

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA LA
DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE CORROSIÓN**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

PRESENTA

IBI. Sandra Pérez Miranda

DIRECTOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Octubre de 2004

Iztapalapa, D.F. a 22 de Octubre de 2004

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA LA
DEECCIÓN DE INHIBIDORES DE CORROSIÓN**

qué presentó

IBI. Sandra Pérez Miranda

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dra. Natalie Cabirol

Asesor: Dra. Rocío George Téllez

Jurado:

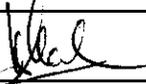
Presidente: Dr. Armando Mejía Álvarez

Secretario: Dra. Natalie Cabirol

Sinodal: Dra. Rocío George Téllez

Sinodal: Dr. Luis Silvestre Zamudio Rivera









“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón de Posgrado del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el No de registro 0471-O”

INDICE

ÍNDICE	i
Abreviaturas, Símbolos y Unidades	v
Figuras	vi
Tablas	vii
Espectros de RMN	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	xi
CAPÍTULO I Revisión Bibliográfica	1
I.1 Corrosión	2
I.1.1 Tipos de Corrosión	3
I.1.2 Protección contra la Corrosión	7
I.2 Inhibidores de Corrosión	8
I.2.1 Inhibidores de origen químico	8
I.2.1.1 Inhibidores inorgánicos	8
I.2.1.2 Inhibidores orgánicos	9
I.2.1.1.1 Imidazolinás	11
I.2.1.2.2 Características espectroscópicas de las	
imidazolinás	13

I.2.2 Inhibidores de origen biológico	14
I.2.2.1 Sideróforos	14
I.2.2.2 Biosíntesis de sideróforos	15
I.2.2.3 Biopelículas y sideróforos como inhibidores	17
I.3 Métodos de detección para sideróforos e inhibidores de corrosión	18
CAPÍTULO II Justificación	21
CAPÍTULO III Objetivos	24
CAPÍTULO IV Materiales y Métodos	26
IV.1 Ensayo Químico	27
IV.1.1 Materiales	27
IV.1.2 Solubilidad y estabilidad de las imidazolininas	28
IV.1.3 Estabilización de la imidazolina hexanoíca	28
IV.1.4 Solubilidad de los precursores amídicos	28
IV.1.5 Coordinación de imidazolina y precursor con la sal Metálica	29
IV.1.6 Barrido Espectrofotométrico	29
IV.2 Ensayo Biológico	30
IV.2.1 Materiales	30
IV.2.2 Microorganismos empleados	33
IV.2.3 Ensayo Biológico Específico	33
IV.2.3.1 Difusión de imidazolina y precursor amídico en concentraciones distintas de medio Fe ³⁺	33

IV.2.3.2 Difusión de imidazolina y precursor amídico en concentraciones distintas de medio Cu^{2+}	33
IV.2.3.3 Cuantificación de Imidazolina en medio sólido	34
IV.2.3.4 Simulación de la biosíntesis de imidazolina (ensayo en cobertera)	34
IV.2.3.5 Ensayo en cobertera para microorganismos productores de inhibidores de corrosión de origen biológico	35
IV.2.4 Ensayo Biológico General	35
IV.2.4.1 Ensayo en cobertera (O-CAS) para microorganismos	36
IV.2.4.2 Ensayo en cobertera (O-CAS) para imidazolina	36
IV.2.4.3 Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas	37
CAPÍTULO V Resultados y Discusión	38
V.1 Ensayo Químico	39
V.1.1 Solubilidad y estabilidad de imidazolinas y precursores amídicos	39
V.1.2 Coordinación de la imidazolina y precursor con sal metálica	39
V.1.3 Barrido espectrofotométrico	40
V.1.4 Discusión	41
V.2 Ensayo Biológico	43
V.2.1 Ensayo Biológico Específico	43
V.2.1.1 Discusión	48

V.2.2 Ensayo Biológico General	48
V.2.2.1 Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas	51
V.2.2.2 Discusión	53
CAPÍTULO VI Conclusiones	55
CAPÍTULO VII Apéndice	57
CAPÍTULO VIII Bibliografía	83

ABREVIATURAS

CAS	cromo azurol S
¹³ C	carbono 13
CDCl₃	cloroformo deuterado
D₂O	agua deuterada
HDTMA	bromuro de hexadeciltrimetil amonio
k_{aff}	constante de afinidad
MilliQ	agua desionizada
RMN	resonancia magnética nuclear
TMS	tetrametilsilano
J	constante de acoplamiento

SÍMBOLOS

Hg	mercurio
δ	partes por millón
λ	lambda
ν	frecuencia

UNIDADES

° C	grado centígrado
Da	Dalton
g	gramo
g/ L	gramo por litro
h	horas
Kcal/mol	kilo calorías por mol
L	litro
lb / in²	libra por pulgada cuadrada
μL	microlitro
M	molar
mg	miligramo
Hz	hertz
MHz	megahertz
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
nm	nanómetros
ppm	partes por millón

FIGURAS

Figura I.1	Espectros de RMN 13C para imidazolina y precursor amídico hexanoíco	13
Figura V.1	Selección de sal de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a distintas concentraciones	44
Figura V.2	Selección de sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a distintas concentraciones	44
Figura V.3	Coloración para imidazolina y precursor amídico en medio Fe^{3+}	45
Figura V.4	Coloración para imidazolina y precursor amídico en medio Cu^{2+}	45
Figura V.5	Simulación de la biosíntesis de imidazolina medio para bacterias	46
Figura V.6	Simulación de la biosíntesis de imidazolina medio para hongos	46
Figura V.7	Ensayo en cobertera para <i>Aspergillus niger</i>	47
Figura V.8	Ensayo en cobertera para <i>Bacillus cereus</i>	47
Figura V.9	Ensayo O-CAS para <i>Aspergillus niger</i>	49
Figura V.10	Ensayo O-CAS para <i>Bacillus cereus</i>	50
Figura V.11	Ensayo O-CAS para imidazolina	50
Figura V.12	Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas	51
Figura V.13	Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas	52
Figura V.14	Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas	52
Figura A-4.1	Barrido espectrofotométrico para la imidazolina hexanoíca.	80
Figura A-4.2	Barrido espectrofotométrico para la sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	80
Figura A-4.3	Barrido espectrofotométrico para el complejo imidazolina- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	81
Figura A-4.4	Barrido espectrofotométrico para la sal $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.	81
Figura A-4.5	Barrido espectrofotométrico para el complejo imidazolina- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.	82
Figura A-4.6	Curva de calibración de imidazolina - $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	82

TABLAS

Tabla V.1	Coloraciones obtenidas para las soluciones de imidazolinas y sales metálicas.	50
Tabla V.2	Barridos espectrofotométricos	51
Tabla A1-1	Elección de la concentración de sal de cobre.	82
Tabla A1-2	Elección de medios de cultivo para crecer microorganismos aislados de agua de mar	83
Tabla A1-3	Modificación de medio CAS (obtención de metodología O-CAS)	83
Tabla A3-1	Señales de RMN ^{13}C para la imidazolina hexanoíca	68
Tabla A3-2	Señales de RMN ^1H para imidazolina hexanoíca	68
Tabla A3-3	Señales de RMN ^{13}C para la imidazolina octanoíca	71
Tabla A3-4	Señales de RMN ^1H para imidazolina octanoíca	71
Tabla A3-5	Señales de RMN ^{13}C para el precursor amídico hexanoíco	74
Tabla A3-6	Señales de RMN ^1H para el precursor amídico hexanoíco	74
Tabla A3-7	Señales de RMN ^{13}C para el precursor amídico octanoíco	77
Tabla A3-8	Señales de RMN ^1H para el precursor amídico octanoíco	77

ESPECTROS DE RMN

Espectro A3-1	RMN ^{13}C para imidazolina hexanoíca en CDCl_3	69
Espectro A3-2	RMN ^1H para imidazolina hexanoíca en CDCl_3	70
Espectro A3-3	RMN ^{13}C para imidazolina octanoíca en CDCl_3	72
Espectro A3-4	RMN ^1H para imidazolina octanoíca en CDCl_3	73
Espectro A3-5	RMN ^{13}C para precursor amídico de imidazolina hexanoíca en CDCl_3	75
Espectro A3-6	RMN ^1H para precursor amídico de imidazolina hexanoíca en CDCl_3	76
Espectro A3-7	RMN ^{13}C para precursor amídico de imidazolina octanoíca. en CDCl_3	78
Espectro A3-8	RMN ^1H para precursor amídico de imidazolina octanoíca en CDCl_3	79

RESUMEN

En la industria del petróleo y del gas la forma generalmente adoptada para combatir la corrosión es el uso de inhibidores de tipo aminas, sales cuaternarias, sales de amonio e imidazolinas, son compuestos químicos que forman películas uniformes que actúan como barreras físicas para reducir las velocidades de corrosión.

El presente trabajo forma parte de un proyecto multidisciplinario cuya meta es realizar un rastreo de poblaciones naturales y/o la biosíntesis dirigida de compuestos con características similares a los inhibidores de corrosión del tipo imidazolina como forma alternativa de obtención de los mismos.

En ésta tesis se realizó el diseño y optimización de un bioensayo específico para la detección de imidazolinas, basándose en la coloración que obtienen éstas al formar enlaces de coordinación con sales metálicas. Ésta característica se utilizó para el diseño de un ensayo, que sirve para detectar las imidazolinas (incluso si fueran producidas por cualquier microorganismo). El ensayo permite además, identificar más de un microorganismo productor al mismo tiempo, debido a que el medio se echa en cobertera. La especificidad de este bioensayo fue probada en microorganismos productores de otros tipos de inhibidores de corrosión (sideróforos).

Por otro lado, se diseñó un método de detección de sideróforos, basado en la metodología del ensayo CAS modificado por Milagres y Machuca en 1999. En el

nuevo método, fácil de usar y rápido, la detección se optimizó modificando la composición del medio y la estrategia de cuantificación. Este método permite la detección de una diversidad de microorganismos productores de compuestos interesantes que podrían tener aplicabilidad como inhibidores de corrosión al mismo tiempo.

ABSTRACT

The approach generally adopted to fight the corrosion in the industry of petroleum and gas is the use of inhibitors of type amines, quaternary salts, ammonium salts and imidazolines. These are chemical compounds that forms uniform films and acts like physical barriers to reduce the speed of corrosion.

The present work is a part of a multidisciplinary project whose goal is to make a screening of natural populations and/or to allow the directed biosynthesis of compounds with similar characteristics to the corrosion inhibitors of the imidazolina type (as a alternative form for obtaining that).

In this thesis it was made the design and optimization of a specific bioassay for the detection of imidazolines, being based on the coloration that obtain these when forming bonds of coordination with metallic salts. This characteristic was used for the design of a test that serves to detect imidazolines (even if they were produced by a microorganism). The test allows, in addition, to identify at the same time more of a producing microorganism, because the medium is applied as a cover. The specificity of this bioassay was proven with other types of corrosion inhibitors (siderophores) producing microorganisms. On the other hand, we designed a method of detection of siderophores, based on the methodology of CAS test modified by Milagres and Machuca in 1999. In the new method, easy to use and quick to realize, we optimized the composition of the medium and the strategy of quantification. This method allows the detection of a diversity of microorganisms producing interesting compound that can have applicability like corrosion inhibitors.

INTRODUCCIÓN

La corrosión se manifiesta en formas multivariadas en nuestros días: desde el color rojizo en puertas y ventanas hasta la que aparece en puentes de concreto, motores, oleoductos y un sinnúmero de materiales, causando pérdidas millonarias a las grandes empresas (Sedriks, 1996). Actualmente el fenómeno de corrosión ha llegado a ser un tema importante industrial y académicamente. La forma más fácil y efectiva para proteger las superficies metálicas contra la corrosión, es el uso de inhibidores (Bouayed *et al.*, 1999).

Un inhibidor de corrosión es aquella sustancia que al agregarse al medio detiene o al menos reduce la velocidad con la que se corroe la superficie. Entre los inhibidores químicos más utilizados por la Industria Petrolera, durante las últimas cinco décadas, se encuentran las imidazolinas. Este tipo de compuestos han mostrado alta eficiencia de inhibición y rentabilidad, en ambientes de ácido sulfhídrico (Zamudio *et al.*, 2002).

Debido a que las imidazolinas y sus respectivos precursores amídicos son sintetizados exclusivamente por métodos químicos (Achenson, 1976), se pretendía realizar la biosíntesis de estos compuestos y/o rastrear poblaciones microbianas que sintetizen nuevos compuestos con características químicas similares e interesantes como inhibidores de corrosión.

Al plantearse este proyecto, nos dimos cuenta de no disponer de un método de detección eficiente para la identificación preliminar de imidazolina durante el

rastreo de posibles poblaciones productoras, por lo que en esta tesis se realizó el diseño de un bioensayo para la detección de inhibidores de corrosión tipo imidazolina, además de haber optimizado un método de detección de sideróforos.

Esta tesis esta dividida en ocho capítulos: el capítulo I corresponde a la Revisión Bibliográfica requerida para el entendimiento de la tesis, como son aspectos generales de corrosión, inhibidores de corrosión (destacando la importancia de las imidazolinas y la existencia de inhibidores de origen biológico), así como también las metodologías descritas para la identificación de los mismos. En el capítulo II y III se presentan la justificación y objetivos planteados. En el capítulo IV se detalla la metodología seguida para la optimización de los ensayos, iniciando con la selección del inhibidor a trabajar hasta la demostración de la especificidad del ensayo para la identificación de imidazolina. En el capítulo V y VI se analizan y discuten los resultados obtenidos, llegando a concluir de manera general los ensayos realizados. El capítulo VII es un apéndice donde se presentan los análisis estadísticos realizados, un compendio de resonancia magnética nuclear y la metodología seguida para la obtención de los inhibidores de corrosión y su caracterización. Finalmente en el capítulo VIII se muestra la bibliografía consultada.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I

I.1 Corrosión

El término corrosión puede tener varios significados, según la perspectiva en que sea definido. En términos generales, la corrosión puede definirse como la degradación física y química de un material a causa del ambiente que lo rodea, que en general puede ser: agua, aire, CO₂, líquidos orgánicos, sales y SOX (sulfatos que pueden estar en fase gaseosa), entre otros (Sedriks, 1996).

Siempre que la corrosión esté originada por una reacción química, la velocidad a la que tiene lugar dependerá en alguna medida de la temperatura, la salinidad del fluido y las propiedades de los metales en cuestión (Arnold, 1980).

En sistemas acuosos, la corrosión es definida como un proceso electroquímico, donde suceden reacciones de oxidación y reducción, estableciéndose un intercambio de electrones y, consecuentemente, el paso de una corriente eléctrica de componente continua entre un ánodo y un cátodo a través de un medio conductor (al igual que ocurre en una pila galvánica). El estudio de esta corriente eléctrica, a partir de análisis comparativos entre las distintos componentes en condiciones estándares, permite conocer la espontaneidad de las reacciones de corrosión y, por tanto, la estabilidad de las fases minerales (Sastri, 1998). En la mayoría de medios naturales, la presencia de agua es un factor destacable. Por tanto, el estudio de los procesos de corrosión naturales deberá centrarse en las reacciones en medios acuosos (Boukhalfa y Crumbliss, 2002).

