con las esmectitas (Castela-Papin et al., 1999). Los minerales arcillosos, especialmente montmorillonita y saponita son los más comúnmente utilizados debido a que presentan mayores capacidades de intercambio catiónico que otros silicatos utilizados en formulaciones farmacéuticas como talco, caolinita y minerales arcillosos fibrosos (Aguzzi et al., 2007).

Los minerales arcillosos son utilizados en sistemas de liberación extendida debido a la amplia variedad de mecanismos de interacción entre moléculas orgánicas y el mineral y a la capacidad de hinchamiento de estos adsorbentes (Forni et al., 1986; Forni et al., 1989; El-Sayed et al., 1993). Caolinita y minerales arcillosos fibrosos son utilizados para prolongar la velocidad de disolución de amilobarbitona y timolol (Delgado et al., 1994; Cerezo et al., 2003).

También se han realizado experiencias *in vivo* con formulaciones basadas en esmectitas. McGinity y Lach (1977) estudiaron la efectividad de complejos anfetamina-montmorillonita en reducir la biodisponibilidad de la droga en

---

---

humanos. [Kahela y Hurmerinta \(1979\)](#) encontraron que la absorción de espironolactona en perros se reduce por administración del complejo con bentonita.

Muestras de montmorillonitas patagónicas fueron calcinadas, pulverizadas mecánicamente e intercambiadas con iones  $Ag^+$ ; estos materiales mostraron buenas propiedades inhibitorias para *Escherichia coli*, mientras que las muestras naturales o calcinadas no presentaron actividad antibacteriana ([Magaña et al., 2008](#)). [Dizman et al. \(2007\)](#) y [Malachová et al. \(2009\)](#) prepararon montmorillonitas y fluoromicas intercaladas con compuestos orgánicos con efectos antibacterianos como compuestos de cetilpiridinio, cetiltrimetilamonio y norfloxacina. Las montmorillonitas tratadas mostraron excelente actividad antibacteriana. No existen en la literatura antecedentes sobre la actividad antimicrobiana de complejos de tetraciclina y minociclina con montmorillonita.

Para conocer los aspectos físico-químicos de la formación de complejos principio activo-mineral y la posible orientación y conformación del catión orgánico sobre la superficie se recurre a diferentes métodos espectroscópicos ([Sevim y Tanil, 2005](#)), difracción de rayos X ([Fejér et al., 2001](#)) y análisis térmico ([Porubcan et al., 1978](#)). Muchos de estos métodos ya han sido explicados y aplicados en los capítulos anteriores de este trabajo de tesis. Recientemente también han sido introducidas otras técnicas como el modelado molecular ([Rytwo et al., 2002](#)).

## **5.2 Susceptibilidad de bacterias a los agentes antimicrobianos.**

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, natural o sintético, que mata microorganismos o inhibe su crecimiento. Los agentes que matan microorganismos son los bactericidas, fungicidas y virucidas; mientras que los agentes que inhiben el crecimiento son los agentes bacteriostáticos, fungistáticos y virustáticos.

Aquellos agentes antimicrobianos que tienen toxicidad selectiva son especialmente útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas porque pueden matar el agente etiológico sin dañar al hospedador.

---

Los antibióticos son compuestos químicos producidos por microorganismos, que inhiben o matan a otros microorganismos. Constituyen una de las clases más importantes de sustancias producidas por procesos microbianos a gran escala (Madigan et al., 2004). Los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos pueden agruparse según su estructura química o su mecanismo de acción, por ejemplo frente a la pared celular, como la vancomicina, la membrana citoplasmática, como las polimixinas, la biosíntesis de proteínas, como las tetraciclinas y la síntesis de ácidos nucleicos, como la rifampicina. En la Tabla 5.1 se presenta el espectro de acción de algunos agentes antibacterianos.

Tabla 5.1.-Espectro de acción antimicrobiana de agentes quimioterapéuticos (Madigan et al., 2004).

Eucariotas	Bacterias			Bacterias parásitos estrictos		Virus	
Hongos	Micobacterias	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram positivas	Clamidias	Rickettsias	Virus RNA	Virus DNA
<b>AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS</b>							
azoles	tobramicina	penicilinas		inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos			
cicloheximidas	estreptomina		sulfonamidas	inhibidores de la proteasa			
polienos	cefalosporinas		quinolonas	análogos nucleosídicos			
polioxinas	tetraciclina		interferón				
análogos de ácidos nucleicos	isoniazida	polimixinas	vancomicina				

A nivel mundial los antibióticos se utilizan en las prácticas clínicas con mayor frecuencia de lo necesario, este hecho y el incumplimiento de las pautas terapéuticas determinaron en gran medida que la mayoría de los microorganismos patógenos desarrollaran resistencia a algunos de los agentes quimioterapéuticos, desde el comienzo de su uso generalizado en los años 1950 (Smith et al., 2002). Otros usos indiscriminados de antibióticos también contribuyen a la emergencia de cepas resistentes. Por ejemplo, su utilización en



agricultura y ganadería tanto como sustancias que estimulan el crecimiento en la alimentación animal como en la prevención de enfermedades.

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno muy extendido y explica la importancia de la prueba de sensibilidad antibiótica. Estas pruebas, denominadas antibiogramas, ponen de manifiesto la sensibilidad de los microorganismos a determinados antibióticos (Bailey y Scott, 1973).

La actividad antimicrobiana se mide determinando la mínima cantidad necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos en estudio, valor denominado concentración mínima inhibitoria (CMI); otro procedimiento comúnmente utilizado en el estudio de la acción antimicrobiana es el método de difusión en agar. En este método cantidades conocidas del antibiótico se agregan a una superficie de agar inoculada con el microorganismo a estudiar. Durante la incubación el antibiótico difunde disminuyendo su concentración a medida que aumenta la distancia al punto de colocación; se genera así una zona de inhibición a partir del cual los microorganismos se desarrollan. El diámetro de la zona de inhibición es proporcional a la cantidad y eficiencia del antibiótico agregado y depende de su solubilidad, la densidad del inóculo bacteriano, la composición y pH del medio de cultivo, el período de incubación y el coeficiente de difusión del antibiótico (Anderson, 1970). Por lo tanto, dentro de las limitaciones de la prueba, el diámetro de la zona de inhibición representa la susceptibilidad relacionada a un antibiótico determinado y constituye una guía para la terapéutica antimicrobiana.

### **5.3 Experimental:**

#### **5.3.1 Efecto antimicrobiano de tetraciclina y minociclina.**

La actividad antibacteriana de TC, MC y los complejos de adsorción TC-montmorillonita y MC-montmorillonita fueron evaluados por el test de susceptibilidad en medio sólido para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

---

**Preparación de las suspensiones bacterianas:**

El cultivo de *E. coli* fue preparado a partir de estrías en un medio de agar nutritivo. Para tomar una pequeña muestra de bacterias se utilizó un loop estéril. La muestra fue colocada en un tubo que contenía 4 mL de agua destilada estéril, a fin de alcanzar una concentración de  $10^6$  bacterias/mL.

Como prueba de reconocimiento de la cepa de *E. coli* se sembró en medio agar y eosina-azul de metileno (EMD), observándose el brillo metálico característico (Fig.5.1).

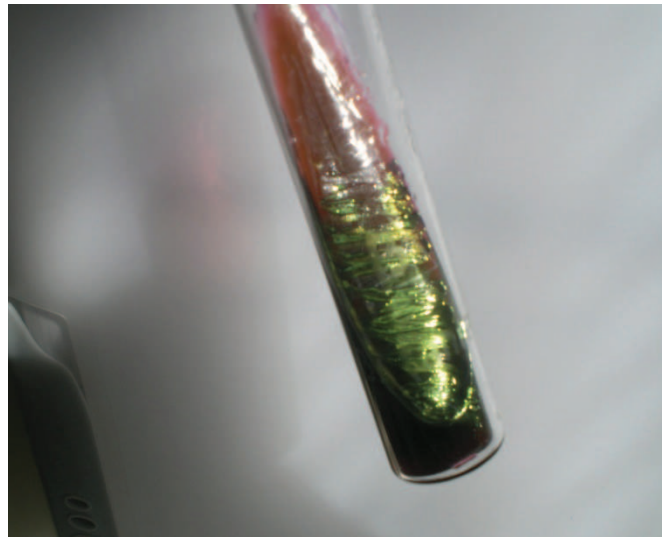


Fig. 5.1.-Prueba de reconocimiento de *Escherichia coli*

**Preparación de las soluciones de tetraciclina y minociclina:**

Para los ensayos microbiológicos se prepararon soluciones de tetraciclina de distintas concentraciones (1,3 mg/mL, 5,3 mg/mL y 10 mg/mL) utilizando agua destilada estéril, en el momento de la determinación. El pH de las soluciones preparadas varió entre 3,75 y 3,95 según la concentración del antibiótico.

---

**Preparación de dispersiones de los complejos de adsorción:**

Se prepararon complejos de adsorción de TC sobre montmorillonita natural con distintas cantidades de TC adsorbida: 76 mmol/100 g (43% TC adsorbida) y 46 mmol/100g (80% TC adsorbida) en tubos plásticos de 250 mL a partir de 22 mL solución stock de TC (2,78 mM) para el sistema de mayor cantidad de TC adsorbida y 6 mL de solución stock de TC para el sistema de menor cantidad adsorbida, posteriormente se agregó 40 mL de las dispersión de montmorillonita natural ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ) y el volumen necesario de solución en agua destilada estéril de NaCl 0,01 M como electrolito para obtener un volumen total de 80 mL. Los tubos se mantuvieron a  $20^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad y agitación constante durante 24 horas. Posteriormente las dispersiones fueron centrifugadas a 8000 rpm ( $10000 \times g$ ) durante 30 minutos y los sobrenadantes fueron separados para ser analizados por espectroscopia UV-vis, a fin de calcular la cantidad de antibiótico retenido al mineral.

Además se preparó, siguiendo el procedimiento detallado anteriormente, un complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica ( $7 \text{ mmolTC}/100\text{g}$ ) a partir de 4 mL de solución stock de TC (2,78 mM). El complejo recuperado, luego de centrifugar el sistema a 8000 rpm ( $10000 \times g$ ) durante 30 minutos, fue suspendido con solución en agua destilada estéril de NaCl 0,01 M para obtener una cantidad de TC total en la dispersión de  $1,33 \text{ mg/mL}$ . Los sistemas fueron preparados por duplicado y sin control de pH.

A fin de evaluar el efecto del lavado de los complejos de adsorción antibiótico-montmorillonita en la actividad antibacteriana, se prepararon los complejos de adsorción TC-montmorillonita natural y TC-montmorillonita cálcica sin control de pH, a partir de 22 mL solución stock de TC (2,78 mM), 40 mL de las dispersión de montmorillonita natural y cálcica ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ) y 18 mL de solución en agua destilada estéril de NaCl 0,01 M como electrolito. Luego del análisis espectroscópico para determinar la cantidad de TC adsorbida, se separaron completamente los sobrenadantes y los complejos de adsorción fueron lavados tres veces poniéndolos en contacto con solución de NaCl 0,01 M en agua estéril y agitando hasta homogeneizar la dispersión. Se centrifugó a 9000 rpm

---

(12678 x g) durante 15 minutos después de cada lavado y luego los complejos de adsorción fueron resuspendidos en solución de NaCl 0,01 M para obtener una cantidad total de los antibióticos en las dispersiones de 1,3 mg/mL. El valor de pH de las dispersiones obtenidas fue aproximadamente 4.