La corrosión que habitualmente afecta a tuberías y maquinarias se desarrolla en sistemas acuosos y necesita tres condiciones para realizarse espontáneamente: el ánodo, el cátodo y el electrolito (solución acuosa eléctricamente conductora). Si uno de ellos falta, la corrosión se detiene (Sastri, 1998).

La corrosión se desarrolla en las zonas anódicas, mientras que las catódicas permanecen siempre inalteradas: una reacción de oxidación es una reacción anódica, en la cual los electrones son liberados, dirigiéndose a las regiones

catódicas. En la región anódica se produce la disolución del metal (corrosión) mientras que la región catódica no se modifica. La corrosión, además, será tanto mayor cuanto más alta sea la conductividad del electrolito (Arnold, 1980).

I.1.1 Tipos de Corrosión

De acuerdo a la forma en que se corroe el material pueden distinguirse dos amplias categorías; la corrosión intrínseca (ocurre independientemente de la configuración de diseño de ingeniería) y la corrosión extrínseca (se ve afectada por el diseño de ingeniería) (Sastri, 1998).

a) Intrínseca.

1. Corrosión general o uniforme: Es la forma más común de corrosión y se caracteriza porque la reacción química o electroquímica actúa uniformemente sobre toda la superficie del metal. El grosor de la pieza metálica disminuye, apareciendo eventualmente perforaciones y manifestándose finalmente el proceso global como deterioro.
2. Corrosión por picaduras: Este tipo de corrosión es una forma de ataque localizado, que causa la penetración de contaminantes en el metal. Cabe mencionar que esta manifestación de corrosión es una de las más destructivas e insidiosas.
3. Corrosión intergranular: Consiste en el deterioro de una cierta área localizada en los límites o adyacente al grano, mientras que el bulto de los granos sigue siendo en gran parte inafectado.

Esta forma de corrosión se asocia generalmente a efectos químicos de segregación (las impurezas tienden a ser enriquecidas en los límites del grano) o a fases específicas precipitadas en los límites del grano, originando la desintegración de aleaciones y pérdida en la resistencia en los bordes de granos.

4. Corrosión por estrés: Es otro tipo de corrosión localizada y se reconoce por la presencia de fracturas en la superficie metálica. La morfología de este tipo de corrosión es característica: en la superficie del metal se producen fisuras muy pequeñas, de forma ramificada. La cantidad de ramificaciones tiene relación directa con la concentración del medio corrosivo, la temperatura y la cantidad de puntos de esfuerzo del metal, es decir, un domo carecerá de corrosión por estrés, pero un cilindro la presentará.

5. Corrosión microbiológica: Se refiere a la corrosión debida a la presencia y actividades de los microorganismos y/o sus metabolitos. Las bacterias, los hongos y cualquier otro microorganismo son una parte importante en la aparición de corrosión. Esta relación está llegando a ser cada vez más evidente en la mayoría de las aleaciones metálicas (Borestein, 1994).

Ciertos microorganismos prosperan bajo condiciones aeróbicas, mientras que otros lo hacen en condiciones anaeróbicas. Las condiciones anaeróbicas se pueden crear en el régimen microambiental, incluso si las condiciones en general son aeróbicas.

Las condiciones del pH y la disponibilidad de alimentos también desempeñan un papel en la determinación de qué tipo de microorganismos puede prosperar en un ambiente. Los microorganismos se clasifican según el daño de corrosión como:

1. Bacterias anaeróbicas que producen especies altamente corrosivas como parte de su metabolismo, por ejemplo bacterias sulfato reductoras (Kwong *et al.*, 2002).
2. Bacterias aeróbicas que producen ácidos minerales y polisacáridos corrosivos, como bacterias formadoras de lama frecuentes en aguas industriales, que obstruyen tuberías reteniendo materia orgánica para favorecer y estimular la actividad de otras bacterias como las sulfato reductoras (Reddy *et al.*, 1972).
3. Hongos que pueden producir corrosión por los productos de su metabolismo, como los ácidos orgánicos (Sanders y Hamilton, 1986).

b) Extrínseca.

1. Corrosión por grietas: Esta forma de corrosión ocurre por un ataque intenso de agentes corrosivos y se localiza normalmente en grietas expuestas. El proceso se asocia generalmente al estancamiento de pequeños volúmenes de solución causados por perforaciones en juntas, arandelas, cabezas de sujetador, material de aislamiento, cordones de soldadura, defectos superficiales, abrazaderas, etc.

Algunos ejemplos de depósitos en los cuales se produce este tipo de corrosión son arenas, tierra, productos de corrosión y otros sólidos.

2. Corrosión galvánica: Ocurre cuando existe una diferencia de potenciales entre dos metales diferentes inmersos en una solución corrosiva. La diferencia de potenciales produce un flujo de electrones

entre los metales, actuando el metal con menor resistencia a la corrosión como ánodo y el de mayor resistencia a la corrosión como cátodo. Esto significa que uno de los metales acelera el proceso de corrosión en sí mismo, mientras que el otro metal actúa como el cátodo, retardando la corrosión.

3. Corrosión por erosión: consiste en el deterioro acelerado de un metal debido al movimiento relativo de un fluido corrosivo sobre la superficie metálica. El incremento en la turbulencia del fluido causa picaduras en la superficie interna de un tubo lo que ocasiona un incremento en la erosión del mismo.

4. Corrosión por desgaste: se refiere al daño que sufre la superficie metálica al estar en constante movimiento y tener una carga en peso sobre ella. El tipo más común de desgaste se debe a la vibración.

5. Corrosión por fatiga: es el resultado de la acción combinada de un esfuerzo o presión mecánico sobre la superficie y un ambiente corrosivo. El proceso de fatiga causa la ruptura de la película que cubre el acero en aleaciones, por lo que se acelera el proceso de corrosión. La corrosión por fatiga resulta sensible a la concentración de oxígeno, pH, temperatura y composición de la solución.

I.1.2 Protección contra la corrosión

Entre las medidas utilizadas industrialmente para combatir la corrosión están las siguientes:

1. Uso de materiales de gran pureza.
2. Presencia de elementos de adición en aleaciones, por ejemplo acero inoxidable.
3. Aislamiento eléctrico del material. Esto puede lograrse mediante el empleo de pinturas o resinas, depósitos metálicos de espesor suficiente o por aplicación de recubrimientos diversos.
4. Protección catódica. Se consigue cambiando el sentido de la corriente en la pila de corrosión. Conectando eléctricamente el acero con un metal más activo (zinc o magnesio, por ejemplo) podemos llegar a suprimir la corrosión del acero, ya que éste no actuará como ánodo y pasará a comportarse como cátodo, dejando el papel de ánodo al metal más activo (zinc o magnesio, en el ejemplo anterior). Este es el principio de la denominada protección catódica.
5. Polarización del mecanismo electroquímico. Esto se puede lograr eliminando el oxígeno disuelto, mediante la adición en el medio agresivo de ciertas sustancias llamadas inhibidores, las cuales pueden llegar a polarizar uno de los electrodos de la pila de corrosión y por lo tanto, llegar a detener (o cuando menos disminuir) sus efectos.

I.2 Inhibidores de Corrosión

Uno de los métodos más importantes como veíamos en el apartado anterior, para reducir la corrosión es el uso de inhibidores de corrosión. En general, la inhibición de la corrosión representa la reducción de la velocidad de corrosión en el metal por la adición al sistema de un compuesto químico en contacto con la solución. El inhibidor químico puede añadirse en forma líquida, de vapor o en ambas (Sedriks, 1996).

La literatura menciona una vasta cantidad de clasificaciones para los inhibidores de la corrosión, y cada una de ellas es dependiente del área de la ciencia que se encargue de realizarla. Un análisis detallado de estas clasificaciones permite concluir que todas ellas se encuentran mutuamente incluidas entre sí, pero para los fines de este trabajo se utilizará como parámetro el origen de los mismos, es decir, si son sintetizados químicamente o si son sintetizados biológicamente por algún microorganismo.

I.2.1 Inhibidores de origen químico

Estos a su vez se pueden clasificar en inhibidores inorgánicos y orgánicos.

I.2.1.1 Inhibidores inorgánicos

Son compuestos subclasificados en la industria del petróleo como inhibidores de pasivación y de precipitación. Dentro de los inhibidores de pasivación se encuentran los cromatos y fosfatos, compuestos que inhiben las reacciones anódicas. Los inhibidores de

precipitación son iones de óxidos metálicos, algunos ejemplos de éstos son los cromatos, vanadatos y sales de zinc. Estas sustancias forman sales insolubles que se depositan sobre la superficie metálica protegiéndola (Sastri, 1998).

I.2.1.2 Inhibidores orgánicos

Son compuestos conocidos dentro de la industria del petróleo como inhibidores filmicos. Esto se debe a que forman una película protectora sobre la superficie metálica que controla la difusión de los iones corrosivos o moléculas hacia el metal que se desea proteger. Esta clase de inhibidores consiste básicamente de una cabeza o parte polar y de una cola o cadena hidrofóbica.

Como ejemplo de este tipo de compuestos protectores se pueden mencionar a las aminas, amino amidas, imidazolinas, sales cuaternarias de aminas, piridinas y tioles (Graham, 1990).

En los últimos años se han realizado diversos estudios para demostrar que los imidazoles y sus derivados son eficientes inhibidores de corrosión. La corrosión del acero templado se ha probado en diferentes medios y con diferentes sustancias inhibidoras, como benzotriazol, benzimidazol e imidazol.

De esta forma se ha demostrado que dichos compuestos en concentraciones traza son muy eficientes como inhibidores de corrosión. El comportamiento de dichos compuestos resulto ser anódico y la temperatura es un factor importante en el proceso de inhibición de

la corrosión (Subramanyam y Mayanna, 1985). Posteriormente se ha demostrado que los derivados imidazólicos son eficientes inhibidores de corrosión y que la eficiencia como inhibidor de corrosión la proporcionan el par de electrones de los átomos de N (Wang *et al.*, 1999). Enlazado con este trabajo, se ha logrado comprobar que el grupo donador de electrones del anillo de la imidazolina hace que su estructura se comporte como un buen inhibidor de corrosión (Wang *et al.*, 2001).

En otro orden de cosas, se han realizado estudios para determinar tanto el mecanismo de inhibición como el comportamiento de adsorción y desorción de la imidazolina amida en una superficie de acero con una solución de CO₂. Los resultados mostraron que la adsorción de imidazolina amida disminuye la corrosión del acero en ambientes de CO₂, pero que la desorción de la misma no tenía ningún efecto en la inhibición de la corrosión. El incremento de la temperatura también desempeñó un papel importante en los resultados obtenidos (Xueyuan *et al.*, 2001).

Finalmente, se han realizado estudios para demostrar la relación entre la estructura química de siete diferentes imidazolinas nafténicas (cuatro sintetizadas con anillo ciclo hexil y tres con ciclo pentil) y su efectividad anticorrosiva en acero con ambientes de sulfuro de hidrógeno. Se demostró que estos compuestos eran eficientes como inhibidores de corrosión a concentraciones de 25 ppm y que parte de esta eficiencia la proporcionaba la cadena alifática; cuanto más larga es ésta, mayor eficiencia proporciona como inhibidor de corrosión (Szyprowski, 2000).

I.2.1.2.1 Imidazolinas

Los azoles son compuestos heterocíclicos diferentes; el imidazol es un tipo de azol, que se deriva formalmente del grupo pirrol y se forma a partir de la sustitución del grupo =CH- por un átomo de nitrógeno en la posición 3. El nitrógeno del imidazol posee un par de electrones que no contribuyen a la estabilidad del anillo, por lo que pueden servir para enlazarse con otros compuestos.

La basicidad del imidazol es fuerte, con un pK_a de 7. Su forma estable es como sales cristalinas, las cuales se disocian fácilmente con ácidos. Debido a sus características básicas, los imidazoles pueden formar sales con iones metálicos (Paquete, 1968).

Algunas imidazolinas, como el prisco y la privina, son vasodilatadoras y vasoconstrictoras respectivamente; la antistina se usa como antihistamínico. Estos compuestos se consideran como aldehídos cíclicos de amonio y se hidrolizan fácilmente en ácidos. La biotina es una vitamina hidrosoluble que participa en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y purinas. La hidantoína se forma a partir de aminoacetonitrilo y ácido cianídico, mediante ciclación de los mismos.

La hidantoína puede reemplazar acilglicinas en la síntesis de amino y cetoácidos. La alantoína es otro ejemplo de imidazolina, un compuesto relacionado con el ácido úrico (Achenson, 1976).

Las imidazolinas y sus derivados se sintetizan exclusivamente por métodos químicos, usualmente a partir de etilendiaminas y ácidos carboxílicos o sus derivados. No se obtienen mediante reducción o hidrogenación de imidazoles debido a que éstos no se pueden hidrogenar para originar imidazolidinas. La hidrólisis parcial tiene lugar en agua caliente y es completada por álcali (Achenson, 1976).

La obtención de las 1-(2-hidroxietil)-2-alkil-imidazolinas y sus correspondientes precursores amídicos se da a partir de ácidos carboxílicos y del 2-(2-aminoetilamino) etanol. Cada etapa de la síntesis se desarrolla a diferentes temperaturas y es selectiva para el compuesto deseado. En una primera etapa, el ácido se mezcla con la amina generando el carboxilato de amonio. Las otras dos etapas de reacción son procesos endotérmicos donde se genera como subproducto agua (Zamudio *et al.*, 2002).

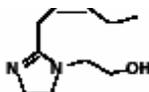
Recientemente se realizó un estudio teórico y experimental para demostrar que el 1-(2-etiloamino)-2-metilimidazolina (imidazolina) es un eficiente inhibidor de corrosión del acero de carbono en medios ácidos, comparándola con la N-[3(2-amino-etilamino-etil)]-acetamida (amida) y 1-(2-etiloamino)-2-metilimidazolidina (imidazolidina). Se demostró que las eficiencias de inhibición, incluyendo las formas protonadas son: imidazolina > amida > imidazolidina. La imidazolidina muestra muy lentas eficiencias de inhibición a grandes concentraciones, siendo capaz de promover la corrosión cuando se encuentra en bajas concentraciones. La razón por la cual la imidazolina es un mejor inhibidor de

corrosión que las otras moléculas relacionadas se debe, entre otras cosas, a la geometría plana que presenta su anillo heterocíclico, el cual favorece la adsorción a través del enlace N=C con la superficie metálica (Cruz *et al.*, 2004).

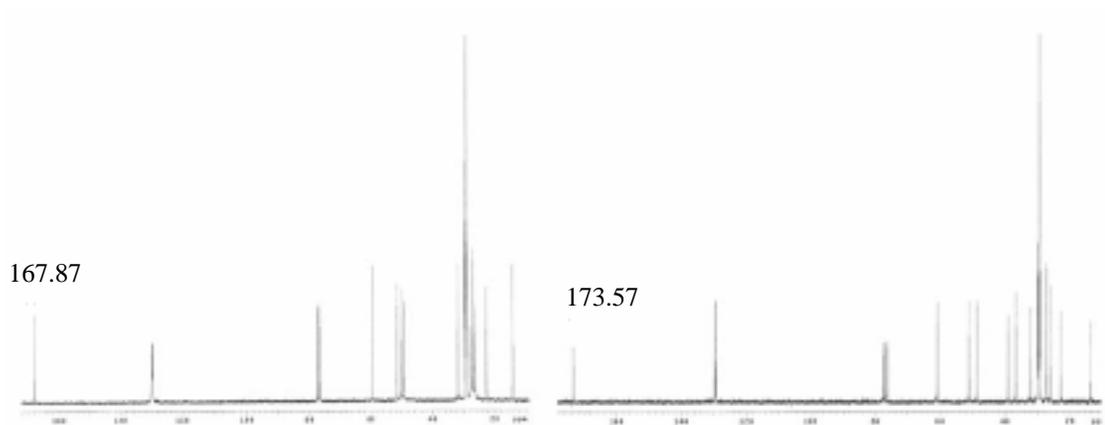
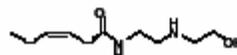
I.2.1.2.2 Características espectroscópicas de las imidazolininas

La asignación de los picos en RMN de ^{13}C en cloroformo deuterado (CDCl_3) para la imidazolina hexanoíca (Figura I.1) y su correspondiente precursor amídico (Figura I.2) es la siguiente. El pico que aparece en el intervalo de 172 a 174 ppm se asigna al carbonilo de la amida, mientras que el pico que aparece en el intervalo de 167 a 169 ppm se asigna al carbono de la imina en la imidazolina.

Figura I.1
Espectro RMN ^{13}C Imidazolina



Espectro RMN ^{13}C precursor amídico



I.2.2 Inhibidores de origen biológico

El hierro es esencial para todos los organismos, éste participa en los principales procesos biológicos como son fotosíntesis, fijación de N₂, metanogénesis, producción y consumo de H₂, respiración, ciclo del ácido cítrico, transporte de oxígeno, regulación de genes y biosíntesis de ADN (Touati, 2000).

Un nivel de al menos 1 mM de hierro es necesario para un crecimiento óptimo del microorganismo. La forma predominante del hierro en la que es relativamente soluble (0.1 M a pH 7) es el estado ferroso y la extremadamente insoluble (10⁻¹⁸ M a pH 7) es la forma férrica (Coward, 2002).

Los organismos pueden llegar a un equilibrio entre la solubilidad del ión férrico y el requerimiento de hierro solubilizándolo a óxido férrico. Esto puede alcanzarse de tres formas: i) disminuyendo el pH externo para hacer el ión férrico más soluble, ii) reduciendo el ión férrico a la forma ferrosa, relativamente soluble; o iii) empleando queladores de hierro como agentes solubilizantes. La quelación y la reducción son las principales aproximaciones que han tenido que adoptar las bacterias (Andrews *et al.*, 2003).

I.2.2.1 Sideróforos

Los sideróforos son agentes quelantes, sintetizados por bacterias y hongos en respuesta a la baja disponibilidad de hierro en el ambiente. Se definen como compuestos microbianos de bajo peso molecular (300 Da a 2000 Da) y se caracterizan por tener un gran afinidad por el ión férrico ($K_{\text{aff}} > 10^{30}$) (Hider, 1984; Pattus y Abdallah, 2000).

Su función es tomar el hierro del ambiente y llevarlo hacia la célula microbiana. Aunque la mayoría de los sideróforos son solubles en agua y son excretados hacia el ambiente, hay algunos que no lo son, como las micobactinas, sintetizadas por micobacterias y que se localizan dentro de la célula. En contraste, las carboximicobactinas y exoquelinas representan sideróforos extracelulares reales del mismo grupo bacteriano (Raymond *et al.*, 1984; Guerinot, 1994). Los sideróforos fúngicos también se pueden dividir en extracelulares e intracelulares, pudiendo encontrarse incluso en esporas y micelio de *Neurospora* y *Aspergillus* (Renshaw *et al.*, 2002). También se han encontrado sideróforos extremadamente lipofílicos en bacterias marinas los cuales no difunden realmente hacia el medio sino que forman vesículas (Guang *et al.*, 2001).

Aunque la distribución de los sideróforos en la naturaleza parece, por lo mencionado hasta ahora, bastante amplia la función de estos compuestos, sin embargo, es transportar hierro hacia el interior celular (Raymond, 1979). Esto ha sido documentado experimentalmente por marcaje radioactivo en una gran variedad de organismos microbianos (Wright *et al.*, 1986).

En general se trata de mecanismos de transporte basados en sistemas no destructivos. Sin embargo, algunos sistemas pueden ser degradados por esterazas después de liberar el ión férrico a las células (Winkelmann, 2002).

I.2.2.2 Biosíntesis de sideróforos

Las vías biosintéticas de los sideróforos están estrechamente conectadas con el metabolismo aeróbico,

involucrando oxígeno molecular como activador por mono-, di- y N-oxigenasas y el uso de ácidos originados al final de la oxidación en el ciclo del ácido cítrico (como son citrato, succinato y acetato). Todos los sideróforos de naturaleza peptídica son sintetizados por sintetazas no ribosomales y en el caso de los sideróforos fúngicos son principalmente construidos a partir de ornitina, un aminoácido no proteínico (Winkelmann, 1992). Así, la síntesis de sideróforos es en gran parte independiente del metabolismo primario (Neilands, 1995).

La mayoría de los sideróforos contienen uno o más de los siguientes ligandos bidentados como bloques de construcción: i) ácido dihidrobenzoico (catecolato) acoplado a un aminoácido; ii) grupos hidroxamato conteniendo N⁵-acil-N⁵-hidroxiornitina o N⁶-acil-N⁶-hidroxilisina; iii) hidroxicarboxilatos compuestos por ácido cítrico o ácido β-hidroxiaspartico (Neilands, 1993; Winkelmann, 2002).

Se han realizado diversos estudios para biosintetizar análogos de sideróforos tipo enterobactina (se sintetizo, por ejemplo, una triserina trilactona) y aerobactina (se sintetizo N⁶-acetil-N⁶-hidroxilisina). En cada biosíntesis se han reducido pasos que llevan a obtener el sideróforo de una forma más simple comparándolo con la producción del mismo por el microorganismo. Del mismo modo, se demostró que estos derivados sintéticos tenían un extraordinario poder como agentes quelantes (Maurer, 1982; Meyer, 1997).

I.2.2.3 Biopelículas y sideróforos como inhibidores

Aunque todas las investigaciones mencionadas en los inhibidores de origen químico se han realizado por medio de técnicas de espectrometría, curvas de polarización, análisis de superficie, espectroscopia fotoelectrónica de rayos X y pérdida de peso, entre otras, también se encuentran antecedentes de investigaciones realizadas desde un punto de vista biológico. En una de ellas se propuso que una biopelícula bacteriana podría funcionar como inhibidor de corrosión, al proteger el acero templado. De esta forma, se incubaron trozos de acero con cepas de *Rhodococcus sp.* y de *Pseudomonas putida*. La biopelícula detuvo la corrosión del acero durante dos semanas, aunque este fue expuesto a un medio altamente corrosivo (Volkland *et al.*, 2001).

Asimismo, se han realizado estudios para determinar la eficiencia de una capa protectora formada por diversas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Desulfovibrio*, las cuales secretan sustancias protectoras al exterior (principalmente polietileno, poliuretano y betún oleoso). Esta capa protectora fue estudiada durante varios días (1, 3, 7, 14 y 21), protegiendo de la corrosión sólo hasta el día 14 (Kopteva *et al.*, 2001).

De igual forma se investigó con *Pseudomonas fluorescens*, la cual fue incubada directamente sobre el acero. La película bacteriana formada disminuyó la corrosión aunque posteriormente se logró confirmar que la bacteria, crecida en un medio deficiente en hierro, produjo sideróforos (enterobactina,

parabactina, aerobactina, rodobactina y ferricromo), los cuales se adsorbieron a la superficie metálica y funcionaron como inhibidores de corrosión (Dubey y Upadhyay, 1999).

También hay estudios sobre el papel de los sideróforos como inhibidores de corrosión eficientes. En ellos se aislaron cuatro sideróforos de bacterias (aerobactina de *Aerobacter aerogenes*, enterobactina de *Escherichia coli*, parabactina de *Paracoccus denitrificans* y ácido rodoturólico de *Rhodotorula rubra*) y se estudiaron como posibles inhibidores de corrosión en medios ácidos. Los sideróforos se sometieron a ambientes de HCl 1 N, obteniéndose con la parabactina un 93% de inhibición durante 15 días, disminuyendo la eficiencia de inhibición en el siguiente orden: enterobactina > aerobactina > ácido rodoturólico (McCafferty y McArdle, 1995).

I.3 Métodos de detección para sideróforos e inhibidores de corrosión.

Para poder detectar este tipo de compuestos se han desarrollado diversos ensayos, basándose en las propiedades químicas (ensayos como el del perclorato férrico, Csáky, Arnow) y en propiedades biológicas o funcionales (ensayo universal CAS y bioensayos); un ensayo positivo no proporciona únicamente la detección del sideróforo, sino que usualmente también da información acerca de la estructura del compuesto.

El ensayo del perclorato férrico es capaz de detectar sideróforos de tipo hidroxamato capaces de formar complejos estables con sales de hierro a pH bajos, puede ser detectado con perclorato férrico en ácido perclórico. Los sideróforos tipos catecol no presentan reacción con este ensayo porque el

hierro se disocia de estos compuestos a pH bajos (Atkin *et al.*, 1970). Recientemente se describió un ensayo, basado en el anterior, para medir la producción de sideróforos producidos por levaduras, importantes para el biocontrol de los tejidos de manzana y pera en poscosecha (Calvente *et al.*, 2001)

El ensayo de Csáky también se utiliza para detectar hidroxamatos, teniendo como ventaja una mayor sensibilidad que la del ensayo de perclorato pero perdiendo la capacidad de poder cuantificar el sideróforo. El ensayo detecta la presencia de hidroxamatos secundarios, dependiendo de la oxidación a nitrito y la formación de un complejo colorido tipo diazonio (Payne, 1994).

El ensayo de Arnow se utiliza para sideróforos de tipo catecolato en cultivos líquidos. Es preferible crecer el microorganismo en un medio mínimo con un nivel de hierro bajo para producir una mayor sensibilidad en la prueba (Arnow, 1937). Basándose en éste ensayo se realizaron diversas investigaciones para detectar sideróforos producidos por especies microbianas fitopatogénicas (Leong y Neilands, 1982) y también para detectar compuestos quelantes y fenolicos de tipo sideróforos aislados de hongos degradadores de maderas (Goodell *et al.*, 1997).

En el ensayo universal cromo azurol S (CAS) se forma un complejo hierro-CAS el cual alcanza una coloración azul. Este complejo forma parte del medio de cultivo, el cual adquiere el mismo color. Cuando los sideróforos son producidos por el microorganismo, éstos obtienen el hierro del medio CAS provocando que cambie de color azul a anaranjado. Este ensayo, sin embargo, muestra eficiencia sólo para la detección de sideróforos producidos por bacterias Gram positivas y resulta ser inhibidor del crecimiento para cualquier otro tipo de microorganismo. La inhibición es debida al bromuro de

hexadeciltrimetil amonio (HDTMA) presente en el medio (Schwyn y Neilands, 1987).

Basándose en el ensayo universal CAS se desarrolló un nuevo método, con la finalidad de evitar la inhibición producida por el HDTMA y permitir la detección de sideróforos producidos por cualquier tipo de microorganismos. Este nuevo estudio consistió en dividir la caja de cultivo en dos partes: en la primera se colocaba agar CAS y en la segunda el medio de cultivo requerido por el microorganismo. Al crecer el microorganismo los sideróforos difunden alcanzando el agar CAS y modificando su color. De esta forma se evita la inhibición del crecimiento y se permite la fácil detección de sideróforos producidos por distintos microorganismos, incluyendo bacterias Gram negativas y hongos. (Milagres & Machuca, 1999). Este ensayo, sin embargo, tiene la desventaja de ser solamente cualitativo.

Los Bioensayos son los ensayos más sensibles para la detección de sideróforos. La especificidad del ensayo es determinada al elegir la cepa indicadora. En general, el indicador es sembrado en el medio de cultivo sólido deficiente de hierro y el compuesto o líquido a probar es colocado en un filtro estéril o dentro de un pocillo hecho en el agar. El tamaño de la zona de crecimiento de la cepa indicadora alrededor del sideróforo debe ser proporcional a la concentración del sideróforo (Sung *et al.*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO II

Una de las preocupaciones más frecuentes en diferentes ramos de la industria es el problema de la corrosión, efecto que ataca a la mayoría de los metales y debilita su estructura (llegando incluso a poner en riesgo a sistemas completos de producción, como ocurre en el caso de las industrias química y petrolera).

Las plantas petroquímicas operan en ambientes (ácido sulfhídrico, cianuro y amoníaco) que son muy agresivos para el acero. Con la oxidación del metal se forma sulfuro de hierro, provocándose simultáneamente ampollas en el metal que con el tiempo se agrietan y se corroen. El camino más fácil y efectivo para frenar la corrosión es la aplicación de inhibidores de corrosión para este tipo de ambientes (Szyprowski, 2000).

En los últimos años, el laboratorio perteneciente al Programa de Ingeniería Molecular del Instituto Mexicano del Petróleo se ha dedicado a diseñar inhibidores de corrosión tipo imidazolina, realizándose diversos estudios para demostrar que éstos y sus correspondientes precursores amídicos son eficientes a este respecto.

En este sentido, se estudio la eficiencia que tienen siete compuestos del tipo 1-(2-hidroxietyl)-2-alkyl-imidazolin y sus correspondientes precursores amídicos como inhibidores de corrosión del acero en ambientes de ácido sulfhídrico. Los resultados mostraron que las 1-(2-hidroxietyl)-2-alkyl-imidazolinas son mejores inhibidores de la corrosión que sus correspondientes precursores amídicos y que la eficiencia de inhibición de la corrosión de ambas familias de compuestos depende

de la longitud de la cadena del grupo alquilo y de la concentración del inhibidor (Zamudio *et al.*, 2000).

El presente trabajo pretende diseñar un método de detección de inhibidores de la corrosión, en general, e imidazolinas, en particular, lo que permitiría buscar microorganismos productores de nuevos compuestos biológicos con actividad interesante en cuanto a su aplicabilidad como inhibidores de corrosión.

Estos estudios, por otro lado, suministrarían una herramienta imprescindible para abordar la posibilidad de biosíntesis de imidazolina, como alternativa a la síntesis de tipo químico que actualmente se emplea.

Constituyen por estas razones, el inicio de un trabajo multidisciplinario con importantes perspectivas desde el punto de vista biotecnológico y de aplicación.

OBJETIVOS

CAPÍTULO III

IV.1 General

Diseñar una estrategia para valorar y cuantificar compuestos tipo imidazolina para su aplicación como inhibidores de corrosión producidos por microorganismos.