#### **Test de Zona de inhibición (ZOI):**

Se prepararon placas de Petri con 20 mL de medio nutritivo Muller Hinton (infusión de carne: 2,0 g/L, hidrolizado de caseína: 17,5 g/L; almidón: 1,5 g/L; agar-agar: 13,0 g/L) que fueron inoculadas con 0,1 mL de suspensiones bacterianas ( $10^6$  bacteria/mL) de *E. coli* ATCC 25922 y diseminadas utilizando una espátula estéril de Digrafsky. Una vez que los inóculos se secaron, se agregó a la placa de Petri 3  $\mu$ L de las soluciones de antibióticos. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas y luego se midió el diámetro de la zona de inhibición. El proceso fue repetido aplicando a las placas de Petri 3  $\mu$ L de las dispersiones de los complejos de adsorción lavados y sin lavar. Las determinaciones para cada antibiótico y sus complejos de adsorción se llevaron a cabo por duplicado.

Las dispersiones de montmorillonita natural y cálcica ( $900 \text{ mgL}^{-1}$ ) fueron analizadas sobre discos de agar para evaluar posible actividad antibacteriana.

#### **5.3.2 Evolución de los diámetros de inhibición en antibiogramas de tetraciclina y minociclina a lo largo del tiempo.**

El efecto antimicrobiano de tetraciclina y minociclina fue evaluado a lo largo del tiempo (5-192 horas) por el test de susceptibilidad en medio sólido para la cepa *E. coli* ATCC 25922 ( $10^6$  bacterias/mL).

Se prepararon soluciones de TC y MC (65 mg/100 mL) en agua destilada estéril, cuya concentración permita evaluar la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo. En estudios previos se encontró que estas soluciones presentan diámetros de inhibición, a 24 horas de incubación, menores a 2 cm.

Se agregaron 3  $\mu$ L de cada solución a placas de Petri inoculadas, que luego fueron incubadas a 37 °C. Se midieron los diámetros correspondientes a la zona

---

de inhibición de cada antibiótico a distintos tiempos de incubación (5, 24, 48, 120, 168 y 192 h).

Los complejos de adsorción TC-montmorillonita natural (76 mmol TC adsorbida/100g), TC-montmorillonita cálcica (46 mmol TC adsorbida/100g), MC-montmorillonita natural (71 mmol MC adsorbida /100g) y MC-montmorillonita cálcica (68 mmol MC adsorbida/100g) fueron preparados como se indicó anteriormente. Los complejos de adsorción obtenidos luego de centrifugar a 8000 rpm (10000 x g) durante 30 minutos fueron lavados dos veces con solución de NaCl 0,01 M. El complejo lavado fue dispersado en un volumen adecuado de NaCl 0,01M que permita alcanzar una concentración de 65 mg/100 mL de antibiótico en equilibrio con el complejo de adsorción, para lo cual se tuvieron en cuenta los resultados de los estudios de desorción de TC obtenidos a pH 3 y pH 4.

## 5.4 Resultados y Discusión

### Test de Zona de inhibición para soluciones de TC y MC:

En la Fig. 5.2 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad microbiana para TC y MC en solución acuosa a distintas concentraciones.

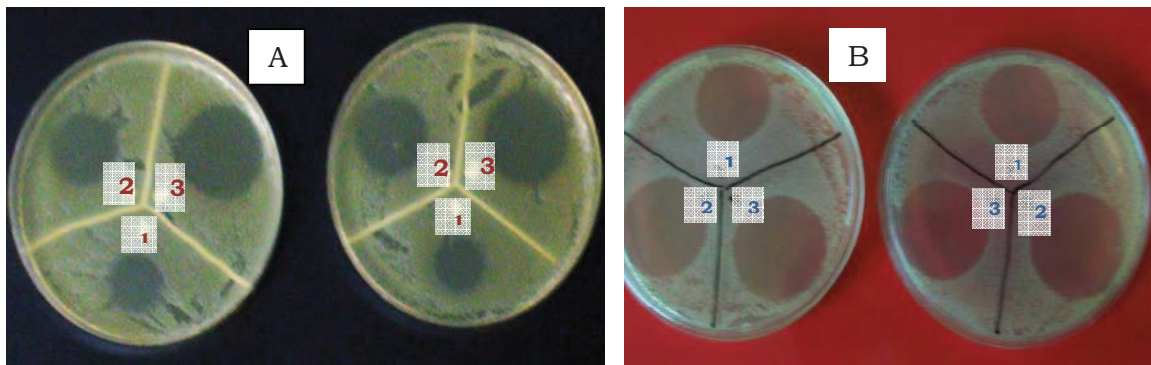


Fig. 5.2.- Test de zona de inhibición correspondientes a soluciones de TC (A) y soluciones de MC (B), a distintas concentraciones: 1: 1,3 mg/mL, 2: 5,3 mg/mL, 3: 10 mg/mL. Se muestran los duplicados obtenidos para cada antibiótico.

Como es de esperar, los diámetros de los halos de inhibición aumentan con la concentración de los antibióticos. Si se comparan los diámetros de inhibición

de soluciones de igual concentración (Tabla 5.2) se puede observar que la MC presenta mayor halo inhibitorio para la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 5.2.- Diámetros de inhibición correspondiente a soluciones acuosas de distinta concentración de TC y MC.

ANTIBIOTICO	SOLUCION (mg/mL)	DIAMETRO DE INHIBICION PROMEDIO (mm)
TETRACICLINA	1,3	20
	5,3	27
	10	29
MINOCICLINA	1,3	26
	5,3	30
	10	32

La solución de TC de menor concentración (1,3 mg/mL) cuyo diámetro inhibitorio es de 20 mm y la solución de MC, de igual concentración, con un halo de 26 mm fueron seleccionadas para preparar las dispersiones de los complejos de adsorción de los antibióticos con el mineral arcilloso.

#### **Test de Zona de inhibición para dispersiones de complejos de adsorción TC-montmorillonita natural:**

El efecto antimicrobiano de los complejos de adsorción de TC-montmorillonita natural para dos cantidades de antibiótico adsorbido: 46 mmol/100 g (44% de la CIC del mineral) y 76 mmol/100g (73% de la CIC del mineral), se observan en la Fig. 5.3.

Tanto para las soluciones de TC como para las dispersiones de los complejos de TC-montmorillonita, la cantidad total de TC presente en las placas es 4 µg. Los diámetros de inhibición de las dispersiones de los complejos de adsorción fueron menores a los obtenidos para la solución de TC. Además, a medida que aumenta la relación TC/montmorillonita, se incrementa considerablemente el diámetro de la zona de inhibición.

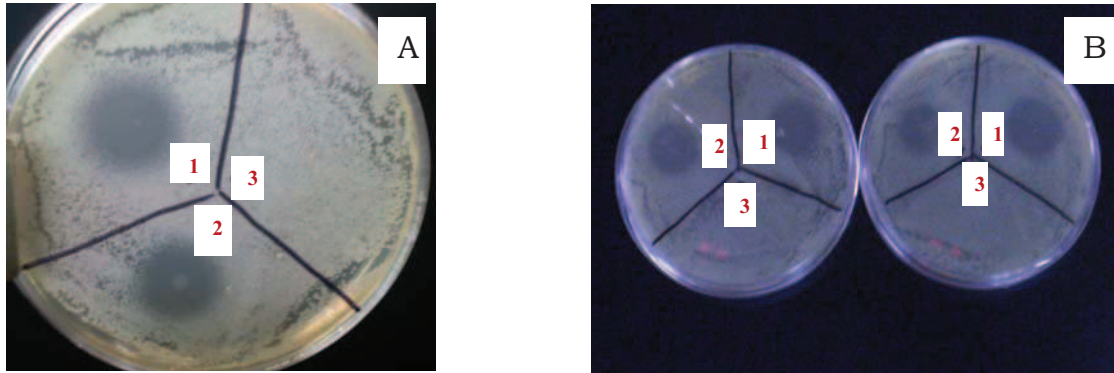


Fig. 5.3.- Test de zona de inhibición correspondientes a:

**A:** 1: solución de TC (1,3 mg/mL); 2: dispersión del complejo de adsorción (46 mmol TC adsorbida/100g) y 3: dispersión de montmorillonita natural.

**B:** 1: solución de TC (1,3 mg/mL); 2: dispersión del complejo de adsorción (76 mmol TC adsorbida/100g) y 3: dispersión de montmorillonita natural. Se muestran los antibiogramas obtenidos por duplicado.

Se obtuvieron diámetros promedio de 14 mm para la dispersión del complejo de menor cantidad de TC adsorbida y 19 mm para la dispersión de mayor cantidad adsorbida. Las dispersiones de montmorillonita natural no mostraron actividad antimicrobiana (Fig. 5.3).

En las zonas inhibitorias correspondientes a los complejos de adsorción de TC con montmorillonita se observó un depósito de mineral en el centro del halo, lugar donde fue colocada la muestra. Estas observaciones indicarían que TC se desorbe de la superficie del mineral, difunde en el medio de cultivo y manifiesta su actividad antimicrobiana. La cantidad de antibiótico que permanece adsorbido al mineral explica los menores halos de inhibición de los complejos de adsorción respecto de las soluciones de antibiótico.

#### **Test de Zona de inhibición para dispersiones de complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica:**

Para comparar la actividad antimicrobiana de TC en presencia de los dos adsorbentes utilizados en el presente estudio, se obtuvieron antibiogramas de TC adsorbida sobre montmorillonita cálcica (Fig. 5.4).



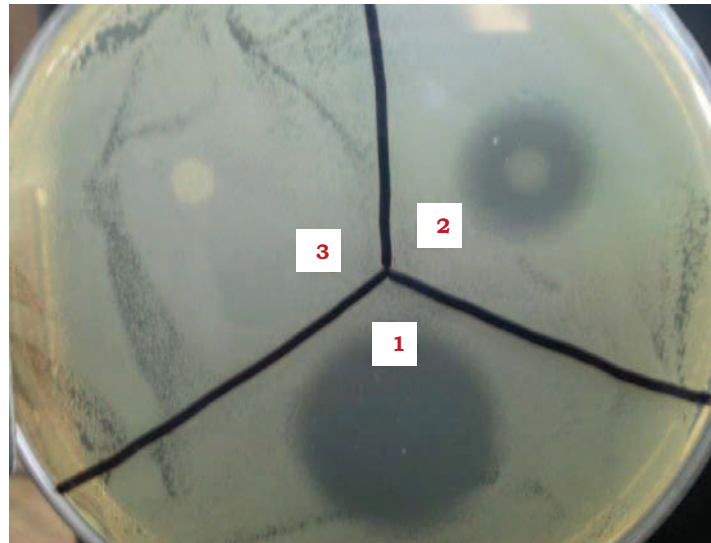


Fig. 5.4.- Test de zona de inhibición correspondientes a: 1: solución de TC (1,3 mg/mL); 2: dispersión del complejo de adsorción (7 mmol TC adsorbida/100g) y 3: dispersión de montmorillonita cálcica.

El complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica presentó un diámetro de inhibición promedio de 13 mm. Se observaron nuevamente los depósitos de montmorillonita cálcica en la zona central de los halos de inhibición.

Se compararon los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas para los complejos TC-montmorillonita cálcica con dos cantidades de TC adsorbida (7 mmol/100g y 76 mmol/100g) y se observó que mientras en el primer caso la zona inhibitoria tiene un diámetro de 13 mm; cuando la cantidad de TC adsorbida es mayor (76 mmol/100g) el diámetro de inhibición correspondiente es de 14 mm, siendo menor al obtenido para la dispersión TC-montmorillonita natural (Tabla 5.3).

Los menores diámetros de inhibición corresponden a los complejos de adsorción TC-montmorillonita cálcica. Los resultados obtenidos sugieren que, además de las fuertes interacciones de TC con el mineral, la disposición y acercamiento de sus capas de montmorillonita cuando  $\text{Ca}^{2+}$  es el catión de intercambio determina las condiciones de difusión de TC.

Existen en la literatura antecedentes sobre la actividad antimicrobiana de TC en sistemas con distintas características físicas. [Bella Cruz et al. \(2008\)](#) encontraron que la actividad antimicrobiana de TC en films de quitosano está determinada por el comportamiento del film en el medio de agar. Prepararon un



sistema de liberación lenta de tetraciclina a partir de un film de quitosano sometido a distintas temperaturas y encontraron actividad antibacteriana durante un tiempo prolongado (mayor a 20 días) para los complejos TC-quitosano. El tratamiento térmico cambia la estructura del film y sus propiedades de hidratación, determinando la disolución de TC y posterior liberación al medio de agar.

**Test de Zona de inhibición para dispersiones de complejos de adsorción TC-montmorillonita lavados con solución de electrolito:**

Para determinar si la actividad antibacteriana del complejo TC-montmorillonita está determinada por la disociación de TC de la superficie del mineral, se compararon los diámetros de inhibición de dispersiones de complejos de adsorción sin lavar y lavados tres veces con solución de electrolito.

El efecto del lavado de los complejos se evaluó para los complejos con mayor cantidad de TC adsorbida (76 mmol/100g). Los resultados obtenidos para los sistemas TC-montmorillonita sódica y TC-montmorillonita cálcica se presentan en la Fig. 5.5, donde se los compara con una solución de TC que presenta la misma cantidad total de TC en las placas (4  $\mu$ g).

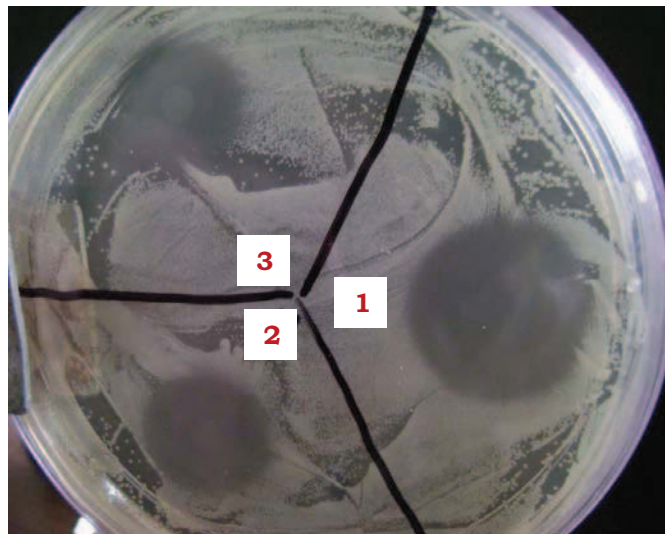


Fig. 5.5.- Test de zona de inhibición correspondientes a: 1: solución de TC (1,3 mg/mL); 2: dispersión del complejo de adsorción TC-montmorillonita natural (76 mmol TC adsorbida/100g) lavado con solución de NaCl y 3: dispersión del complejo de adsorción TC-montmorillonita cálcica (76 mmol TC adsorbida/100g) lavado con solución de NaCl.

Después del lavado, los complejos de adsorción TC-montmorillonita natural y cálcica mantienen la actividad antibacteriana (Tabla 5.3). La zona de inhibición disminuye respecto del complejo sin lavar, lo cual sugiere que la actividad del sistema TC-montmorillonita está dada principalmente por la desorción del antibiótico a la solución.

Tabla 5.3 –Diámetros de inhibición de TC en solución y adsorbida a montmorillonita

SISTEMA	DIAMETROS DE INHIBICION PROMEDIO (mm)
<b>solución TC (1,3 mg/mL)</b>	20,0
<b>TC-montmorillonita Na</b>	18,0
<b>TC-montmorillonita Ca</b>	14,0
<b>TC-montmorillonita Na lavado</b>	13,0
<b>TC-montmorillonita Ca lavado</b>	12,0
<b>dispersión montmorillonita</b>	-

Los resultados obtenidos en los estudios microbiológicos indican que los complejos TC-montmorillonita tienen un buen potencial para su utilización como carriers o reservorios en sistemas de liberación de TC. La TC adsorbida a montmorillonita natural u homoionizada con  $\text{Ca}^{2+}$  presenta buena actividad bacteriostática para la cepa *E. coli* ATCC 25922. La actividad antimicrobiana, determinada por el test de susceptibilidad en medio sólido de difusión en agar, es debida principalmente a la desorción de TC de la superficie del mineral por lo que los diámetros de inhibición para los sistemas de adsorción fueron siempre menores a los correspondientes a la solución de TC.

Similares resultados fueron obtenidos por [Dizman et al. \(2007\)](#) para fluoromicas modificadas orgánicamente y con  $\text{Ag}^+$ , trabajando con cepas de *S.aureus* y *E.coli*. La actividad antimicrobiana observada fue interpretada a partir de dos mecanismos como son la inmovilización de las bacterias en la superficie del mineral y la desorción del agente antibacteriano del complejo con posterior manifestación de su actividad contra las bacterias en suspensión. La afinidad de

las bacterias por la fluoromicas es el resultado de atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas; de ésta manera, el acercamiento de las bacterias a la superficie permite que el agente antibacteriano ejerza su actividad. Este mecanismo fue propuesto por [Herrera et al. \(2000\)](#), quienes observaron las bacterias adheridas a la superficie de montmorillonitas intercambiadas con cationes cetilpiridinio por microscopía electrónica. [Hu y Xia \(2006\)](#) encontraron un aumento en la actividad antibacteriana en montmorillonita intercambiada con  $\text{Cu}^{2+}$  y proponen interacción electrostática entre el catión y grupos funcionales cargados negativamente de lipoproteínas que inmovilizan las bacterias de la cepa de *E. coli* ATCC25922 sobre la superficie del mineral. Concluyeron que la actividad antimicrobiana se localiza fundamentalmente en la superficie de la montmorillonita debido a que no se encontró actividad en los sobrenadantes de los lavados de los complejos de adsorción. El segundo mecanismo donde el agente antibacteriano difunde en el medio de agar fue propuesto para explicar la zona inhibitoria observada en las fluoromicas modificadas. Los mayores diámetros de inhibición encontrados para norfloxacin respectivo de otros agentes antibacterianos fueron interpretados a partir de la facilidad de difusión en el medio del antibiótico y a débiles interacciones a la superficie del mineral.

#### **Evolución de los diámetros de inhibición en antibiogramas de tetraciclina y minociclina a lo largo del tiempo:**

La actividad antimicrobiana de soluciones de TC (65 mg/100mL), MC (65 mg/100mL) y de los complejos de adsorción TC/montmorillonita y MC/montmorillonita fueron determinadas a lo largo del tiempo. En las Fig. 5.6 y 5.7 se presentan los diámetros promedios de inhibición para TC y MC respectivamente.

Los diámetros de las zonas de inhibición de las soluciones de antibióticos y de las dispersiones de los sistemas de adsorción aumentan durante las primeras horas de incubación, alcanzan un valor máximo y luego disminuyen hasta que a partir de las 120 horas permanecen prácticamente constantes.

---

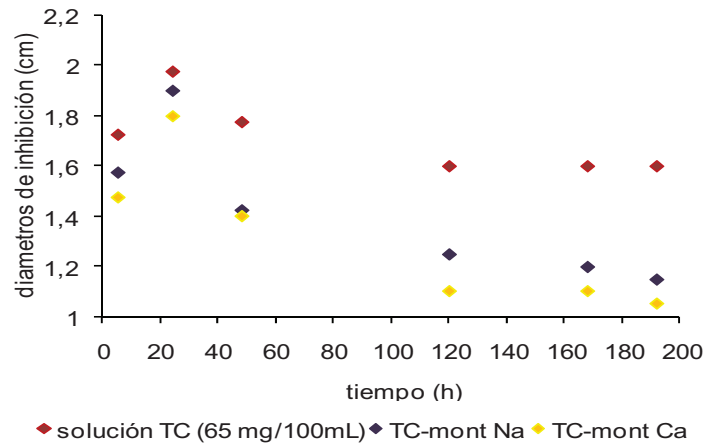


Fig.5.6- Actividad antimicrobiana de TC frente a *Escherichia coli* a lo largo del tiempo.

El máximo diámetro de inhibición fue obtenido a las 24 horas de incubación para las soluciones de TC y MC y las dispersiones de los complejos de adsorción.

En la Fig. 5.6 se observa que a partir de las 24 horas los halos de inhibición disminuyen marcadamente cuando TC se encuentra adsorbida sobre montmorillonita, tanto sódica como cálcica. La menor concentración de antibiótico en los bordes del halo por difusión del antibiótico en el agar, explicaría el crecimiento bacteriano obtenido en las zonas exteriores a partir de las 24 horas y consecuentemente la disminución del diámetro de la zona de inhibición.

Similares variaciones en los diámetros de inhibición a lo largo del tiempo fueron encontrados por [Bella Cruz et al. \(2008\)](#) para la actividad de TC-quitosano contra *Staphylococcus aureus*, donde la marcada disminución de los diámetros de inhibición a partir de las 24 horas es atribuida a una rápida desorción del antibiótico desde la superficie del film.

Teniendo en cuenta que para ésta experiencia y a fin de poder determinar los diámetros inhibitorios a lo largo del tiempo, las dispersiones de los complejos de adsorción fueron preparadas de manera que la concentración de TC en equilibrio con el complejo sea igual a la concentración de las soluciones de TC (65 mg/100mL), el volumen de electrolito que se utilizó para preparar las dispersiones fue menor al correspondiente a las experiencias anteriores, donde se

consideraba la cantidad de TC total en el sistema de adsorción, por lo tanto la concentración de TC en la zona de inhibición sería mayor y consecuentemente la zona de inhibición presenta mayor diámetro que la observada para los complejos TC-montmorillonita natural y cálcica lavados (Tabla 5.3).