IV.2 Particulares

- Seleccionar la sal metálica adecuada así como también la técnica de colorimetría para la detección de la misma sal en medio líquido (ensayo químico).
- Trasladar el ensayo químico a medio sólido (placas de Petri con medio de cultivo).
- Simular la biosíntesis de imidazolina y comprobar la especificidad del ensayo.
- Probar la respuesta del ensayo CAS para imidazolina y para microorganismos productores de sideróforos (*Aspergillus niger* y *Bacillus cereus*).
- Validar el ensayo O-CAS en cepas de laboratorio y en muestras no identificadas.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

CAPÍTULO IV

IV.1 Ensayo Químico

IV.1.1 Materiales

Los siguientes reactivos se obtuvieron de: J.T. Baker

Ácido glicólico	CuCl ₂ .2H ₂ O
Ácido hexanoíco	Etanol
Ácido octanoíco	Hexano
2-(2-aminoetiloamino) etanol	Metanol
Cloroformo	

De SIGMA-ALDRICH QUÍMICA se obtuvieron:

Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HDTMA)
Cromo azurol S (CAS)
FeCl₃.6H₂O

De DIFCO se obtuvo:

Bacto-agar

Medios cobertera Fe³⁺ y Cu²⁺

Preparar una solución stock 1 M de FeCl₃.6H₂O o 1 M de CuCl₂.2H₂O (dependiendo del medio a utilizar).

Preparar agar al 10% y verter la cantidad adecuada de la solución 1 M de sal metálica, según la concentración deseada, sólo cuando la solución de agar tenga una temperatura no superior a 55°C, de lo contrario se inhibe la gelificación del medio.

Imidazolinas y precursores amídicos

Se realizó la síntesis y caracterización de los inhibidores de corrosión (imidazolina hexanoíca, imidazolina octanoíca y sus respectivos precursores amídicos) la metodología empleada y los resultados obtenidos se encuentran en el apéndice A-3. Para poder caracterizar a los compuestos se empleó la resonancia magnética nuclear (RMN), una descripción de los fundamentos de esta herramienta ampliamente utilizada en la elucidación estructural de compuestos se describe en el apéndice A-2.

IV.1.2 Solubilidad y estabilidad de las imidazolinas

Solubilidad. Se pesaron 50 mg de imidazolina y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Se observó la solución formada. Para determinar si la imidazolina era estable en agua se utilizó la RMN de ^1H y ^{13}C , en la forma descrita en el apéndice A-3

IV.1.3 Estabilización de imidazolina hexanoíca

Se utilizó como estabilizador el ácido glicólico. Para ello, se realizó la mezcla de ácido glicólico y la imidazolina en una relación molar 1:1 y se calentó durante una hora en un rango de temperatura de 60°C - 70°C .

IV.1.4 Solubilidad de los precursores amídicos

Se pesaron 50 mg de precursor amídico y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Se observó la solución formada.

IV.1.5 Coordinación de imidazolina y precursor con la sal metálica

Para este ensayo se probaron dos sales metálicas, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que se pesaron en una relación molar 1:1 con la imidazolina. A continuación, se disolvió la sal en 5 mL de agua para obtener una concentración 1 mM de la solución, se observó la coloración. Después se agregó esta solución a la imidazolina gota a gota y también se observó la coloración.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con el precursor amídico correspondiente a cada imidazolina.

IV.1.6 Barrido espectrofotométrico.

Este ensayo nos proporciona una alternativa de detección diferente al color observado para la unión sal-imidazolina. Para realizarlo se prepararon soluciones 1 mM de imidazolina hexanoíca, del $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, del $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y de los complejos imidazolina- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e imidazolina- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Se leyeron las absorbancias, por el método del barrido, en un UV / VIS Spectrometer Lambda 35 Perkin Elmer Instruments para cada una de las soluciones, en un rango de longitud de onda de 200 nm a 900 nm. De esta forma pudo determinarse el máximo de absorción para cada solución.

IV.2 Ensayo Biológico

IV.2.1 Materiales

Medio LA (Miller, 1972).

Es un medio para bacterias.

Para 1 L.

Bacto-triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH. Agregar 20 % de agar y esterilizar a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medio Czapeck.

Medio para hongos.

Para 1 L.

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g

Se añade agua MilliQ hasta 1 L y 2.5 % (p/v) de agar. Se esteriliza a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medio Agar Nutritivo

Medio para bacterias.

Para 1 L

Cloruro sódico	5 g
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g

Se añade agua MilliQ hasta 1 L y 1.5 % (p/v) de agar. Se esteriliza a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medio TSB (Sambrook *et al.*, 2001).

Medio para Bacterias.

Para 1 L.

Peptona de caseína	16 g
NaCl	6 g
Peptona de soya	3 g
Glucosa	2.5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g

Se ajusta el pH a 7. Para uso como medio sólido (Medio TSA) se añaden 20 g de agar. Se esteriliza a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medio Agar de MacConkey

Medio para hongos.

Se suspenden 50 g del medio comercial en 1 L de agua MilliQ. Se mezcla bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme, calentando con agitación durante 1 min. Se esteriliza a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medio CAS (Schwyn *et al.*, 1987)

Medio para detección de sideróforos

Para 1 L.

Cromo azurol S CAS	60.5 mg
HDTMA	72.9 mg
PIPES	30.24 g
1 mM FeCl ₃ .6H ₂ O, 10mM HCl	10 mL
Agarosa	15%

En 50 mL de H₂O MilliQ se disuelve el CAS y se le agregan los 10 mL de FeCl₃.6H₂O. En 40 mL de H₂O MilliQ se disuelve el HDTMA, añadiéndose sobre ésta la solución del CAS lentamente.

En 750 mL de H₂O MilliQ se disuelven los 30.24 g de PIPES y se ajusta el pH a 6.8 con NaOH.

Ambas soluciones se esterilizan por separado a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Tratamiento de los medios

Todos los medios de cultivo fueron desferrados de la siguiente manera:

Se prepara un volumen igual al medio de cultivo que se va a desferrar de una solución al 3% de 8-hidroxiquinoleína en cloroformo. Se mezclan el medio y la solución de 8-hidroxiquinoleína y se mantienen en agitación durante 48 h.

Después de este tiempo, se separan las dos fases y la fase acuosa se lava con volúmenes iguales de cloroformo hasta obtener el medio de cultivo cristalino. Se mantiene a 0° C durante 12 h y posteriormente el medio se esteriliza a 15 lb/in² durante 15 minutos (Cox, 1994).

Tratamiento del material

Todo el material de cristal que se utilizó fue tratado con una solución 6 N de HCl para eliminar el hierro, siendo enjuagado posteriormente con agua MilliQ.

IV.2.2 Microorganismos empleados

Los microorganismos que se utilizaron fueron *Aspergillus niger* y *Bacillus cereus* cepa ATCC 13201, ambos conocidos como productores de sideróforos (Machuca y Milagres, 1999). Los microorganismos fueron conservados en una solución de glicerol al 40% a -20°C .

IV.2.3 Ensayo Biológico Específico

IV.2.3.1 Difusión de imidazolina y precursor amídico en concentraciones distintas de medio Fe^{3+} .

Preparar cajas de Petri con 20 mL de medio Fe^{3+} a las siguientes concentraciones: 1 mM, 5 mM, 10 mM. Esperar a que gelifiquen y realizar cuatro pocillos de 8 mm de diámetro por caja de Petri.

En cada pocillo se colocaron 50 μL de imidazolina y 50 μL de precursor amídico en las siguientes concentraciones: compuesto puro, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , por duplicado. Se usó agua MilliQ como blanco y las cajas control no contuvieron sal de cobre.

IV.2.3.2 Difusión de imidazolina y precursor amídico en concentraciones distintas de medio Cu^{2+} .

Se realizó el mismo procedimiento que en el apartado IV.2.3.1 pero con medio Cu^{2+} .

IV.2.3.3 Cuantificación de imidazolina en medio sólido

La cuantificación de imidazolina en medio sólido se efectuó por medio de una técnica sencilla y rápida que consistió en colocar la imidazolina (dentro de los pocillos realizados al medio Cu^{2+}) en concentraciones fijas y predeterminadas (0.1 M a 1 M). La difusión radial de la imidazolina en el medio Cu^{2+} crea halos concéntricos, como consecuencia del gradiente de concentración formado. La medición de los halos se da en milímetros y corresponde a una concentración específica.

IV.2.3.4 Simulación de la biosíntesis de imidazolina (ensayo en cobertera)

Preparar 100 mL de los medio LA y Czapeck (un medio para bacterias y otro para hongos). Verter en distintas cajas de Petri 20 mL de los medios. Una vez gelificado el medio, colocar 10 μL de la imidazolina seleccionada sobre él, en las siguientes concentraciones: compuesto puro, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Dejar secar la imidazolina y mantener las cajas a 37° C durante 10 min.

Preparar medio Cu^{2+} (10 mM, en función de los datos obtenidos en el apartado IV.2.3.2). Colocar una cobertera de medio Cu^{2+} (3 mL por cada caja) y dejar gelificar.

El ensayo se realizó por duplicado y se utilizó agua MilliQ como blanco. Las cajas control no contuvieron sal de cobre.

IV.2.3.5 Ensayo en cobertera para microorganismos productores de inhibidores de corrosión de origen biológico

Los microorganismos utilizados fueron *Aspergillus niger* y *Bacillus cereus*, los cuales se hicieron crecer en los medios Czapeck y TSA, respectivamente.

Ambos microorganismos se sembraron por picadura en el centro de una caja de Petri y se incubaron a 37° C, de 24 a 48 horas.

Una vez que el microorganismo creció se vertió la cobertera de medio Cu^{2+} sobre él (en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior).

Los microorganismos se sembraron por triplicado y como control se utilizó una caja sin sembrar.

IV.2.4 Ensayo Biológico General

Para confirmar definitivamente que el ensayo biológico es específico para inhibidores tipo imidazolina se requería comprobar, en las condiciones utilizadas, la producción de sideróforos por los microorganismos empleados. Por ello se procedió a realizar un ensayo de detección de sideróforos. Los métodos descritos hasta la fecha presentan una serie de inconvenientes: inhibición del crecimiento, tiempo, crecimiento de un solo microorganismo, entre otros. Por éstas razones se intentó una optimización de los mismos.

IV.2.4.1 Ensayo en cobertera (O-CAS) para microorganismos

Se preparó el medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987) pero se realizaron las siguientes modificaciones: no se utilizó el CAS como medio de cultivo, sino únicamente como medio revelador, vertiéndose una cobertera sobre los microorganismos (de ahí el nombre O-CAS, por "overlayed CAS"). Además, se probó otro agente gelificante, agarosa, y se probaron tres concentraciones distintas de éste, 0.9 % (p/v), 1.1 % (p/v) y 1.3 % (p/v).

El método que se siguió fue similar al empleado en el ensayo cobertera para microorganismos, con el cambio de utilizar medio CAS como cobertera (O-CAS) en lugar del medio Cu^{2+} .

El control fue el medio original de Schwyn con bacto-agar como medio gelificante, a una concentración de 1.5 % (p/v).

IV.2.4.2 Ensayo en cobertera (O-CAS) para imidazolina

Se utilizó básicamente el método seguido en el ensayo en cobertera para imidazolina del ensayo específico. En este caso, sin embargo, en lugar de utilizar medio Cu^{2+} como cobertera se ocupó medio CAS. Las concentraciones de imidazolina que se utilizaron fueron las mismas (compuesto puro a 10^{-5}), por duplicado. Se probaron dos volúmenes más de cobertera (5 mL y 10 mL), aparte de él utilizado de 3 mL. El blanco sigue siendo agua MilliQ .

IV.2.4.3 Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas

Para realizar este experimento se aislaron microorganismos de una muestra de agua de mar (Tecolutla, Veracruz) y se utilizaron también microorganismos no identificados precedentes de las prácticas del Laboratorio de Microbiología General.

Para aislar los microorganismos del mar se utilizaron los medios: Agar Nutritivo + NaCl 0.5 % (p/v), Agar Nutritivo + NaCl 3.0 % (p/v), PDA, Czapeck, TSA y Agar MacConkey (Guang *et al.*, 2001).

Se vertieron 20 mL de cada medio en cajas Petri y se sembraron 200 μ L del agua de mar. Se incubaron las cajas a 28° C y se observó crecimiento de microorganismos a las 24 h. Se realizó la siembra de los microorganismos por triplicado y se utilizó una caja de Petri sin sembrar como control.

Una vez que crecieron los microorganismos se replicaron en medios Czapeck y TSA, se hicieron crecer de nuevo y se vertió la cobertera de medio O-CAS, observándose los cambios de color que aparecieron en el medio. La siembra de microorganismos en todo el ensayo se realizó por triplicado.

Para los microorganismos del laboratorio no identificados se utilizaron únicamente los medios Czapeck y TSA, realizándose el mismo procedimiento que para los microorganismos aislados de agua de mar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO V

V.1 Ensayo Químico.

Este ensayo inicial se realizó para poder disponer de un método seguro que nos permitiera diferenciar entre las imidazolininas y sus precursores amídicos. Los criterios de elección fueron la solubilidad de la imidazolinina sintetizada y la coloración formada con la sal metálica.

Los espectros de caracterización de ambas imidazolininas y precursores amídicos se encuentran en el apéndice A-3.

V.1.1 Solubilidad y estabilidad de imidazolininas y precursores amídicos

Las pruebas de solubilidad que se realizaron para las dos imidazolininas y para los dos precursores dieron como resultado soluciones acuosas de aspecto turbio, en ambos casos, hidrolizándose por completo la imidazolinina hexanoíca después de tres horas. La hidrólisis se confirmó mediante RMN. Por esta razón, la imidazolinina hexanoíca se estabilizó con ácido glicólico comprobándose la solubilidad y estabilidad de la mezcla también por RMN. La imidazolinina octanoíca, por el contrario, fue estable en el agua.

V.1.2 Coordinación de la imidazolinina y precursor con la sal metálica

Al disolver la sal de Fe^{3+} en agua se obtuvo una coloración amarilla. Al mezclar la solución con la imidazolinina hexanoíca se obtuvo un color rojizo, mientras que con el precursor y con la imidazolinina estabilizada se obtuvo el mismo color amarillo. Al mezclar la solución de Fe^{3+} con la imidazolinina octanoíca también se obtiene un color rojizo, mientras que con el precursor se obtiene un color naranja oscuro.

Después de 24 h no se observó precipitación.

Al disolver la sal de Cu^{2+} en agua se obtuvo una solución color azul cielo. Al realizar el acoplamiento con la imidazolina hexanoíca estabilizada se obtuvo el mismo color azul cielo. Al realizar el acoplamiento de la sal con la imidazolina hexanoíca (sin estabilizar) se obtuvo un color verde pastel. Con la imidazolina octanoíca se obtuvo un color verde oscuro. Después de 24 h el Cu^{2+} de la mezcla precipitó. Los colores obtenidos con ambos precursores (el de la imidazolina hexanoíca y el de la octanoíca), al acoplarse con la sal, fueron también azul cielo.

Un resumen de las coloraciones que resultaron se puede apreciar en la siguiente tabla.

Tabla V.1 Coloraciones de las mezclas de imidazolinas y sales metálicas.

Compuesto	Coordinación	
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
H_2O		
Hexanoíca / ác. glicólico		
Hexanoíca		
Precursor H		
Octanoíca		
Precursor O		

V.1.3 Barrido Espectrofotométrico.

Los máximos de absorción de las soluciones analizadas se dieron en diferentes longitudes de onda (Tabla V.2), los barridos espectrofotométricos de cada longitud se muestran en el apéndice A-4:

Tabla V.2 Barridos espectrofotométricos

imidazolina	260 nm
imidazolina - FeCl ₃ .6H ₂ O	230 nm
FeCl ₃ .6H ₂ O	328 nm
Imidazolina - CuCl ₃ .2H ₂ O	725 nm
CuCl ₃ .2H ₂ O	800 nm

Longitudes de onda de máxima absorción para cada solución.

V.1.4 Discusión.

Se buscaba que la imidazolina fuera estable en agua y produjera un color distinto al de su precursor al acoplarse con la sal elegida. Cuanto más larga es la cadena de la imidazolina más estable es, pero sin embargo se vuelve menos soluble en agua.

La imidazolina hexanoíca presentó problemas de estabilidad por lo que se utilizó estabilizada pero no se descartó la posibilidad de utilizarla sin estabilizar debido al tiempo (tres horas) en el que ésta tarda en convertirse en precursor amídico (hidrolizarse).

La estabilidad del compuesto ya no fue un método de selección debido a que ambas imidazolininas ahora eran estables. Sin embargo las pruebas de acoplamiento con la sal de Fe³⁺ mostraron que no existían diferencias entre la coloración provocada por la imidazolina y su precursor (ambos eran amarillos). Al realizar la misma prueba con la imidazolina sin estabilizar se observaron coloraciones distintas entre ésta y el precursor, los colores obtenidos fueron rojizo y amarillo, respectivamente. Los colores

obtenidos para la imidazolina octanoíca y su precursor, por su parte, resultaron muy similares (rojizo y anaranjado oscuro, respectivamente) Tabla V.1.

Las pruebas de acoplamiento con la sal de Cu^{2+} dieron muy buenos resultados, obteniéndose un mayor contraste entre imidazolinas y precursores que con la sal de Fe^{3+} . Para ambas imidazolinas se obtiene un color azul cielo, para el precursor hexanoíco un color verde pastel y para el precursor octanoíco un color verde botella (Tabla V.1).

La disyuntiva entre las dos imidazolinas, una con mejor discriminación de color (hexanoíca sin estabilizar) y otra con mayor estabilidad (la octanoíca) se decantó a favor de la primera, al considerar un criterio más importante el cambio de color que la estabilidad.

Los barridos espectrofotométricos mostraron que tanto los complejos imidazolina- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e imidazolina- $\text{CuCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, la imidazolina y las soluciones $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, presentaban máximos de absorción en diferentes longitudes de onda (Tabla V.2). Dicho parámetro podría proporcionar un método alternativo para la identificación y cuantificación de compuestos tipo imidazolina diferente al cambio de color, en caso necesario.

V.2 Ensayo Biológico.

La realización de este ensayo permitió la fácil y rápida detección de imidazolina, así como se demuestra que la metodología seguida es específica para este tipo de inhibidores. También se desarrollo una modificación al ensayo universal CAS para el rastreo de nuevos sideróforos.

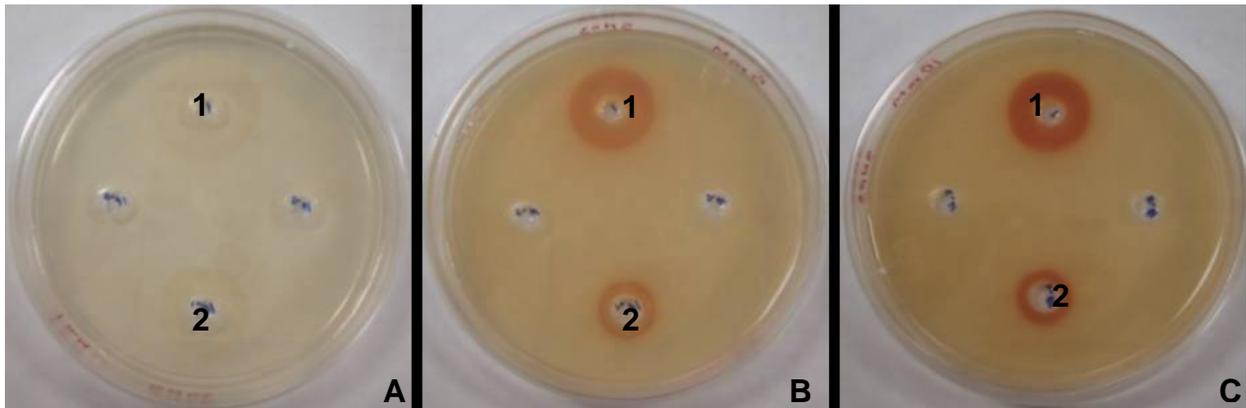
V.2.1 Ensayo Biológico Específico.

En principio, por los datos obtenidos previamente, parecería indistinto utilizar la sal de Fe^{3+} o la de Cu^{2+} , debido a que las dos daban colores distintos al acoplarse con la imidazolina y el precursor. Por ello, en esta primera parte del ensayo se trabaja con ambas sales.

La imidazolina difundió a través de tanto el medio Fe^{3+} como el medio Cu^{2+} , en las tres concentraciones probadas (1 mM, 5 mM y 10 mM), obteniéndose un halo de coloración y tamaño distinto dependiendo de la concentración de la sal: los colores iban entre el amarillo y el anaranjado para el caso del $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Figura V.1) y de transparente a azul cielo para el $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura V.2). La concentración de sal metálica elegida fue 10 MM. El análisis estadístico para elegir la concentración de sal metálica adecuada se presenta en la tabla A1-1 del apéndice A-1.

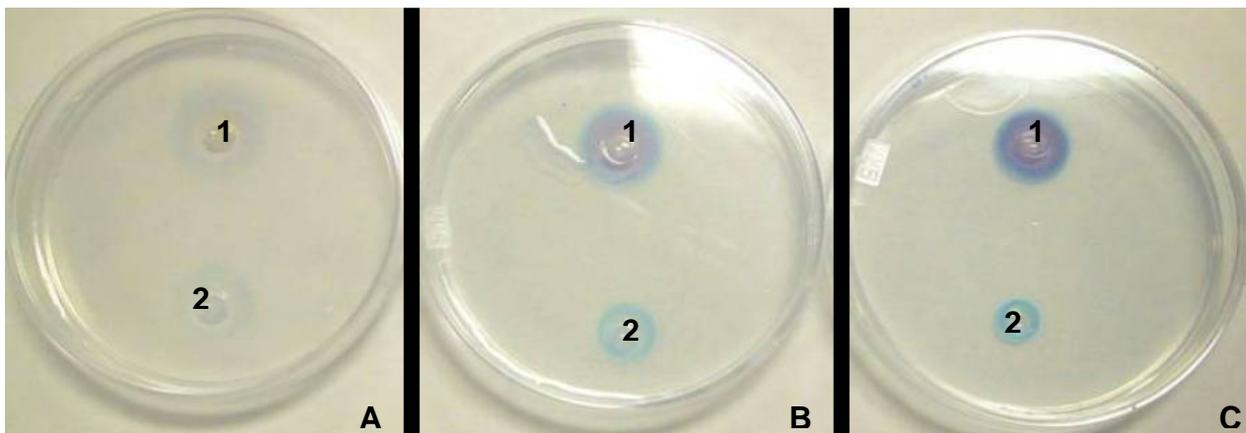
Solo se obtuvo respuesta para las concentraciones de imidazolina: compuesto puro y 10^{-1} , aunque para la concentración de 10 mM (en ambas sales) también se obtuvo respuesta para la dilución de imidazolina 10^{-2} .

Figura V.1 Selección de sal de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a distintas concentraciones



A: Medio Fe^{3+} 1 mM; B: Medio Fe^{3+} 5 mM; C: Medio Fe^{3+} 10 Mm; 1: Compuesto puro; 2: dilución 10^{-1}

Figura V.2 Selección de sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a distintas concentraciones

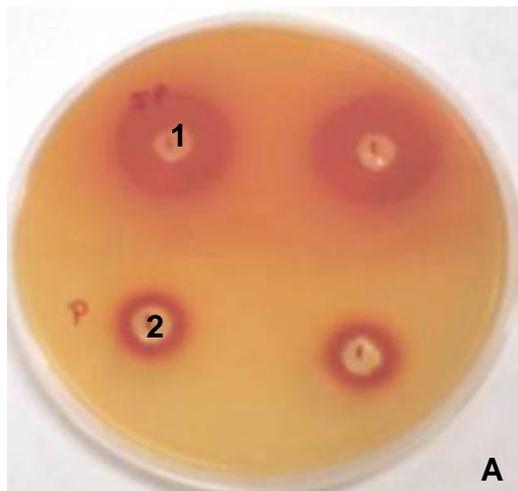


A: Medio Cu^{2+} 1 mM; B: Medio Cu^{2+} 5 mM; C: Medio Cu^{2+} 10 mM; 1: Compuesto puro; 2: dilución 10^{-1}

Al trasladar el ensayo químico (líquido) a medio sólido, primero se realizó el ensayo con la sal de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no lográndose observar una diferencia clara entre la coloración debida a la imidazolina y a su precursor: ya no se apreciaban los colores amarillo para el precursor y rojizo para la imidazolina, encontrados anteriormente en el ensayo

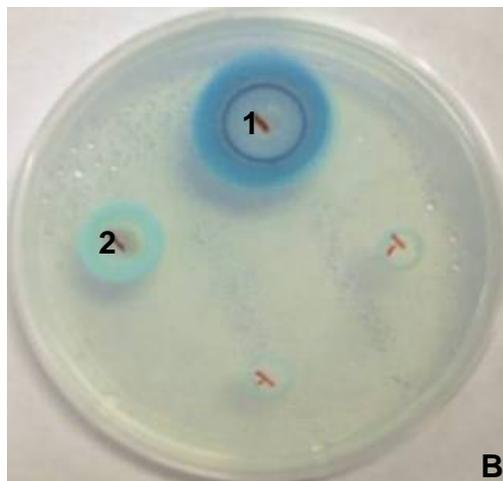
líquido, sino que ambos al estar en contacto con el medio originaban un color anaranjado (Figura V.3). Con la sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sí se obtuvo una diferencia clara: para la imidazolina se observaron halos de color azul cielo y para el precursor halos de color turquesa (Figura V.4).

Figura V.3 Coloración para imidazolina y precursor amídico en medio Fe^{3+}



Difusión en medio sólido
A: Medio Fe^{3+} 10 mM; 1: Compuesto puro;
2: precursor amídico

Figura V.4 Coloración para imidazolina y precursor amídico en medio Cu^{2+}



Difusión en medio sólido
B: Medio Cu^{2+} 10 mM; 1: Compuesto puro;
2: precursor amídico

El que no se apreciaran cambios diferentes en la coloración de imidazolina y precursor amídico para la sal de Fe^{3+} , hizo que nos decidiéramos a elegir a la sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como la más adecuada para continuar el trabajo. La curva de calibración de imidazolina para su cuantificación en medio sólido se muestra en el apéndice A-4, Figura A4-6.

En un nuevo ensayo, se simuló la producción de imidazolina por un hipotético microorganismo, aplicándola directamente sobre un medio convencional para bacterias (Figura V.5) y hongos (Figura V.6). Dicho medio se recubrió de una cobertera que contenía la sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (medio Cu^{2+}) y de esta forma pudo apreciarse un halo de coloración. Este halo no tuvo la misma intensidad de color que el obtenido anteriormente, pero si fue visible. En éste caso, sólo se obtuvo respuesta para las concentraciones de imidazolina compuesto puro y dilución 10^{-1} .

Figura V.5

Simulación de la biosíntesis de imidazolina medio para bacterias.

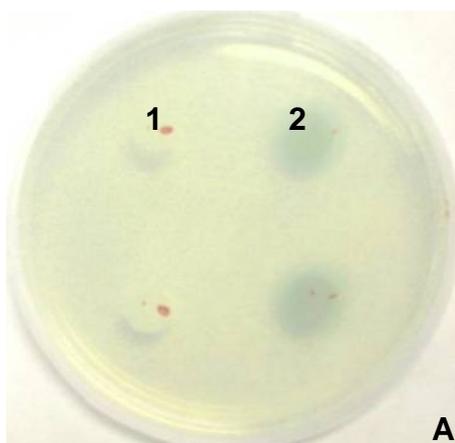
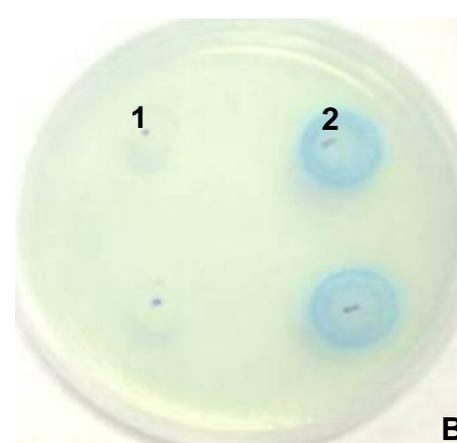


Figura V.6

Simulación de la biosíntesis de imidazolina medio para hongos.



A: Medio para bacterias; B: Medio para hongos; 1: dilución 10^{-1} ; 2: Compuesto puro

Para demostrar la especificidad de la reacción con la imidazolina, se probó el ensayo en cobertera para microorganismos productores de otros inhibidores de corrosión (sideróforos, inhibidores de corrosión de origen biológico), por lo que se hizo que *Aspergillus niger* (Figura V.7) y *Bacillus cereus* (Figura V.8) los produjeran haciéndolos crecer en condiciones deficientes de hierro. Al verter la cobertera del medio Cu^{2+} no se obtuvo cambio de color en el entorno de los microorganismos.

Figura V.7
Ensayo en cobertera para
Aspergillus niger

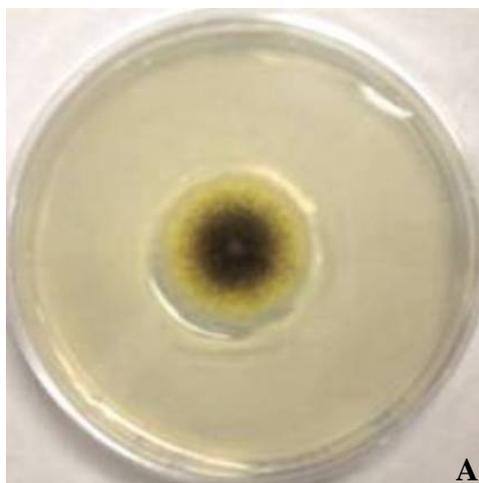
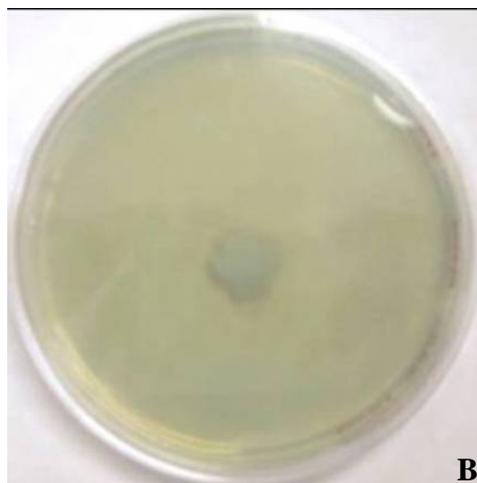


Figura V.8
Ensayo en cobertera para *Bacillus cereus*



A: Medio para hongos, cobertera medio Cu^{2+} ; B: Medio para bacterias, cobertera medio Cu^{2+} .