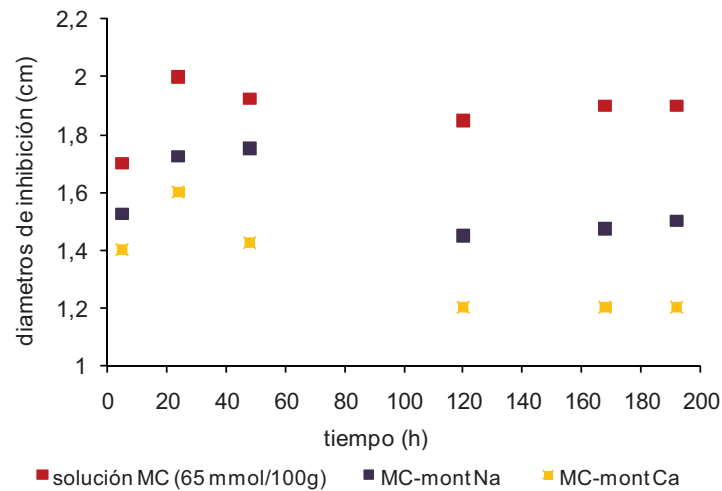


Fig.5.7- Actividad antimicrobiana de MC frente a *Escherichia coli* a lo largo del tiempo.

Para los sistemas de MC, a las 24 horas de incubación se registraron marcadas diferencias en los diámetros de inhibición entre la solución de MC y los complejos de adsorción de 3mm para las dispersiones TC-montmorillonita natural y 4 mm para TC-montmorillonita cálcica. Los diámetros de inhibición a 24 horas de incubación para las dispersiones de los sistemas MC-montmorillonita fueron menores respecto a los obtenidos para TC-montmorillonita (Tabla 5.4).

Tabla 5.4.- Diámetros promedio correspondientes a la zona de inhibición de TC y MC después de 24 horas de incubación.

Muestra	diámetro zona de inhibición (mm)
<b>Solución TC (65 mg/100mL)</b>	<b>18,5</b>
<b>TC-Na montmorillonita (70 mmol/100g)</b>	<b>19,0</b>
<b>TC-Ca montmorillonita (70 mmol/100g)</b>	<b>18,0</b>
<b>Solución MC (65 mg/100mL)</b>	<b>20,0</b>
<b>MC-Na montmorillonita (70 mmol/100g)</b>	<b>17,0</b>
<b>MC-Ca montmorillonita (70 mmol/100g)</b>	<b>16,0</b>

Además, para la solución de MC y los complejos de adsorción MC-montmorillonita se observó una disminución menos marcada en el diámetro de inhibición a partir de 24 horas de incubación (Fig.5.7).

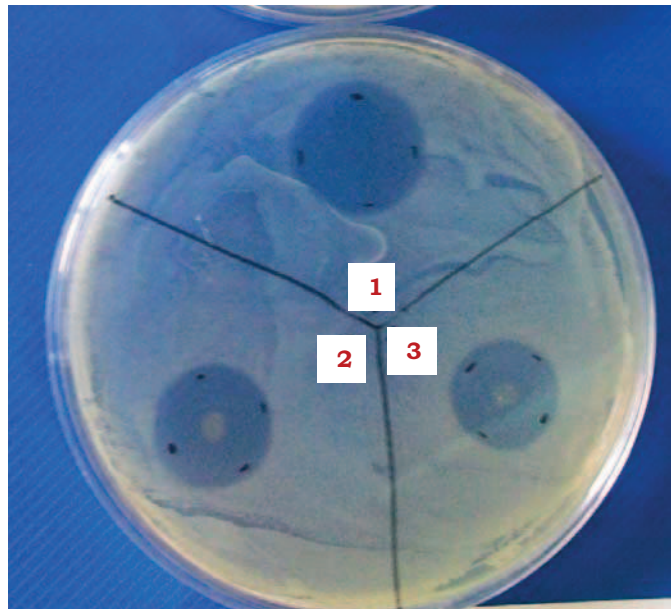


Fig. 5.8.- Test de zona de inhibición correspondientes a: 1: solución MC (65 mg/100mL); 2: dispersión del complejo de adsorción MC-montmorillonita natural (70 mmol MC adsorbida/100g) lavado con solución de NaCl y 3: dispersión del complejo de adsorción MC-montmorillonita cálcica (70 mmol TC adsorbida/100g) lavado con solución de NaCl.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia una mayor afinidad de MC por el mineral arcilloso y distinta velocidad de difusión en agar.

### **5.5 Conclusiones**

La montmorillonita natural, previamente caracterizada como material adecuado para aplicaciones farmacéuticas, y el mineral homoionizado con  $\text{Ca}^{2+}$  no mostraron actividad antibacteriana.

Los complejos de adsorción antibiótico-mineral presentaron zona de inhibición de crecimiento de *E. coli*, por lo que la actividad antibacteriana de TC y MC no se pierde en presencia del mineral.

La actividad de los complejos TC-montmorillonita cálcica y MC-montmorillonita, determinados por el test de zona de inhibición, fueron menores a los correspondientes a TC-montmorillonita natural poniendo de manifiesto que el tipo de interacción antibiótico-mineral determina el diámetro de la zona inhibitoria. El mecanismo responsable de la actividad observada es la desorción del antibiótico y posterior difusión en el medio de cultivo.

La actividad antimicrobiana mostrada por los complejos de adsorción de TC y MC constituyen un campo promisorio de aplicación, en particular para la formulación de productos tópicos.

---

## CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis se estudió la interacción entre un antibiótico (tetraciclina) y un mineral arcilloso de la NorPatagonia Argentina (montmorillonita). Se realizó un estudio estructural utilizando diferentes métodos espectroscópicos, difracción de rayos X y técnicas en “batch” para cuantificar la adsorción bajo diversas condiciones experimentales. Un modelo teórico fue también desarrollado con el objeto de ajustar y explicar los resultados experimentales.

Los resultados obtenidos por espectroscopia óptica, difracción de rayos X y microscopía electrónica contribuyeron al conocimiento de las interacciones químicas entre tetraciclina y montmorillonita. El efecto batocrómico observado en los espectros de absorción UV-vis puede ser explicado a partir de la formación de interacciones puente H entre los grupos -OH de la molécula de tetraciclina y los grupos funcionales de la montmorillonita, como también a un cambio conformacional inducido sobre la superficie del mineral. Una evidencia de que la conformación extendida de TC es promovida por el mineral es el cambio en los valores de elipticidad en la región UV, característico de esta conformación, observado en los espectros de dicroísmo circular para los complejos de adsorción TC-montmorillonita. Otros grupos funcionales polares de TC como -CONH<sub>2</sub> y NHR<sub>3</sub><sup>+</sup> participan en la adsorción según lo indican los cambios observados para las frecuencias de estos grupos en los espectros ATR-FTIR correspondientes a los sistemas TC-montmorillonita, respecto de las soluciones de TC a pH 4,5. A mayores valores de pH se observaron, además, corrimientos a mayores frecuencias de las bandas de los grupos carbonilo que puede ser debida a la protonación del grupo -OH<sub>12</sub> sobre la superficie de la montmorillonita y pérdida de la deslocalización de electrones en el sistema de anillos BCD de la molécula.

A partir de los estudios realizados por espectroscopia UV-vis y dicroísmo circular se puede concluir que el Ca<sup>2+</sup>, como catión de intercambio del mineral, representa un posible sitio de interacción con TC induciendo la deprotonación del grupo -OH<sub>12</sub> de la molécula, lo que produce un mayor efecto batocrómico en el espectro de absorción UV-vis y un efecto Cotton adicional en la región visible.

Los resultados obtenidos por difracción de rayos X y las observaciones correspondientes a microscopía electrónica de los complejos de adsorción TC-montmorillonita demuestran que la adsorción de TC ocurre con intercalación entre las

---



---

capas del mineral. La intercalación de TC produce un aumento en el espaciado basal correspondiente a una monocapa de moléculas que se orientarían de modo que el grupo funcional con carga positiva ( $\text{NHR}_3^+$ ) se encuentre próximo a la superficie del mineral y los grupos con carga negativa alejados del mismo. La ausencia de reflexiones correspondientes a montmorillonita cálcica en los complejos de adsorción indica que los cationes calcio se encuentran interaccionando con TC.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los estudios de adsorción en “batch” ponen en evidencia la participación de interacciones electrostáticas entre el antibiótico y el mineral, principalmente a bajos valores de pH donde prevalecen las especies catiónicas de TC. De acuerdo al modelo propuesto, cada especie de TC y los cationes  $\text{Na}^+$  del electrolito soporte, interaccionan con los sitios del mineral y compiten por ellos. Las constantes de reacción obtenidas demuestran que la afinidad por la montmorillonita está determinada por la existencia de fuerzas de atracción al mineral de diferente magnitud. Además de interacciones electrostáticas, otras interacciones tienen lugar (formación de puente hidrógeno e interacciones de van der Waals), fundamentalmente cuando prevalen las especies zwitteriónicas y aniónicas de TC y explican la mayor afinidad de  $\text{TCH}_3^+$  respecto de  $\text{Na}^+$  por el mineral. La participación del catión calcio como sitio activo en el proceso de adsorción de TC, tiene lugar a través de la formación de complejos superficiales con las especies  $\text{TCH}_2^\pm$  y  $\text{TCH}^-$  que presentan grupos funcionales  $-\text{OH}$  deprotonados que actúan como dadores de electrones. La interacción  $\text{TC}-\text{Ca}^{2+}$  sobre la superficie del mineral permite retener el antibiótico en un intervalo de pH más amplio que para la montmorillonita natural como se observó al analizar el efecto del pH en la adsorción de TC.

La montmorillonita estudiada mostró ser un buen adsorbente de antibióticos de la familia de las tetraciclinas. La optimización del material adsorbente y condiciones de adsorción permiten proponer la retención de antibióticos presentes en sistemas acuosos, utilizando minerales arcillosos de la NorPatagonia Argentina y técnicas simples y de bajo costo. De esta manera los minerales arcillosos regionales, similares al utilizado en el presente estudio, pueden ser aplicados en procesos de descontaminación de sistemas que presentan residuos de antibióticos.

Además, la zona de inhibición de crecimiento de *E. coli* observada en los complejos de adsorción TC-montmorillonita y MC-montmorillonita demuestran la actividad antibacteriana de TC y MC no se pierde en presencia del mineral. Los

---

resultados de los estudios microbiológicos realizados constituyen un nuevo campo de aplicación de las montmorillonitas en la formulación de productos tópicos.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS****INTRODUCCION**

- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36, 22-36.
- Aksu, Z., Tunç, O., 2004. Application of biosorption for penicillin G removal comparison with activated carbon. *Process Biochemistry*, 40, 831-847.
- Bolger, R., 1995. Industrial minerals in pharmaceuticals. *Industrial Minerals*, 52-63.
- Carretero, I., 2002. Clay Minerals and their beneficial effects upon human health. *Applied Clay Science* 21, 155-163.
- Chambers, H.F., 2001. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. En: A.G.Gilman, T.W.Rall, , A.S.Niels, P.Taylor (eds). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8° ed. Mc Graw Hill, New York, 1239-1271.
- Churchman, G., Gates, W., Theng, B., Yuan, G., 2006. Clays and Clay Minerals for Pollution Control. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 625-676.
- Del Pozo, A., 1978. Farmacia Galénica Especial. Tomo 2°. Romargraf, Barcelona, 399 pp.
- Gámiz, E., Linares, J., Delgado, R., 1992. Assessment of two Spanish bentonites for pharmaceutical uses. *Applied Clay Science*, 6, 359-368.
- Grung, M., Kallqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 (2), 328-340.
- Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K., 2001. What do we know about antibiotics in the environment? En: Kümmerer, K. (ed.). *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Verlag.
-

- 
- Lagaly, G., Ogawa, M., Dékány, I., 2006. Clay Mineral Organic Interactions. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 309-377.
- Lombardi, B., Baschini, M., Torres Sánchez, R.M., 2003. Bentonite deposits of Northern Patagonia. *Applied Clay Science*, 22, 309-312.
- López Galindo, A., Viseras, C., 2000. Pharmaceutical applications of fibrous clays (sepiolite and palygorskite) from some circummediterranean deposits. In: Gomes, C.S.F. (Ed), 1st Latin American Clay Conference. Associação portuguesa de Argilas (APA), 1, 258-270.
- Parolo, M. E., Savini, M. C., Vallés, J. M., Baschini, M. T., Avena, M. J., 2008. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. *Applied Clay Science*, 40, 179-186.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-759.
- Vallés, J.M., Impiccini, A., 1999. En: Zappettini, E.O.(Ed), Bentonitas de la Cuenca Neuquina, Río Negro, Neuquén y La Pampa y Depósitos de Bentonitas Terciarias de Zapala y Añelo, Neuquén. *Recursos Minerales de la República Argentina*, Anales 35, 1113-1125 y 1385-1390. Instituto de Geología y Recursos Minerales SEGEMAR, Buenos Aires.
- Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 723-730.

## CAPITULO 1

- Avena, M.J., 2006. Acid-Base Behavior of clay surfaces in aqueous media. En: Taylor y Francis (eds). *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, 17-46.
- Bailey, S.W., 1980. Summary and recommendations of AIPEA nomenclature committee. *Clays and Clay Minerals*, 28, 73-78.
- Baschini, M.T., Giaveno, M.A., Lombardi, M.B., 1999. Coagulación de Minerales Arcillosos: novedosa técnica de evaluación y sus aplicaciones. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 87 N°5/6, 211-217.
-

- 
- Brigatti, M.F., Galan, E., Theng, B.K.G., 2006. Structures and mineralogy of clay minerals. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 19-86.
- Brindley, G.W., Brown, G. (Eds.), 1980. *Crystal Structures of Clay Minerals and their X-ray Identification*. Mineralogical Society, London.
- Carretero, I., 2002. Clay Minerals and their beneficial effects upon human health. *Applied Clay Science* 21, 155-163.
- Celis, R., Hermosín, M.C., Carrizosa, M.J., Cornejo, J., 2002. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2324-2330.
- Chatterjee, A., Iwasaki, T., Ebina, T., Miyamoto, A., 1999. ADFT study on clay-cation-water interaction in montmorillonite and beidellite. *Computational Materials Science* 14, 119-124.
- Cravero, M.F., 1987. Mineralogía y génesis del yacimiento de bentonita "Don Hugo" y su vinculación con los yacimientos del lago Pellegrini. *Revista Asociación Argentina de Minería, Petrología y Sedimentología*, 17, 1-6.
- Dupont, C., Moreno, J.L., Barau, E., Bargaoui, K., Thian, E., Plique, O., 1992. Effect of diosmectite on intestinal permeability changes in acute diarrhea: a double blind placebo-controlled trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 14 (4), 413-419.
- Fahn, R., Schall, N., 1985. Über die Verwendung von Bentoniten in Wasch- und Rein-igungsmitteln. *Tenside Detergents*, 22, 57-61.
- Faisander, K., Pons, C.H., Tchoubar, D., Thomas, F., 1998. Structural organization of Na and K-montmorillonite suspensions in response to osmotic and thermal stresses. *Clays and Clay Minerals*, 46, 636-648.
- Farmer, V.C., 1979. Infrared spectroscopy. En: Van Olphen, H. y Fripiat, J.J. (eds). *Data handbook for clay materials and other non-metallic Minerals*. Pergamon Press, Oxford, UK, 285-337.
- Farmer, V.C., Mortland, M., 1966. Infrared study of the coordination of pyridine and water to exchangeable cations in monomorphonite and saponite. *Journal of Chemical Science*, 344-351.
- Farmer, V.C., Russell, J.D., 1964. The infrared spectra of layer silicates. *Spectrochimica Acta*, 20, 1149-1173.
-

- 
- Gast, R.G., 1977. Surface and colloid chemistry. En: Dixon, J.B., Weed, S.B. (eds). *Minerals in Soil Environments*. Soil Science Society of America, Madison, WI, 27-73.
- Goldstein, J., Muldoon, J., 1977. En: electron and ion probe microanalysis. Plenum Press. Convention, Rockville, MD, 2827-2828.
- Greathouse, J., Spósito, G., 1998. Monte Carlo and molecular dynamics studies of interlayer structure in  $\text{Li}(\text{H}_2\text{O})_3$ -smectites. *The Journal of Physical Chemistry B.*, 102, 2406-2414.
- Harvey, C.C., Lagaly, G., 2006. Conventional Applications. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 501-540.
- Hendricks, S.B., Nelson, R.A., Alexander, L.T., 1940. Hydration mechanism of the clay mineral montmorillonite saturated with various cations. *Journal of the American Chemical Society* 62,1457-1464.
- Hochella, M., White, A., 1990. Mineral-water interface geochemistry. En: Hochella, M y White, A. (eds). *Reviews in Mineralogy*, Washington D.C. Mineralogical Society of America 23, 1-603.
- Impiccini, A., 1993. Los depósitos bentoníticos Cretácicos del Dpto. Añelo, prov. del Neuquén. Geología, mineralogía y aspectos tecnológicos. XII Congreso Geológico Argentino. V: 255-261.
- Impiccini, A., 1995. Mineralogía de la fracción no arcillosa de las bentonitas del Cretácico superior de la región Norpatagonia. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata.
- Iñiguez Rodríguez, A. M., 1972. Estudio Geológico Económico de los yacimientos de bentonitas del lago Pellegrini, Río Negro. Dirección General de Minería. Río Negro.
- Jasmund, K., Lagaly, G., 1993. Tonminerale und Tone. *Struktur, Eigenschaften, Anwendung und Einsatz in Industrie und Umwelt*, Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Jenny, H., Reitemeier, R.F., 1935. Ionic exchange in relation to the stability of colloidal systems. *Journal of Physical Chemistry* 39,593-604.
- Kahn, A.J., 1958. The flocculation of sodium montmorillonite by electrolytes. *Journal of Colloid Science* 13, 51-60.
-

- 
- Lagaly, G., 1993. Surface and Interlayer reactions: bentonites as adsorbents. Clays controlling the environment, 10° International Clays Conference, 137-144.
- Lagaly, G., Fahn, R., 1983. Tone and Tonminerale. En: *Ullman's Encyclopedia of Technical Chemistry*. 4° edición. Verlag Chemie, Weinheim, 23, 311-326.
- Lagaly, G., Ogawa, M., Dékány, I., 2006. Clay Mineral Organic Interactions. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 309-377.
- Lombardi, B., 2004. Caracterización y optimización de montmorillonitas de la Norpatagonia Argentina para su utilización como adsorbentes de pesticidas. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata.
- López-Galindo, A., Viseras, C., 2004. Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. En: Wypych, F y Satyanarayana, K. (Eds). *Clay Surfaces: fundamentals and applications*. Elsevier, Amsterdam, 267-289.
- López-Galindo, A., Viseras Iborra, C. y Cerezo Gonzalez, P., 2006. Las arcillas en farmacia, cosmética y balnearios. En: Suárez, M, Vicente, M.A., Rives, V. y Sánchez, M.J. (Eds). *Materiales Arcillosos: de la Geología a las Nuevas Aplicaciones. XIX Reunión Científica de la Sociedad Española de Arcillas*, Salamanca, 291-307.
- Lyklema, J., 1978. Surface Chemistry of Colloids in Connection with Stability. En: Ives, K.J. (ed.), *The Scientific Basis of Flocculation*, Sijthoff y Noordhoff, The Netherlands, 3-36.
- MacEwan, D.M.C., Wilson, M.J., 1980. Interlayer and intercalation complexes of clay minerals. En: Brindley, G.W., Brown, G.(eds.), *Crystal Structures of Clay Minerals and Their X-ray Identification*. Mineralogical Society, London, 197-248.
- Mascolo, N., Summa, V., Tateo, F., 1999. Characterization of toxic elements in clays for human healing use. *Applied Clay Science*, 15, 491-500.
- Miller, S.E., Low, P.F., 1990. Characterization of the electrical double layer of montmorillonite. *Langmuir*, 6, 572-578.
- Mooney, R.W., Keenan, A.G., Wood, L.A., 1952. Adsorption of water vapor by montmorillonite, II Effect of exchangeable ions and lattices welling as
-

- 
- measured by X-ray diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 74,1371–1374.
- Moore, D.M., Reynolds, R.C., 1997. X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals, 2° edición. Oxford University press, Oxford.
- Murray, H.H., 2000. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. *Applied Clay Science* 17, 207-221.
- Murray, H.H., 2003. Clays in industry. En: Domínguez, E.A. Mas, G.R., Cravero, F. (eds). A clay Odyssey Proceedings of the 12 ° International Clay Conference. Elsevier, Amsterdam, 3-14.
- Norrish, K., 1954. The swelling of montmorillonite. *Discussions of the Faraday Society*, 18,120–133.
- Panpanit, S., Visvanathan, C., 2001. The role of bentonite addition in UF flux enhancement mechanisms for oil/water emulsion. *Journal of Membrane Science*, 184, 59-68.
- Pantanetti, M., dos Santos Afonso, M., Torres Sánchez, R.M., 2008. Modificación de la superficie de montmorillonita para la adsorción de Iprodion, en: Gonzalez, M., Iglesias, E., De Iorio, A.F., Torres, R. (Eds), *La Contaminación en Ibero América: Xenobióticos y metales pesados*, SiFyQA, Salamanca, 139-157.
- Penner, D., Lagaly, G., 2000. Influence of organic and inorganic salts on the aggregation of montmorillonite dispersions. *Clays and Clay Minerals* 48,246–255.
- Ross, S., Morrison, I. D., 1988. *Colloidal Systems and Interfaces*. A Wiley Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York.
- Ruiz-Hitzky, E., Van Meerbeek, A., 2006. Clay Mineral-and Organoclay-polymer nanocomposite. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 583-621.
- Russell, J.D., Fraser, A.R., 1994. Infrared methods. En: Wilson, M.J. (ed.) *Clay mineralogy: Spectroscopic and Chemical determinative methods*. Chapman y Hall, London, 11-67.
- Schoonheydt, R.A. y Johnston, C.T., 2006. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 87-113.
-