Para demostrar que los microorganismos elegidos estaban realmente produciendo sideróforos se procedió a utilizar el ensayo universal CAS como método de detección (Schwyn y Neilands, 1987).

V.2.1.1 Discusión

Con el ensayo específico se lograron establecer las condiciones para detectar, de forma confiable, imidazolinas similares a las utilizadas en este trabajo. La forma de interactuar entre imidazolinas y sales metálicas es muy distinta quizá a eso se deba el que no exista cambio en la coloración entre imidazolina y precursor amídico con la sal de Fe^{3+} , aunque también pudo influir la solubilidad de los compuestos en el medio. Por estas razones la sal ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y la concentración de la misma escogidas (10 mM) fueron las elegidas, lo cual permitió la detección de hasta concentraciones de imidazolina 100 veces inferiores a las conseguidas por medio de la síntesis química.

El resultado del experimento de simulación de la producción nos proporciona la seguridad de que la detección en esas circunstancias es posible, demostrándose por otra parte mediante el uso de microorganismos productores de inhibidores de corrosión de origen biológico que el ensayo es lo suficientemente específico como se requeriría para comenzar los estudios de biosíntesis de imidazolinas.

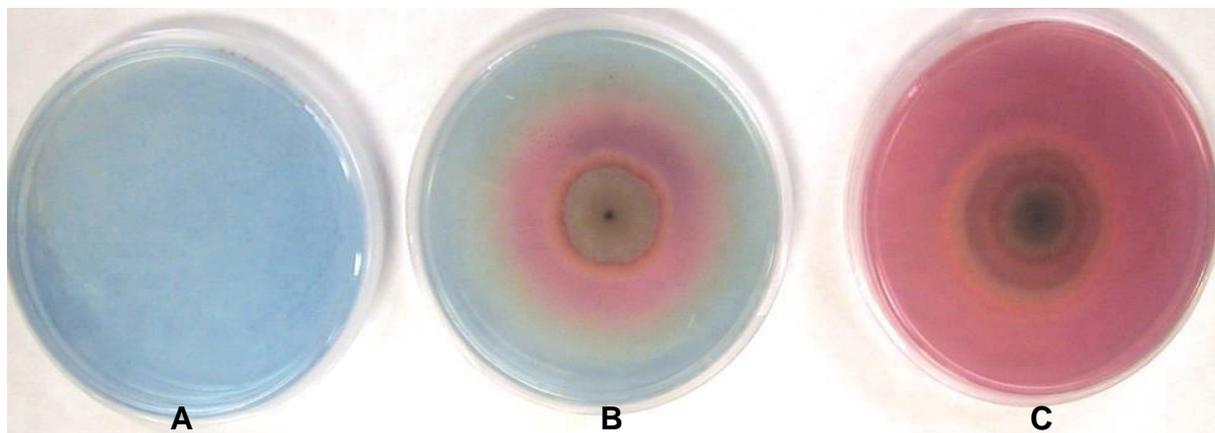
La intensidad del color fue, en este caso más débil y, aunque ya no se detectaron las concentraciones de 10^{-2} , todavía se detectaron claramente concentraciones 10 veces inferiores a las obtenidas por síntesis química.

V.2.2 Ensayo Biológico General.

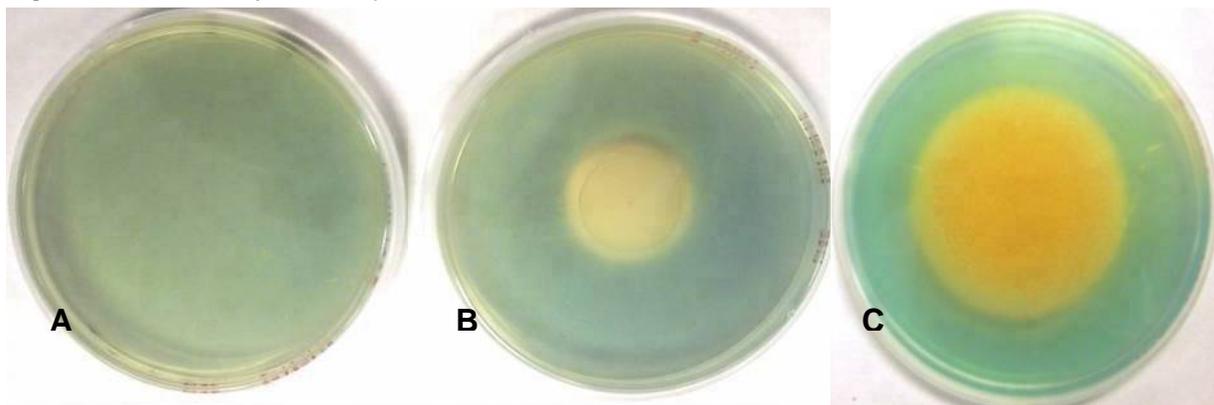
Al realizar la comprobación de la producción de los sideróforos por los microorganismos, nos dimos cuenta que las metodologías

disponibles, propuestas por Schwyn y Neilands en 1987 y Milagres y Machuca en 1999, no eran las más adecuadas para los fines de este ensayo. Por ello se optó por realizar una modificación del ensayo universal, utilizando una cobertera del medio CAS sobre los microorganismos (*Aspergillus niger* y *Bacillus cereus*), al igual que se hacía en el ensayo biológico específico. Esta metodología a la que denominamos O-CAS (por “overlayed CAS”) fue posteriormente mejorada, al cambiar el agar por agarosa como agente gelificante y disminuir la concentración del mismo hasta 0.9 % (p/v), para permitir una mejor difusión del sideróforo. De esta forma se redujo la duración del ensayo desde los 6 días iniciales hasta lograr tiempos de detección inferiores a 1 hora. El análisis estadístico para este ensayo se muestra en el apéndice A-1, tabla A1-3. Con este procedimiento se obtuvieron cambios en la coloración del medio de azul a púrpura para *Aspergillus niger* (Figura V.9) y de azul-verdoso a anaranjado para *Bacillus cereus* (Figura V.10).

Figura V.9 Ensayo O-CAS para *Aspergillus niger*



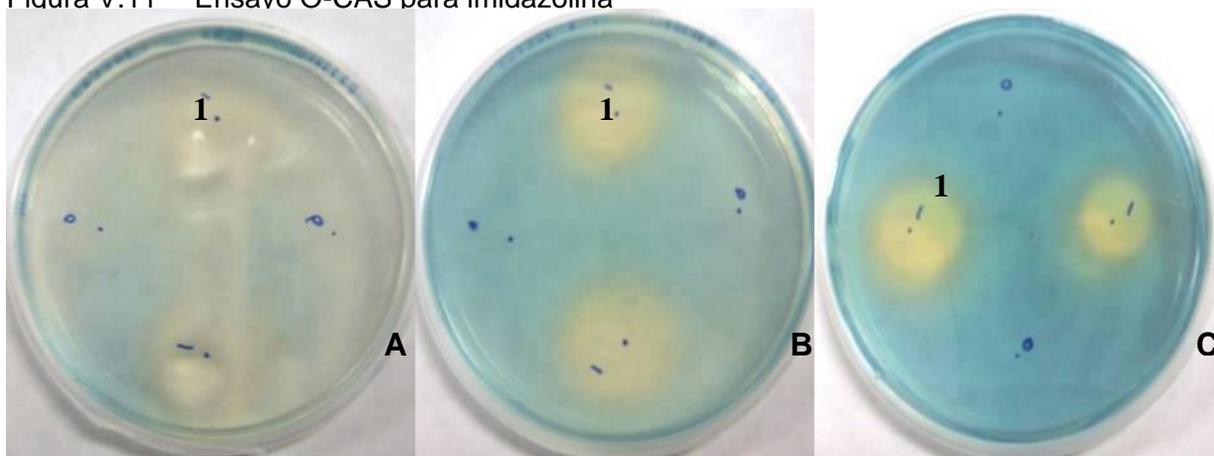
A: Control; B: 1 h; C: 48 h

Figura V.10 Ensayo OCAS para *Bacillus cereus*

A: Control; B: 1 h; C: 24 h

El ensayo O-CAS fue probado también con la imidazolina, obteniéndose un cambio de coloración en el medio de azul a amarillo. La imidazolina sólo presentó respuesta en estas condiciones para las concentraciones compuesto puro y dilución 10^{-1} (Figura V.11).

Figura V.11 Ensayo O-CAS para imidazolina



1: Compuesto puro; A: 3 mL de cobertera; B: 5 mL de cobertera; C: 10 mL de cobertera.

V.2.2.1 Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas

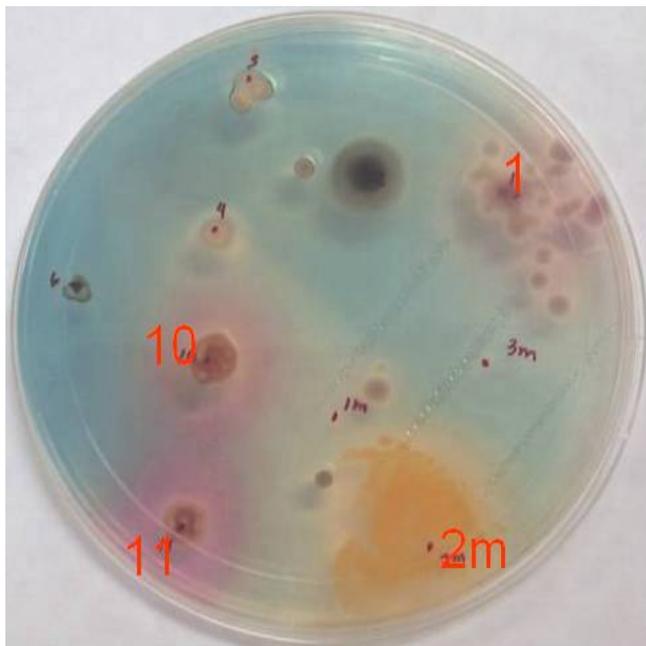
Se realizó este experimento para demostrar que la nueva metodología propuesta para la detección de sideróforos era aplicable a cualquier microorganismo y para comprobar que el método permitía la detección simultánea de distintos microorganismos productores.

Los microorganismos procedentes de las prácticas de microbiología se enumeraron del 1 al 16, obteniéndose respuesta en algunos de los microorganismos probados (1, 8, 10, 11, 12, 15 y 16).

También se obtuvo respuesta con tres de las bacterias aisladas del agua de mar (1m, 2m y 3m). Las figuras V.12, V.13 y V.14 muestran los resultados obtenidos.

Figura V.12

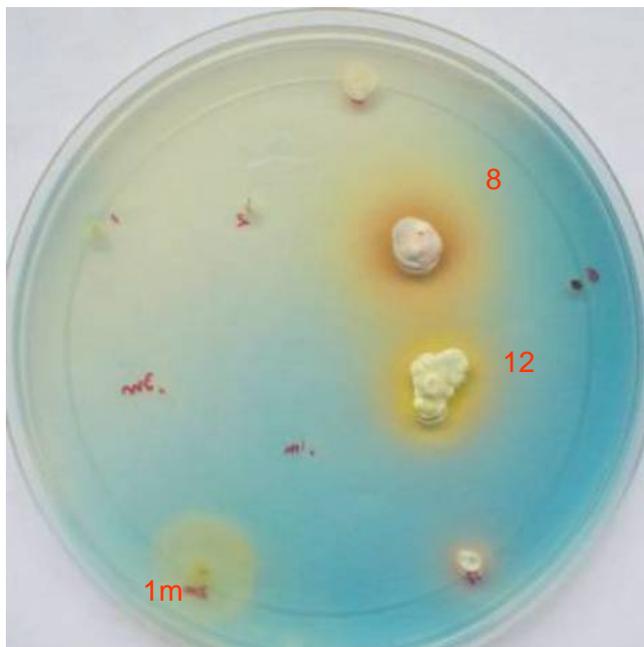
Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas



1, 10, 11 → púrpura –catecol;
2m → anaranjado- hidroxamato

Figura V.13

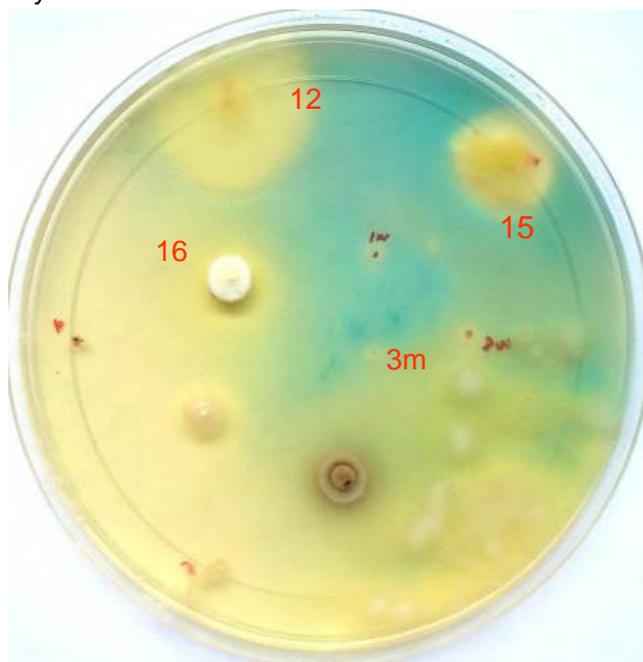
Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas



8, → anaranjado- hidroxamato
12, 1m → amarillo

Figura V.14

Aplicación del ensayo O-CAS a muestras microbianas no identificadas



12, 15, 16, 3m → amarillo

V.2.2.2 Discusión.

El método universal para la detección de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987) presentaba problemas de inhibición del crecimiento, al contener el medio CAS el detergente HDTMA, compuesto tóxico para muchos microorganismos. Así, este método sólo está recomendado para el crecimiento de bacterias Gram positivas.

La modificación reportada por Milagres y Machuca en 1999, solucionaba este problema haciendo crecer el microorganismo en media caja de Petri con su medio de cultivo y poner en la otra media caja el medio CAS. La difusión del sideróforo provocaba el cambio de coloración del medio CAS. Aunque eficaz, este nuevo método es bastante laborioso.