- 
- Siguín, D., Ferreira, S., Froufe, L., Garcia, F., 1994. Smectites: The relationship between their properties and isomorphic substitution. *Journal of Materials Science*, 29, 4379-4384.
- Sposito, G., 1992. Diffuse ions swarm near smectite particles. En: Güven, N., Polastro, R.M.(Eds). CMC Workshop Lectures. *Clay-Water Interface and Its Rheological Implications*. The Clay Mineral Society: Boulder, 4, 127-155.
- Sposito, G., 1998. On points of zero charge. *Environmental Science Technology*, 32 (19), 815-2819.
- Stumm, W., 1992. Chemistry of the Solid-Water Interface. Processes at the Mineral-Water and Particle- Water Interface in Natural Systems. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Suquet, H., Iiyama, J.T., Kodama, H., Pezerat, H., 1977. Sythesis and swelling properties of saponite with increasing layer charge. *Clays and Clay Minerals* 25,231-242.
- Suquet, H., Pezerat, H., 1987. Parameters influencing layer stacking types in saponite and vermiculite:a review. *Clays and Clay Minerals* 35,353-362.
- Tournassat, C., Ferrage, E., Poinsignon, C., Charlet, L., 2004. The titration of clay minerals. II. Structure-based model and implications for clay reactivity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 234-246.
- Tournassat, C., Greneche, J.M.,Tisserand, D., Charlet, L., 2004.The titration of clay minerals. I. Discontinuous backtitration technique combined with CEC measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 224-233.
- U.S.Geological Survey. 1984. A Laboratory Manual for X-Ray Powder Diffraction. L.Poppe, V.Paskevich, J. Hathaway and D.Blackwood.
- U.S Pharmacopoeia 27, 2004a. Bentonite. US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, p. 2826.
- U.S Pharmacopoeia 27, 2004b. Purified Bentonite. US Pharmacopoeial.
- Vallés, J.M., 1992. Resultados de los ensayos experimentales efectuados sobre bentonitas de la cuenca sedimentaria Neuquina. IV Congreso Nacional y I Latinoamericano de Geología Económica.
- Vallés, J.M., Giaveno, M.A., 1993.Efectos térmicos sobre bentonitas de la cuenca Neuquina. XII Congreso Geológico Argentino. V: 262-271.
-

- Vallés, J.M., Impiccini, A., 1999. En: Zappettini, E.O. (Ed), Bentonitas de la Cuenca Neuquina, Río Negro, Neuquén y La Pampa y Depósitos de Bentonitas Terciarias de Zapala y Añelo, Neuquén. *Recursos Minerales de la República Argentina*, Anales 35, 1113-1125 y 1385-1390. Instituto de Geología y Recursos Minerales SEGEMAR, Buenos Aires.
- Van Olphen, H., 1969. Thermodynamics of interlayer adsorption of water in clays, II Mag-nesian vermiculite. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Clay Conference, Tokyo. Israel University Press, Jerusalem, 1,649-65.
- Van Rajj, B.; Peech, M., 1972. Electrochemical properties of some oxisols and alfisols of the tropics. *Soil Science Society of America Proceedings*, 36, 587-593.
- Viseras, C., Cultrone, G., Cerezo, P., Aguzzi, C., Baschini, M.T., Vallés, J., López-Galindo, A., 2006. Characterization of northern Patagonian bentonites for pharmaceutical uses. *Applied Clay Science*, 31, 272-281.
- Viseras, C., López-Galindo, A., 1999. Pharmaceutical applications of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Applied Clay Science*, 14 (1-3), 69-82.
- White, G.N., Zelazni, L., 1988. Analysis and implications of the edge structures of dioctahedral phyllosilicates. *Clays and Clay Minerals*, 36 (2), 141-146.

## **CAPITULO 2**

- Addison, J.B., 1984. Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots. *Residue Review*, 92, 1-24.
- Aksu, Z., Tunç, O., 2004. Application of biosorption for penicillin G removal comparison with activated carbon. *Process Biochemistry*, 40, 831-847.
- Ali, S.L., 1984. Tetracycline Hydrochloride. En: Florey, K. (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press, Londres, 13, 597-653.
- Amin, V., Cumming, D.V., Latchman, D., 1996. Over-expression of heat shock protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neuroscience Letters*, 206, 45-48.
- Aronson, 1980; Cardiac glycosides and drugs used in dysrhythmias. *Side Effects of Drugs Annual*, 4, 123-130
-

- Blum, D., Chtarto, A., Tenenbaum, L., Brotchi, J., Levivier, M., 2004. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 17, 359-366.
- Brion, M., Berthon, G., Fourtillan, J.B., 1981. Metal ion---tetracyclines interactions in biological fluids. Potentiometric study of calcium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline and simulation of their distributions under physiological conditions. *Inorganica Chimica Acta*, 55, 47-56.
- Brundula, V., Rewcastle, N. B., Metz, L. M., Bernard, C. C., Yong, V. W., 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 125, 1297-1308.
- Caminati, G., Focardi, C., Gabrielli, G., Gambinossi, F., Mecheri, B., Nocentini, M., Puggelli, M., 2002. Spectroscopic investigation of tetracycline interaction with phospholipid Langmuir-Blodgett films. *Materials Science and Engineering C* 22, 301-305.
- Chambers, H.F., 2001. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. En: Gilman, A.G., Rall, T.W., Niels, A.S., Taylor, P. (eds). *Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8° ed. Mc Graw Hill, New York, 1239-1271.r
- Chartone-Souza, E., Loyola, T.L., Bucciarelli-Rodriguez, M., Menezes, M., Rey, N.A., Pereira-Maia, E.C., 2005. *Synthesis, Characterization of a tetracycline-platinum (II) complex active against resistant bacteria*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 5, 1001-1008.
- Chopra, I., 2001. A broad-spectrum approach to antimicrobials. En: *Trends in Microbiology*, M. Scholar and W.B. Pratt Oxford University Press.
- Colovic, M., Caccia, S., 2003. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *Journal of Chromatography B*, 791, 337-343.
- Dihuidi, K., Roets, E. Hoogmartens, J., Vanderhaeghe, H., 1982. Influence of temperature on the stability of solid tetracycline hydrochloride, measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 246, 350-355.
-

- 
- Duarte, H.A., Carvalho, S., Paniago, E.B., Simas, A.M., 1999. Importance of tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical Science*, 88, 111-120.
- Esposito, E., Cervellati, C.F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., 1997. Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies. *Journal of Microencapsulation*, 14, 175-187.
- Goldstein, J., Muldoon, J., 1977. En: electron and ion probe microanalysis. Plenum Press. Convention, Rockville, MD, 2827-2828.
- Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., Quentin, C., 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas spp.* *Applied Environmental Microbiology*, 66, 125-132.
- Goodson, J.M., Cugini, M.A., Kent, G.C., 1991. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. II. Clinical response. *Journal of Periodontology Research*, 26, 371-377.
- Gringauz, A., 1997. Introduction to medicinal chemistry. 1° ed. Brooklyn (NY): Wiley-VCH. Inc.
- Grung, M., Kallqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 (2), 328-340.
- Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S., Pedersen, J.A., 2007. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, 66, 1494-1501.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, A., Tovar, K., Hillen, W., Saenger, W., 1994. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*, 264, 418-420.
- Hughes, L.J., Stezowski, J.J., Hughes, R.E., 1979. Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. Evidence for the coexistence of the zwitterionic and nonionized forms of the free base in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 101, 7655-7657.
- Jin, L., Amaya-Mazo, X., Apel, M.E., Sankisa, S.S., Johnson, E., Zbyszynska, M.A., Han, A., 2007. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> bind tetracycline with distinct
-

- 
- stoichiometries and linked deprotonation. *Biophysical Chemistry*, 128 (2), 185-196.
- Kanfer, I., Skinner, M.F., Walker, R.B., 1998. Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 812, 25-286.
- Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K., 2001. What do we know about antibiotics in the environment? En: Kümmerer, K. (ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Verlag.
- Lambs, L., Brion, M., Berthon, G., 1984. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 3. Formation of mixed-metal ternary complexes of tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline with calcium and magnesium, and their involvement in the bioavailability of these antibiotics in blood plasma. *Agents and actions*, 14 (5-6), 743-750.
- Lambs, L., Decock-Le Reverend, B., Kozłowski, H., Berthon, G., 1988a. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Circular dichroism spectra of calcium and magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and chlortetracycline and discussion of their binding modes. *Inorganic Chemistry*, 27, 3001-3012.
- Lambs, L., Venturini, M., Decock-Le Reverend, B., Kozłowski, H., Berthon, G., 1988b. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 8. Potentiometric and spectroscopic studies on the formation of Ca(II) and Mg(II) complexes with 4-dedimethylam-tetracycline and 6-desoxy-6-demethyl-tetracycline. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 33, 193-210.
- Lanig, H., Gottschalk, M., Schneider, S., Clark, T., 1999. Conformational analysis of tetracycline using molecular mechanical and semiempirical MO-calulations. *Journal of Molecular Model*, 5, 46-62.
- Leeson, L.J., Krueger, J.E., Nash, R.A., 1963. Concerning the structural assignment of the second and third acidity constants of tetracycline antibiotics, *Tetrahedron Letter*, 4, 1155-1160.
- Mackay, A.A., Canterbury, B., 2005. Oxytetracycline Sorption to Organic Matter by Metal-Bridging. *Journal of Environmental Quality*, 34, 1964-1971.
- Martin, R.B., 1985. En: Siegel, H.(ed.). *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, 19, 20-52.
-

- 
- Martin, S.R., 1979. Equilibrium and kinetic studies on the interaction of tetracyclines with calcium and magnesium. *Biophysical Chemistry* 10, 319-326.
- McCormik, J.R.D., Fox, S.M., Smith, L.L., Bitler, B.A., Reichenthal, J., Origoni, V.E., Muller, W.H., Winterbottom, R., Doerschuk, A.P., 1957. *Journal of American Chemistry Society*, 79, 2849.
- Meyer, M.T., Bumgarner, J.E., Varns, J.L., Daughtridge, J.V., Thurman, E.M., Hostetler, K.A., 2000. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 248, 181-187.
- Mitscher L.A., 1978. En: Marcel Dekkern (ed.). *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. New York, 92-93.
- Mitscher, L.A., Bonacci, A.C., Sokolski, T.D., 1968. Circular Dichroism and Solution Conformation of the Tetracycline Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 78-86.
- Mitscher, L.A., Slater-Eng, B., Sokoloski, T.D., 1972. Circular Dichroism measurements of the tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 66-72.
- Neuvonen, P J., Turakka, H , 1974. Inhibitory effect of various iron salts on the absorption of tetracycline in man. *European journal of clinical pharmacology*, 7 (5), .357-360.
- Newman, E.C., Frank, C.W., 1976. Circular dichroism spectra of tetracycline complexes with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , *Journal of Pharmaceutical Science*, 65, 1728-1732.
- Orti, V., Audran, M., Gilbert, P., Bougard, G., Bressolle, F., 2000. High-performance liquid chromatographic assay for minocycline in human plasma and parotid saliva. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 738, 2, 357-365.
- Pérez-Trallero, E., Iglesias, L., 2003. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21,9, 520-529.
- Qiang, Z., Adams, C., 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*, 38, 2874-2890.
-

- 
- Roberts M.C., 2003. Acquired tetracycline and/or macrolide–lincosamides–streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe*, 9, 63-67.
- Ross, J.I., Snelling, A.M., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Leyden, J.J., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *British Journal of Dermatology*, 144, 339-346.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-759.
- Schach von Wittenau, M., Blackwood, R. K., 1966. Proton magnetic resonance spectra of tetracyclines. *The Journal of organic chemistry*, 31 (2), 613-615.
- Schmitt, M.O., Schneider, S., 2000. Spectroscopic investigation of complexation between various tetracyclines and  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ , *PhysChemComm*, 3, 42-55.
- Smyth, W.F., Jenkins, T.C., Smyth, M.R., Barret, J., Sprake, S., 1978. *Acta Chem Scand.*, B 2, 131-136.
- Søeborg T., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., 2004. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere*, 57, 1515–1524.
- Stezowski, J.J., Prewo, R., 1977. Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 3. The integrity of the conformation of the nonionized free base. *Journal of American Chemical Society*, 99, 1117-1121.
- Stirling, D. P., Khodarahmi, K., Liu, J., McPhail, L. T., McBride, C. B., Steeves, J. D., Ramer, M. S., Tetzlaff, W., 2004. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24 (9), 2182-2190.
- Tikka, T., Fiebich, B. L., Goldsteins, G., Keinänen, R., Koistinaho, J., 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The*
-



- 
- Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21 (8), 2580-2588.
- Tikka, T. M., Koistinaho, J. E., 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *Journal of immunology*, 166 (12), 7527-7533.
- Toyoda, M., Morohashi, M., 1998. An overview of topical antibiotics for acne treatment. *Dermatology*, 196, 130-134.
- Vandekerckhove, B.N., Quirynen, M., van Steenberghe, D. 1997. The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis. *Journal of periodontology*, 68, 353-361.
- Von Dreele, R. B., Hughes, R. E., 1971. Crystal and molecular structure of 5,12a-diacetyloxytetracycline. *Journal of the American Chemical Society*, 93 (26), 7290-7296.
- Weiss, P., Andrews, M., Wright, M., 1957. Solubility of antibiotics in 24 solvents. Use in analysis. *Antibiotics and Chemotherapy*, 7, 374-377.
- Wessels, J. M., Ford, W. E., Szymczak, W., Schneider, S., 1998. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ : A spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry B.*, 102, 9323-9331.
- White, J.P., Cantor, C.R., 1971. Role of magnesium in the binding of tetracycline to *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Molecular Biology*, 58, 397-400.
- Williamson, D.E., Everett, G.W., 1975. A proton nuclear magnetic resonance study of the site of metal binding in tetracycline. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 9, 2397-2407.
- Witte, W., 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279, 996-997.
- Wollemberg, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 723-730.
- Wu, S., Suzuki, Y., Kitada, M., Kataoka, K., Kitaura, M., Chou, H., Nishimura, Y., Ide, C., 2002. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neuroscience Letters*, 318, 81-84.
-



Yang, W., Carlson, K., 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban, and agricultural landscapes. *Water Research*, 37, 4645-4656.

### **CAPITULO 3**

- Bedzyk, M. J., Cheng, L., 2002. X-ray standing wave studies of minerals and mineral surfaces: principles and applications. En: Fenter, P.A., Rivers, M.L., Sturchio, N.C., Sutton, S.R. (eds.), *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science. Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 49, Mineralogical Society of America, Washington, DC, 221-266.
- Bergaya, F., Lagaly, G., 2001. Surface modification of clay minerals. *Applied Clay Science*, 19, 1-3.
- Cai, P. Huang, Q., Zhang, X. 2006. Interactions of DNA with Clay Minerals and Soil Colloidal Particles and Protection against Degradation by DNase. *Environmental Science Technology*, 40, 2971- 2976.
- Caminati, G., Focardi, C., Gabrielli, G., Gambinossi, F., Mecheri, B., Nocentini, M., Puggelli, M., 2002. Spectroscopic investigation of tetracycline interaction with phospholipid Langmuir-Blodgett films. *Materials Science and Engineering C*, 22, 301-305.
- Chang, P., Li, Z., Jiang, W., Jean, J., 2009. Adsorption and intercalation of tetracycline by swelling clay minerals. *Applied Clay Science*, 46, 27-36.
- Cowan C.T., White, D., 1960. Adsorption by organo-clay complexes. *Clay and Clay Minerals*, 9, 458-467.
- Farmer, V.C., 1974. *The Infrared Spectra of Minerals*. Mineralogical Society, London.
- Fenter, P.A., 2002. X-ray reflectivity as a probe of mineral-fluid interfaces: a user guide. En: Fenter, P. A., Rivers, M.L., Sturchio, N.C., Sutton, S.R. (eds.), *Applications of Synchrotron Radiation in Low-temperature Geochemistry and Environmental Science. Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 49. Mineralogical Society of America, Washington, DC, 149-220.
- Goldstein, J. ,Muldoon, J, 1977. En: *electron and ion probe microanalysis*. Plenum Press. Convention, Rockville, MD, 2827-2828.
-

- 
- Jacobs, K.Y., Schoonheydt, R.A., 2001. Time dependence of the spectra of methylene blue clay mineral suspensions. *Langmuir* 17, 5150–5155.
- Jaynes, W.F., Boyd, S.A., 1991. Hydrophobicity of siloxane surfaces in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays and Clay Minerals*, 39, 428–436.
- Johnston, C.T., 1996. Sorption of organic compounds on clay minerals: A surface functional group approach. En: CMS Workshop Lectures, *Organic Pollutants in the Environment*, Sahwney, B., (ed.), 8, The Clay Minerals Society, Boulder.
- Kasha, M. Rawls H. R., El-Bayoumi, M. A., 1965. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*, 11, 371-392.
- Katoh, T., Inagaki, Y., Okazaki, R., 1997. Linear and Stack Oligostreptocyanines. Effects of Relative Orientation of Chromophores on Redox Potentials of Dye Aggregates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 70, 2279-2286.
- Lagaly, G., 1984. Clay–organic interactions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 311, 315–332.
- Lagaly, G., 1993. From clay mineral crystals to colloidal clay mineral dispersions. En: Dobias, B. (ed.), *Coagulation and Flocculation. Theory and Applications*. Marcel Dekker, New York, 427–494.
- Lagaly, G., 2006. Colloid Clay Science. En: Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G. (eds.). *Handbook of Clay Science*. Developments in Clay Science, 5, 141-246.
- Levinson, G. S., Simpson, W. T., Curtius, W., 1957. Electronic Spectra of Pyridocyanine Dyes with Assignments of Transitions. *Journal of American Chemical Society*, 79, 4314-4320.
- Madejová, J., Komadel, P., 2001. Baseline studies of the clay minerals society source clays: Infrared Methods. *Clays and Clay Minerals*, 49, 5, 410-432.
- McBride, M.B., 1994. Organic pollutants in soil. In: *Environmental Chemistry of soil*, Oxford University Press. Oxford., 342-393.
- McRae, E. G. Kasha, M., 1958. Enhancement of Phosphorescence Ability upon Aggregation of Dye Molecules. *Journal of Chemical Physics*, 28, 721-722.
-

- 
- Mishra, A., Behera, R. K., Behera, P. K., Mishra, B. K., Behera, G. B., 2000. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chemical Review* 100, 6,1973 - 2012.
- Mitscher, L.A., 1978. The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics. Marcel Dekker, New York, 92-93.
- Moore, D.M., Reynolds, R.C., 1997. X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals, 2° edición. Oxford University press, Oxford.
- Mortland, M.M., Raman, K.V., 1968. Surface acidity of smectites in relation to hydration, exchangeable cation, and structure. *Clays and Clay Minerals*, 16, 393-398.
- Naka, K., Sato, H., Fujita, T., Iyi, N., Yamagishi, A., 2003. Induction of Circular Dichroism by Coadsorption of Chiral and Achiral Metal Complexes on a Colloidal Clay. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, 8469- 8473.
- Ogram, A. V., Jessup, R. E., Ou, L. T., Rao, P. S., 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Applied and environmental microbiology*, 49 (3), 582-587.
- Parolo, M. E., Savini, M. C., Vallés, J. M., Baschini, M. T., Avena, M. J., 2008. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. *Applied Clay Science*, 40, 179-186.
- Raouf-Colom, J.A., Serratosa, J.M., 1987. Reactions of clays with organic substances. En: Newman, A.C.D. (ed.), *Chemistry of Clays and Clay Minerals*. Mineralogical Society Monograph N° 6. Longman Scientific and Technical, Essex, England, 371-422.
- Reynolds, R.C., 1980. Interstratified Clay Minerals. En: Crystal structures of clay minerals and their X-ray identification. Brindley, G.W. y Brown, G. (eds.). Mineralogical Society Monograph N° 5, 249-303.
- Rhue, R.D., Pennell, K.D., Rao, P.S.C., Reve, W.H., 1989. Competitive adsorption of alkylbenzene and water vapors on predominantly mineral surfaces. *Chemosphere*, 18, 1971-1986.
- Rytwo, G., Serban, C., Nir, S., Margulies, L., 1991. Use of methylene blue and crystal violet for determination of exchangeable cations in montmorillonite. *Clays and Clay Minerals*, 39, 551-555.
-

- 
- Schoonheydt, R.A., Johnston, C.T., 2006. Surface and Interface Chemistry of Clay Minerals. En: Bergaya, F., Theng, B.K. Lagaly, G. (eds). *Handbook of Clay Science*. 1° ed, Elsevier, Oxford, 87-114.
- Slade, P.G., Gates, W.P., 2004. The swelling of HDTMA smectites as influenced by their preparation and layer charges. *Applied Clay Science*, 25, 93-101.
- Smith, R.M., Westlake, J.P., Gill, R., Osselton, M.D., 1992. Retention reproducibility of basic drugs in high-performance liquid chromatography on a silica column with a methanol—high-pH buffer eluent: Changes in selectivity with the age of the stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 592, 85-92.
- Stumm, W., 1992. Chemistry of the Solid-Water Interface. Processes at the Mineral-Water and Particle- Water Interface in Natural Systems. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Theng, B.K.G., 1974. The Chemistry of Clay-Organic Reactions. Wiley, New York.
- Traina, S.J., Chattopadhyay, S., 1996. Apectroscopic Methods for Characterizing surface-sorbed organic contaminants: Applications of optical, electronic measurements. En: CMS Workshop Lectures, *Organic Pollulants in the Environment*, Sahwney, B., (ed.), 8, The Clay Minerals Society, Boulder.
- Vali, H., Köster, H.M., 1986. Expanding behaviour, structural disorder, regular and random irregular interstratification of 2:1 layer-silicates studied by high-resolution images of transmission electron microscopy. *Clay Minerals*, 21, 827-859.
- Yamagishi, A. 1993. En: Tameru, K. (ed.), Dynamic processes on solid surfaces. Plunum Press, New York.
- Yamanaka, S., Kanamaru, K., Koizumi, M., 1974. Role of interlayer cations in the formation of acrylonitrile-montmorillonite complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 78, 42-44.

#### **CAPITULO 4**

---

- Ainsworth, C.C., Zachara, J.M., Schmidt, R.L., 1987. Quinoline sorption on Na-montmorillonite: Contributions of the protonated and neutral species. *Clays and Clay Minerals*, 35, 121-128.
- Allinson, J.D., Brown, D.S., Novo-Gradac, K.J., 1991. MINT-EQA2/PRODEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems: version 3.0 user's manual. Report EPA/600/3-91/021. United States Environmental Protection Agency. Athens, Georgia, USA.
- Appel, C., Ma, L., 2002. Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead sorption in three tropical soils. *Journal of Environmental Quality*, 31, 581-589.
- Barriuso, E., Laird, D.A, Koskinen, W.C., Dowdy, R.H., 1994. Atrazine desorption from smectites. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 1632-1638.
- Browne, J.E., Feldkamp, J.R., White, J.L., Hem, S.L., 1980. Acid-base equilibria of tetracycline in sodium montmorillonite suspensions. *Journal of Pharmaceutical Science*, 69, 811-815.
- Giles, C.H., Smith, D., Huitson, A., 1974. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science*, 47, 3, 755-765.
- Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A., 2007. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, 66, 1494-1501.
- Hamaker, J.W., Thompson, J.M., 1972. Adsorption. En: Goring, C.A.J., Hamaker, J.W (eds.), *Organic chemicals in the soil environment*, Vol. 1. Marcel Dekker, New York.
- Lambs, L., Venturini, M., Decock-Le Reverend, B., Kozolowski, H., Berthon, G., 1988. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 8. Potentiometric and spectroscopic studies on the formation of Ca(II) and Mg(II) complexes with 4-dedimethylam-tetracycline and 6-desoxy-6-demethyl-tetracycline. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 33, 193-210.
- Langmuir, D., 1997. *Aqueous Environmental Geochemistry*. En: McConnin, R. (ed.). Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
-

- 
- Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H., 1982. Environmental behavior of organic compounds. *Handbook of chemical property estimation methods*. New York, Mc Graw Hill.
- Limousin, G., Gaudet, J., Charlet, L., Szenknect, S., Barthes, V., Krimissa, M., 2007. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22, 2, 249-275.
- Mc Bride, M.B., 2000. Chemisorption and precipitation reactions. In: Summer, M.E. (ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, FL, 265-302.
- Mitscher, L.A., Slater-Eng, B., Sokoloski, T.D., 1972. Circular Dichroism measurements of the tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 66-72.
- Morton, J.D., Semrau, J.D., Hayes, K.F., 2001. An x-ray absorption spectroscopy study of the structure and reversibility of copper adsorbed to montmorillonite clay. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 16, 2709-2722.
- Ötoker, H.M., Akme Mehmet-Balcioğlu, I., 2005. Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 122, 251-258.
- Pignatello, J.J., Xing, B., 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science Technology*, 30, 1-11.
- Pongjanyakul, T., Khunawattanakul, W., Puttipipatkachorn, S., 2009. Physicochemical characterizations and release studies of nicotine-magnesium aluminum silicate complexes. *Applied Clay Science*, 44, 242-250.
- Raussell-Colom, J.A., Serratosa, J.M., 1987. Reactions of clays with organic substances. En: Newman, A.C.D. (ed.), *Chemistry of Clays and Clay Minerals*, Mineralogical Society Monograph N° 6. Longman Scientific and Technical, Essex, England, 371-422.
- Rodríguez, E.G., Vazquez, M., Ravina, M.D., 2003. Dynamics of the co-composting of barley waste with liquid poultry manure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 166-172.
-

- Sawhney, B.L., 1996. Kinetics of cesium sorption by clay minerals. *Soil Science Society of America Proceedings*, 30, 565-570.
- Sposito, G., 1984. *The Surface Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New York.
- Strawn, D.G., Sparks, D.L., 1999. Sorption Kinetics of trace elements in soils and soil materials. En: Selim, H.M., Iskandar, I. (eds.), *Fate and Transport of Heavy Metals in the Vadose Zone*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1-28.
- Stumm, W., 1992. *Chemistry of the Solid-Water Interface. Processes at the Mineral-Water and Particle- Water Interface in Natural Systems*. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., New York.

## **CAPITULO 5**

- Anderson, T.G.(1970). Testing of susceptibility to antimicrobial agents and assay of antimicrobial agents in body fluids. En: Blair, J.E. (ed.), *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiologists.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36, 22-36.
- Bailey, R., Scott, E., 1973. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Panamericana, 3° edición.
- Bella Cruz, A., Surdi, M., Cenci, M.M.P., Rodrigues C. A., 2008. Tetracycline Release from Chitosan Films. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 3, 360-363.
- Castela-Papin, N., Cai, S., Vatieer, J., Keller, F., Souleau, C.H., Farinotti, R., 1999. Drug interactions with diosmectite: a study using the artificial stomach-duodenum model. *International Journal of Pharmaceutics*, 182,111-119.
- Cerezo, P., Aguzzi, C., Viseras, C., Cerezo, A., 2003. Caracterización de complejos farmaco-arcilla (timolol-sepiolita). II. Termogravimetría (ATG). Proc. VI Congreso de la sociedad española de farmacia industrial y galénica. Granada (E), February 9-11, 27-29.
-



- Delgado, R., Delgado, G., Ruiz, A., Gallardo, V., Gamiz, E., 1994. The crystallinity and several Spanish kaolins; correlation with sodium amylobarbitone release. *Clay Minerals*, 29, 785–797.
- Ding, X., Alani, A.W.G., Robinson, J.R., 2002. Extended-release and targeted drug delivery systems. En: Troy, D.B. (Ed.), Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21° ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 47, 939–964.
- Dizman, B., Badger, J. C., Elasri, M.O., Mathias, L.J., 2007. Antibacterial fluoromicas: A novel delivery medium. *Applied Clay Science*, 38, 57-63.
- El-Sayed, A.M., Ismael, A.E.M., Assi, A.E., 1993. Dissociation constant of chlordiazepoxide in montmorillonite suspension and its pharmaceutical application for a controlled-release dosage form. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 63, 257–266.
- Fejér, I., Kata, M., Berkesi, O., Dékány, I., 2001. Release of cationic drugs from loaded clay minerals. *Colloid and Polymer Science*, 279, 1177–1182.
- Fejer, I., Kata, M., Eros, I., Berkesi, O., Dekani, I., 2001. Release of cationic drugs from loaded clay minerals. *Colloid and Polymer Science*, 279, 1177.
- Forni, F., Iannuccelli, V., Cameroni, R., Coppi, G., Bernabei, M.T., 1986. Swellable heterogeneous matrixes: physical properties and release mechanisms. *Il Farmaco, Ed. Prat.* 41, 155–164.
- Forni, F., Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M.T., 1989. Effect of montmorillonite on drug release from polymeric matrices. *Archiv der Pharmazie*, 322, 789–793.
- Herrera, P., Burghardt, R.C., Phillips, T.D., 2000. Adsorption of *Salmonella enteritidis* by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays. *Veterinary Microbiology*, 74, 259–272.
- Hu, C.H., Xia, M.S., 2006. Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88. *Applied Clay Science*, 31, 180–184.
- Jain, G.K., Kakkar, A.P., 1992. Interaction study of diazepam with excipients in liquid and solid state. *Indian Drugs*, 29, 545–556.
-



- 
- Jantova, S., Labuda, J., Vollek, V., Zastkova, M., 1997. Antimicrobial effects of the macrocyclic Cu (II)-tetraanhydroaninobenzaldehyde complex. *Folia Microbiologica* 42, 324–326.
- Joshi, G.V., Kevadiya, B.D., Patel, H.A., Bajaj, H.C., Jasra, R.V., 2009. Montmorillonite as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, 374, 53–57.
- Kahela, P., Hurmerinta, T., 1979. Adsorbates of spironolactone and bentonite - biopharmaceutical study in dogs. *Acta Pharmaceutica Fennica*, 88, 155–159.
- Lin, F.H., Lee, Y.H., Jian, C.H., Wong, J.M., Shieh, M.J., Wang, C.Y., 2002. A study of purified montmorillonite intercalated with 5-fluorouracil as drug carrier. *Biomaterials*, 23, 1981.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2004. Brock, Biología de los microorganismos. Pearson Educación, Madrid, pp1096.
- Magaña, S.M, Quintana, P., Aguilar, D.H., Toledo, J.A., Angeles-Chávez, C., Cortés, M.A., León, L., Freile-Pelegrin, Y., López, T., Torres Sánchez, R.M., 2008. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 281, 192–199.
- Malachová, K., Praus, P., Pavlíčková, Z., Turicová, M. 2009. Activity of antibacterial compounds immobilised on montmorillonite. *Applied Clay Science*, 43, 364–368.
- McGinity, J.W., Lach, J.L., 1977. Sustained-release applications of montmorillonite interaction with amphetamine sulphate. *Journal of Pharmaceutical Science*, 66 (1), 63–66.
- Mohanambe, L., Vasudevan, S., 2005. Anionic clays containing anti-inflammatory drug molecules: comparison of molecular dynamics simulation and measurements. *The Journal of Physical Chemistry B* 109, 15651–15658.
- Park, J.K., Choy, Y.B., Oh, J.M., Kim, J.Y., Hwang, S.J., Choy, J.H., 2008. *International Journal of Pharmaceutics*, 359, 198–204.
- Porubcan, L.S., Serna, C.J., White, J.L., Hem, S.L., 1978. Mechanism of adsorption of clindamycin and tetracycline by montmorillonite. *Journal of Pharmaceutical Science*, 67 (8), 1081–1087.
-

- Rytwo, G., Tropp, D., Serban, C., 2002. Adsorption of diquat, paraquat and methyl green on sepiolite: experimental results and model calculations. *Applied Clay Science*, 20, 273–28.
- Sevim, A., Tanil, A., 2005. Study on the interaction of nicotinamide with sepiolite, loughlinite and palygorskite by IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 744–747.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K., Morris, J.G., 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99, 6434–6439.
- Thoma, K., Ullmann, E., Wolfeseder, E., 1966. Effect of adjuvants in the manufacture of pharmaceutical preparations. XII. Drug release from suspensions of colloidal silicic acid, white clay, and talc. *Scientific Pharmaceuticals*, 34 3, 191–202.
- Vatier, J., Harman, A., Castela, N., Droy-Lefaix, M.T., Farinotti, R., 1994. Interactions of cimetidine and ranitidine with aluminum containing antacids and a clay-containing gastric-protective drug in an “artificial stomach-duodenum” model. *Journal of Pharmaceutical Science*, 83,7, 962–966.
- Vikas, A., Raghupathi, K., Sanjay, G., 2001. Ion-exchange resins: carrying drug delivery forward. *DDT*, 6, 17, 905–914.
- Wang, X., Du, Y., Luo, J., 2008. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 19, 065707.
- Zheng, J.P., Luan, L., Wang, H.Y., Xi, L.F., Yao, K.D., 2007. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system. *Applied Clay Science*, 36, 297–301.
- Zhou, Y.H., Xia, M.S., Ye, Y., Hu, C.H., 2004. Antimicrobial ability of Cu<sup>2+</sup>-montmorillonite. *Applied Clay Science*, 27, 215–218.
-