Nuestro método utiliza el propio medio de cultivo de cada microorganismo y el CAS es aportado en cobertera una vez que el crecimiento (y la producción de sideróforos) ya se ha realizado. Puede ser aplicado, por lo tanto, a cualquier microorganismo.

De la misma forma, varios microorganismos (incluso bacterias y hongos a la vez) productores pueden ser detectados en una misma caja de Petri cosa que no ocurría o no era claramente favorecida por los protocolos anteriores. Los cambios de coloración son consistentes con los métodos anteriores y, aparentemente, distintos tipos de inhibidores viran de distinta forma el color original del medio CAS.

Los tiempos de detección, por último, también son importantes en la nueva metodología O-CAS. La modificación al agente gelificante y su concentración provocó que los cambios que se empezaban a apreciar a los seis días, se aprecian ahora casi inmediatamente para: *Aspergillus niger* se observó un

cambio de coloración muy notorio a la hora de haber vertido la nueva cobertera, observándose el cambio completo de la caja de Petri a las 48 horas; para *Bacillus cereus* se observaron resultados también casi a la hora de verter la cobertera y la caja de Petri viró su color por completo a las 72 horas. Estas respuestas se deben a que la difusión del inhibidor de corrosión es mayor en las redes de agarosa que en las de bacto-agar (Sung *et al.*, 2000), puesto que éstas permanecen más cerradas. De esta forma el inhibidor que difunde en agar tarda más en quelar el hierro y se retrasa la respuesta que se espera.

Aplicando el ensayo O-CAS a muestras microbiológicas no identificadas se lograron obtener cambios de color en el medio CAS casi inmediatamente después de verter la cobertera sobre los microorganismos, observándose respuesta para los tres microorganismos aislados del agua de mar y para algunos de los microorganismos de laboratorio probados. En este experimento final los microorganismos numerados como 1, 10 y 11 cambiaron el medio de color azul a púrpura que es algo característico en sideróforos de tipo catecol (Machuca y Milagres, 2003), el microorganismo 2m cambió el medio de azul a anaranjado, característico de los sideróforos de tipo hidroxamato (Manninen y Mattila-Sandholm, 1994). Los microorganismos 8, 15, 16, 1m y 3m, por su parte, producen coloración amarilla, de la cual no existen reportes que la asocien con un tipo de sideróforo determinado. Como se mencionó en la Revisión Bibliográfica, los sideróforos de tipo catecol, hidroxamato y hidroxicarboxilatos son los únicos descritos hasta el momento. Estos datos podrían indicarnos la existencia en los microorganismos mencionados anteriormente de inhibidores de corrosión biológicos de tipos desconocidos en la actualidad (quizá tipo imidazolina, por la respuesta presentada por ésta en el ensayo O-CAS para imidazolina, ya que los colores obtenidos fueron muy similares).

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI

1. El ensayo biológico específico nos permite identificar fácilmente y de forma segura la presencia de un inhibidor de corrosión de tipo imidazolina mediante un cambio de coloración en el medio, el cual va de azul tenue a azul intenso según sea la concentración del inhibidor. Además, con él se puede identificar fácilmente la presencia de imidazolina o del precursor amídico, en función de la coloración distinta que presentan ambos compuestos al estar en coordinación con una sal de cobre.
2. El ensayo O-CAS es un método optimo para la detección de nuevos sideróforos, puesto que es aplicable a muestras complejas, no provoca problemas de inhibición del crecimiento de los microorganismos y permite una identificación casi inmediata de los microorganismos productores y del tipo de inhibidor producido.
3. El ensayo O-CAS puede servir también para la identificación preliminar de imidazolina.

APÉNDICE

CAPÍTULO VII

Apéndice A-1

Análisis Estadístico

Tabla A1-1 Elección de la concentración de sal de cobre.

<u>Análisis de Varianza</u>					
Respuesta: Halo (mm)					
Fuente de		Suma de	Media de	Prob	Power
Términos	DF	Cuadrados	Cuadrados F-Ratio	Level	($\alpha = 0.05$)
A: Concentración	2	642.0667	321.0333	35.69	0.000000*
S(A)	27	242.9	8.996296		1.0000
Total (Ajustado)	29	884.9667			
Total	30				
Term significant at alpha = 0.05					
<u>Prueba de Comparación Múltiple Tukey-Kramer</u>					
Respuesta: Halo (mm)					
Término A: Concentración					
$\alpha = 0.050$ Término de Error = S(A) DF=27 MSE= 8.996296 Valor Crítico =3.506444					
Grupo	Cantidad	Media	Grupos Diferentes		
5 mM	10	28.8	10 mM		
1 mM	10	29.4	10 mM		
10 mM	10	38.9	5mM, 1mM		

La concentración de sal de cobre a elegir es la 10 mM porque ofrece una mayor difusión de la imidazolina, al obtener con ésta concentración el mayor halo de 38.9 mm, además de ser la concentración a la que se aprecia un mejor color.

Tabla A1-2 Elección de medios de cultivo para crecer microorganismos aislados de agua de mar.

<u>Análisis de Varianza</u>						
Respuesta: Colonias						
Fuente de		Suma de	Media de		Prob	Power
Términos	DF	Cuadrados	Cuadrados	F-Ratio	Level	($\alpha = 0.05$)
A: Medios	5	21370.67	4274.133	432.46	0.000000*	1.00000
S(A)	24	237.2	9.883333			
Total (Adjusted)	29	21607.87				
Total	30					
* Term significant at alpha = 0.05						
<u>Prueba de Comparación Múltiple Tukey-Kramer</u>						
Respuesta: Colonias						
Término A: Medios de cultivo						
$\alpha = 0.050$ Término de Error = S(A) DF=24 MSE=9.883333 Valor Crítico = 4.372677						
Grupo	Cantidad	Media	Grupos Diferentes			
A.Nutritivo3%	5	0	A.Nutritivo, TSA			
PDA	5	0.6	A.Nutritivo, TSA			
MacConkey	5	1.4	A.Nutritivo, TSA			
Cz	5	3.4	A.Nutritivo, TSA			
A.Nutritivo	5	46.2	A.Nutritivo3%, PDA, MacConkey, Cz,			
TSA						
TSA	5	66.8	A.Nutritivo3%, PDA, MacConkey, Cz,			
			A.Nutritivo			

El medio de cultivo a elegir es TSA se obtiene en él un mejor crecimiento de microorganismos, en medios para hongos es Czapeck.

Tabla A1-3 Modificación de medio CAS (obtención de metodología O-CAS).

<u>Análisis de Varianza</u>						
Respuesta: tiempo (h)						
Fuente de	DF	Suma de	Media de	F-Ratio	Prob	Power
Términos		Cuadrados	Cuadrados		Level	($\alpha = 0.05$)
A: Medio gelificante	1	2084.642	2084.642	582.23	0.000000*	
		1.000000				
B: Concentración	3	195.2611	65.08704	18.18	0.000001*	
		0.999990				
AB	3	88.00485	29.33495	81.24	0.000000*	
		1.000000 S	24	8.6664	0.3611	
Total (Adjusted)	31	2376.575				
Total	32					
Term significant at alpha = 0.05						
<u>Prueba de Comparación Múltiple Tukey-Kramer</u>						
Respuesta: tiempo (h)						
Término AB: Medio gelificante, Concentración.						
$\alpha = 0.050$ Término de Error = S(AB) DF=24 MSE=0.3611 Valor Crítico =4.683777						
Grupo	Cantidad	Media	Grupos Diferentes			
agarosa,0.9	4	0.68	(agarosa,1.3), (agarosa,1.5) (bactoagar,0.9), (bactoagar,1.1) (bactoagar,1.3), (bactoagar,1.5)			
agarosa,1.1	4	1.2	(agarosa,1.5), (bactoagar,0.9) (bactoagar,1.1), (bactoagar,1.3) (bactoagar,1.5)			
agarosa,1.3	4	2.15	(agarosa,0.9), (bactoagar,0.9) (bactoagar,1.1), (bactoagar,1.3) (bactoagar,1.5)			
agarosa,1.5	4	2.775	(agarosa,0.9), (agarosa,1.1) (bactoagar,0.9), (bactoagar,1.1) (bactoagar,1.3), (bactoagar,1.5)			
bactoagar,0.9	4	12.375	(agarosa,0.9), (agarosa,1.1), (agarosa,1.3) (agarosa,1.5), (bactoagar,1.1) (bactoagar,1.3), (bactoagar,1.5)			
bactoagar,1.1	4	15.75	(agarosa,0.9), (agarosa,1.1), (agarosa,1.3) (agarosa,1.5), (bactoagar,0.9) (bactoagar,1.3), (bactoagar,1.5)			
bactoagar,1.3	4	20	(agarosa,0.9), (agarosa,1.1), (agarosa,1.3) (agarosa,1.5), (bactoagar,0.9) (bactoagar,1.1), (bactoagar,1.5)			
bactoagar,1.5	4	23.25	(agarosa,0.9), (agarosa,1.1), (agarosa,1.3) (agarosa,1.5), (bactoagar,0.9) (bactoagar,1.1), (bactoagar,1.3)			

Los grupos a elegir son agarosa,0.9 y agarosa,1.1 puesto que no existe una diferencia significativa entre ellos, se podría esperar una respuesta en cambio de color igual, sus medias son muy parecidas, por lo cual el grupo a elegir será agarosa,0.9 por haber obtenido una media menor en tiempo de respuesta (0.68 h).

Apéndice A-2

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Es frecuente el uso de técnicas espectroscópicas para identificar compuestos individuales. Muchas técnicas espectroscópicas se apoyan en la interacción de un compuesto con la radiación electromagnética, la cual se puede considerar como una partícula (llamada fotón) o una honda que viaja a la velocidad de la luz. Cuando se considera como una honda, la luz se puede describir por su longitud de onda (λ) o su frecuencia (ν). La longitud de onda es la distancia que abarca un ciclo ondulatorio completo. La frecuencia es el número de ciclos ondulatorios que pasan por un punto fijo en un tiempo definido (un hertz, Hz, equivale a un ciclo por segundo). Para algunas técnicas espectroscópicas la longitud de onda define el contenido de energía, y para otras se emplea la frecuencia.

Al igual que los electrones, los protones y los neutrones tienen espín. Un núcleo que contiene un número impar de protones o de neutrones (o de ambos) tiene espín y es magnéticamente activo. El núcleo más pequeño que satisface este requisito es el ^1H , pero también lo satisfacen ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F y ^{31}P . Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje, y por tanto tienen momento angular. Puesto que el núcleo tiene carga positiva, este movimiento de rotación sobre un eje hace que se comporte como un imán diminuto. De acuerdo con las exigencias de la molécula cuántica, cuando un núcleo con un espín neto se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético externo define estados de energía cuantizados para el núcleo. En caso con núcleos con espín de $\frac{1}{2}$, ^1H y ^{13}C , son posibles dos orientaciones: la orientación a favor del campo externo o en contra del mismo. La alineación del espín nuclear a favor del campo magnético es ligeramente más favorable que la alineación en contra del campo, de modo que estas dos alineaciones son de distinta energía. En consecuencia, el número de moléculas cuyos núcleos tienen una alineación paralela es ligeramente mayor que el de las que tienen núcleos con alineación antiparalela. La transición entre estos dos estados de espín proporciona abundante información acerca del ambiente que rodea a los núcleos de las moléculas.

Los núcleos se pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja energía a uno de mayor energía por medio de energía electromagnética de una frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa, cuando un núcleo en el estado de mayor energía cae al estado de más baja energía, se emite energía

electromagnética de esa frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo y la técnica se conoce como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Cuando los núcleos de una muestra están saltando rápidamente entre ambos estados, se dice que están en resonancia con la radiación electromagnética aplicada.

La frecuencia de la energía que se requiere para inducir el salto entre estados de espín en los núcleos varía en proporción directa con la magnitud del campo magnético aplicado. Cuanto mayor es la intensidad del campo, más grande es la diferencia entre los estados de espín paralelo y antiparalelo, y mayor es la energía de la señal necesaria para inducir el cambio. Los espectrómetros de RMN comerciales tienen imanes muy grandes que emplean cables superconductores para generar un campo magnético. Con estas intensidades de campo se requiere una energía del orden de las radiofrecuencias para inducir el salto entre los estados. Los espectrómetros de RMN se clasifican por la frecuencia que emplean para cambiar el estado de espín de los núcleos magnéticamente activos. Las máquinas de campo más alto disponibles en la actualidad de fabricantes de instrumentos comerciales operan a 750 MHz (1 MHz equivale a 1 millón de ciclos por segundo). Los espectros que emplean señales de 100 a 300 MHz son mucho más comunes. En realidad, estas frecuencias corresponden a muy poca energía: 100 MHz equivale a alrededor de $1E^{-5}$ Kcal/mol; esta radiofrecuencia sólo puede ser absorbida por los núcleos que se comportan como imanes en un campo magnético aplicado. Los núcleos de hidrógeno y de carbono son los de mayor interés. El isótopo más abundante de hidrógeno, ^1H tiene un espín neto de $\frac{1}{2}$, lo mismo que ^{13}C . Aunque este último representa solo el 1.1% del carbono presente en las muestras normales y es preciso utilizar instrumentos muy sensibles para observar los cambios de estado de espín de su núcleo, la abundancia de información que contienen los espectros de RMN de ^{13}C hace que valga la pena construir y usar estos instrumentos.

Protección. La densidad electrónica en torno a cada átomo de la molécula varía con la naturaleza de los átomos circundantes y es ligeramente distinta para cada átomo no equivalente. En esencia, el núcleo de un átomo experimenta un cierto grado de protección respecto al campo magnético externo. Por tanto, cada núcleo específico experimenta un campo efectivo diferente y, en consecuencia, emite energía a una frecuencia distinta. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos

específicos da origen a una señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.

Desplazamientos químicos. Las frecuencias se informan como la diferencia (en partes por millón, ppm) entre las señales que se registran para una muestra y la de un compuesto de referencia, el tetrametilsilano (TMS) es un compuesto de referencia interna para la espectroscopía tanto de protones (^1H) como de carbono (^{13}C). Así pues, las señales se informan como desplazamientos químicos o cambios, respecto a esta referencia en la escala delta (δ), donde 1 d equivale a 1 ppm y la señal del tetrametilsilano es el cero. Puesto que la escala δ se basa en la relación de la diferencia de frecuencia entre un estándar y una muestra a la frecuencia del estándar, los valores son independientes de la intensidad del campo magnético. Las señales a frecuencias más bajas (y campos más bajos) que la del estándar tienen valores δ positivos. La mayoría de las señales de protones varían entre 0 y 12 ppm; el intervalo para el carbono es más grande, de 0 a 250 ppm. Debido a estas diferencias en la escala, es más probable encontrar una superposición accidental de dos señales no equivalentes en un espectro de protones que en uno de carbono.

Interpretación de espectros. A partir del numero de señales se establece el numero de tipos distintos de núcleos presentes; el desplazamiento químico de cada señal revela detalles acerca del ambiente químico de cada tipo de núcleo y el desdoblamiento de señales permite deducir cuantos protones están cerca de cada uno.

ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^{13}C

Un espectro de RMN de ^{13}C proporciona dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al numero de tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal, que esta determinado por el entorno molecular de cada carbono. Es posible contar el numero de tipos diferentes de carbonos presentes en una molécula con base a su espectro de ^{13}C , pero la intensidad de cada señal solo tiene

una relación aproximada con el número de átomos de carbono que producen esa señal. La diferencia de tamaño de las señales se debe a diferencias en la rapidez con la que los átomos de carbono se relajan a la distribución del equilibrio de sus dos estados de energía en presencia de un campo magnético. La intensidad de la señal de RMN de ^{13}C no tiene una correlación exacta con el número de átomos de carbono que dan origen a una señal determinada. La señal que produce el carbono de un grupo metilo suele ser algo más débil que la de los átomos de carbono metilénicos (CH_2) y metínicos (CH), aunque es más intensa que la de los carbonos cuaternarios, que es bastante débil.

ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^1H

Las señales de los protones de los espectros de RMN de ^1H , como la de los carbonos en los espectros de RMN de ^{13}C , se registran como máximos de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Un espectro de RMN de ^1H proporciona cuatro elementos de información importantes:

- El número de señales distintas,
- El desplazamiento químico,
- El patrón de desdoblamiento y
- La integración de la intensidad de la señales.

El número de picos en los que la señal de un protón determinado se desdobra se denomina multiplicidad. En casos sencillos, la regla que nos permite predecir el desdoblamiento en la espectroscopia de protón es:

Multiplicidad de la señal de $\text{H}_a = n + 1$, donde n es igual al número de protones vecinos de H_a .

La señal puede estar desdoblada en dos picos (señal doble), tres picos (señal triple), cuatro picos (señal cuádruple, y así sucesivamente. Los multipletes aparecen como consecuencia de las pequeñas interacciones magnéticas que tienen lugar entre los núcleos de átomos vecinos. Se dice que los núcleos se hallan acoplados, y en el espectro de RMN resultante aparece un desdoblamiento conocido como acoplamiento spin-spin.

La interpretación de un espectro de RMN de ^1H se inicia con la determinación del número de señales con desplazamientos químicos definidos, los protones de los grupos funcionales comunes absorben en regiones características de los espectros de RMN de ^1H .

La constante de acoplamiento J es la distancia, expresada en hertzios, entre dos señales adyacente de un multiplete en particular, las distancias entre señales son idénticas. Las constantes de acoplamiento son independientes de la fuerza del campo magnético, mientras que el desplazamiento químico dado en hertzios es proporcional a la fuerza del campo.

Apéndice A-3

Síntesis de Imidazolina

Se sintetizaron dos tipos de imidazolinas, la imidazolina hexanoíca y la imidazolina octanoíca. El nombre que recibe la imidazolina se refiere al ácido carboxílico utilizado para su síntesis, que proporciona la cadena lateral del compuesto.

Se pesaron en una relación molar 1:1 el ácido carboxílico y el alcohol. Así, para un lote de 10 g de imidazolina hexanoíca se pesaron 10 g de 2-(2-aminoetiloamino) etanol y 11.1531 g de ácido hexanoíco. Se mezclaron el ácido hexanoíco y el 2-(2-aminoetiloamino) etanol en un matraz bola de una boca y se dejó reaccionar con agitación durante hora y media a 130° C, con una presión de 450 mm de Hg. Después de este tiempo se aumento la temperatura a 180° C durante dos horas más. La Imidazolina se destiló a 180° C para obtenerla en forma pura.

Para un lote de 10 g de imidazolina octanoíca se pesaron 10 g de 2-(2-aminoetiloamino) etanol y 13.8451 g de ácido octanoíco. El sistema de reacción y purificación utilizado fue el mismo que el descrito para la imidazolina hexanoíca.

Obtención de los precursores amídicos de las imidazolinas

Se obtuvo el precursor amídico de cada imidazolina, el precursor hexanoíco y el precursor octanoíco, de la siguiente manera: en un matraz bola de 250 mL se colocaron la segunda y tercera fracción del destilado de la imidazolina (hexanoíca u octanoíca) y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de metanol. Posteriormente se agregó hidróxido de potasio, en una relación 1:1 con respecto a la imidazolina. El sistema se agitó vigorosamente a temperatura ambiente por espacio de 2 horas. Una vez concluida la reacción de hidrólisis se evaporó el metanol, y al sólido obtenido se le agregó cloroformo en la mínima cantidad que permitió disolver el producto.

Posteriormente se filtraron los sólidos al vacío y el filtrado se evaporó nuevamente para dar un sólido de color amarillo (precursor hexanoíco) y un sólido blanco nacarado (precursor octanoíco), el cual se lavo con 50 mL de éter etílico y se seco a temperatura ambiente.

Caracterización de imidazolinas y precursores amídicos.

La estructura y pureza de las imidazolinas y precursores amídicos fue determinada a través de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C a 200 MHz en un espectrómetro VARIAN modelo Mercury. Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) utilizando como disolventes cloroformo (CDCl_3) y agua (D_2O) deuterados respectivamente y como referencia el tetrametilsilano ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$).

Espectros de RMN ^{13}C Y ^1H para imidazolinas y precursores amídicos

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.1), se compone de diez señales a 167.873, 59.52, 51.46, 50.13, 49.12, 31.73, 27.74, 26.25, 22.44 y 14.06 ppm que representan cada uno de los carbonos que constituyen la molécula de imidazolina. La señal característica de la molécula se obtiene a 167.873 ppm la cual corresponde al C-1 de la molécula. Las señales se presentan en la Tabla A3-1

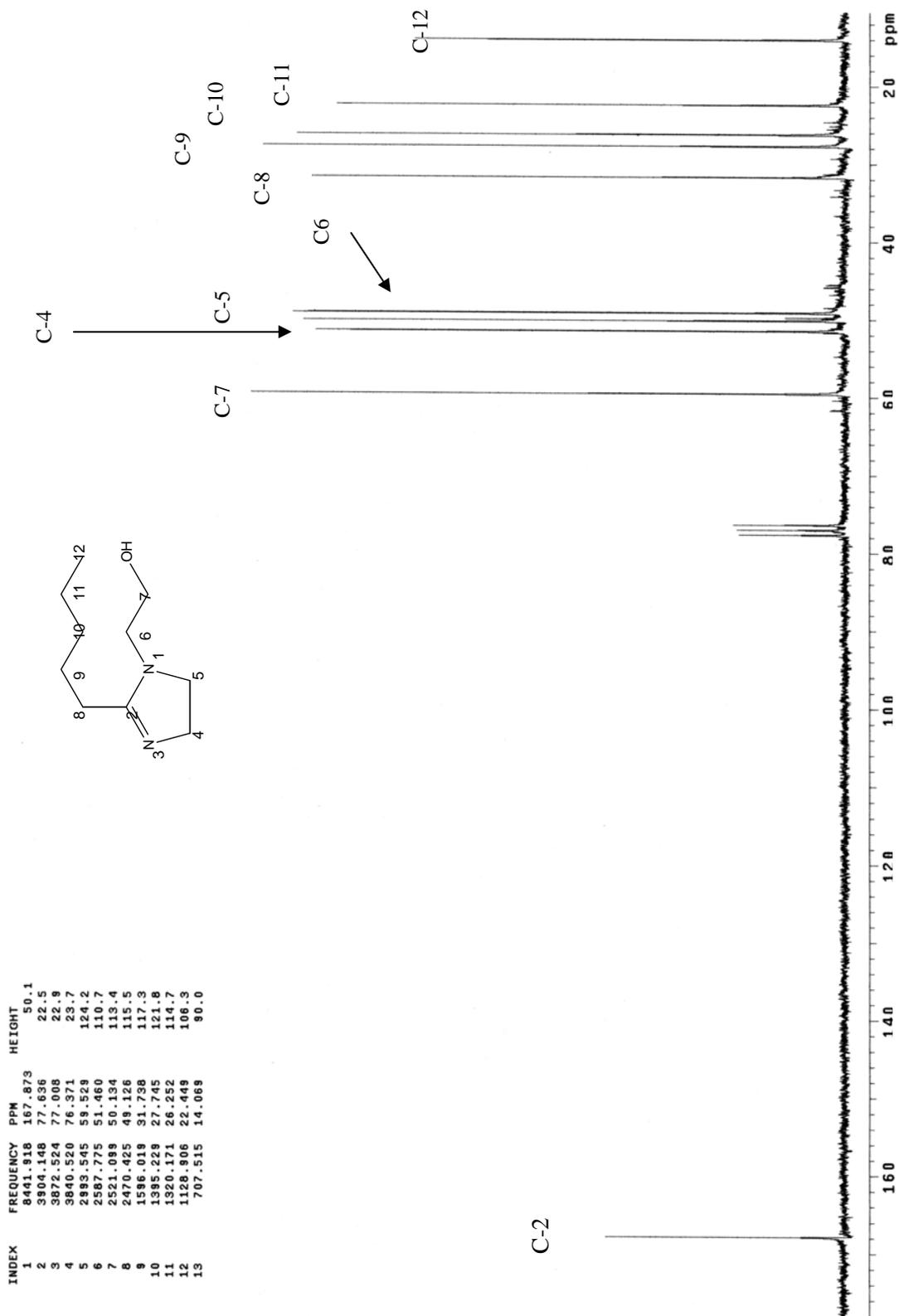
Tabla A3-1 Señales de RMN ^{13}C para la imidazolina hexanoíca.

C	ppm	C	ppm
2	167.873	6	31.738
7	59.529	9	27.745
4	51.460	10	26.252
5	50.134	11	22.449
8	49.126	12	14.069

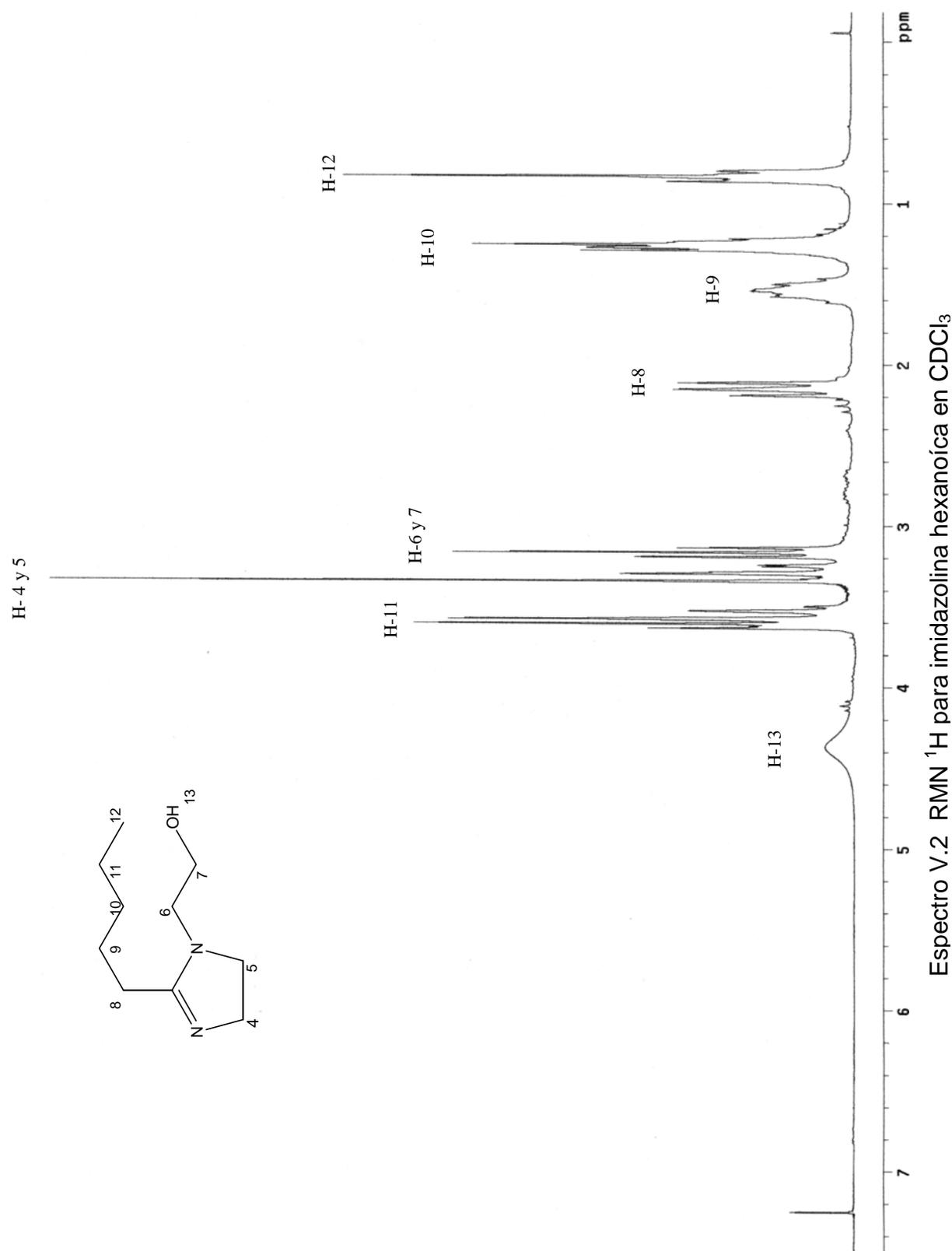
El espectro de RMN ^1H (Espectro V.2) para la imidazolina hexanoíca se compone de una señal triple que integra para tres protones a 0.867 ppm; dos señales cuántuples que integran para dos protones a 1.32 ppm y 1.613 ppm; tres señales triples que integran para dos protones a 2.191 ppm, 3.241 ppm y 3.313 ppm respectivamente y una señal séxtuple que integra para dos protones a 3.635 ppm. Las señales se resumen en la Tabla A3-2.

Tabla A3-2 Señales de RMN ^1H para imidazolina hexanoíca.

H	Tipo de señal	ppm
12	t	0.867
10	q	1.32
9	q	1.613
8	t	2.191
6 y 7	t	3.241
4 y 5	t	3.313
11	s	3.635



Espectro V.1 RMN ¹³C para imidazolina hexanoica en CDCl₃



En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.3) para la imidazolina octanoíca se observan de doce señales que corresponden a cada uno de los carbonos que constituyen la molécula de imidazolina, las señales se encuentran a 168.123, 59.230, 51.079, 49.917, 49.803, 31.492, 29.302, 28.834, 27.479, 26.319, 21.897 y 13.848 ppm. Obteniéndose la señal característica a 168.123 ppm correspondiendo al C-1 de la molécula. Las señales se resumen en la Tabla A3-3

El espectro de RMN ^1H (Espectro V.4) para la imidazolina octanoíca se compone de una señal triple que integra para tres protones a 0.877 ppm, tres señales quintuples que integran para dos protones cada uno a 1.324 ppm, 2.175 ppm y 3.374 ppm, tres señales triples que integran para dos protones a 2.303 ppm, 2.725 ppm y 6.112 ppm y un sextete que integra para dos protones a 3.636 ppm (Tabla A3-4).

Tabla A3-3 Señales de RMN ^{13}C para la imidazolina octanoíca.

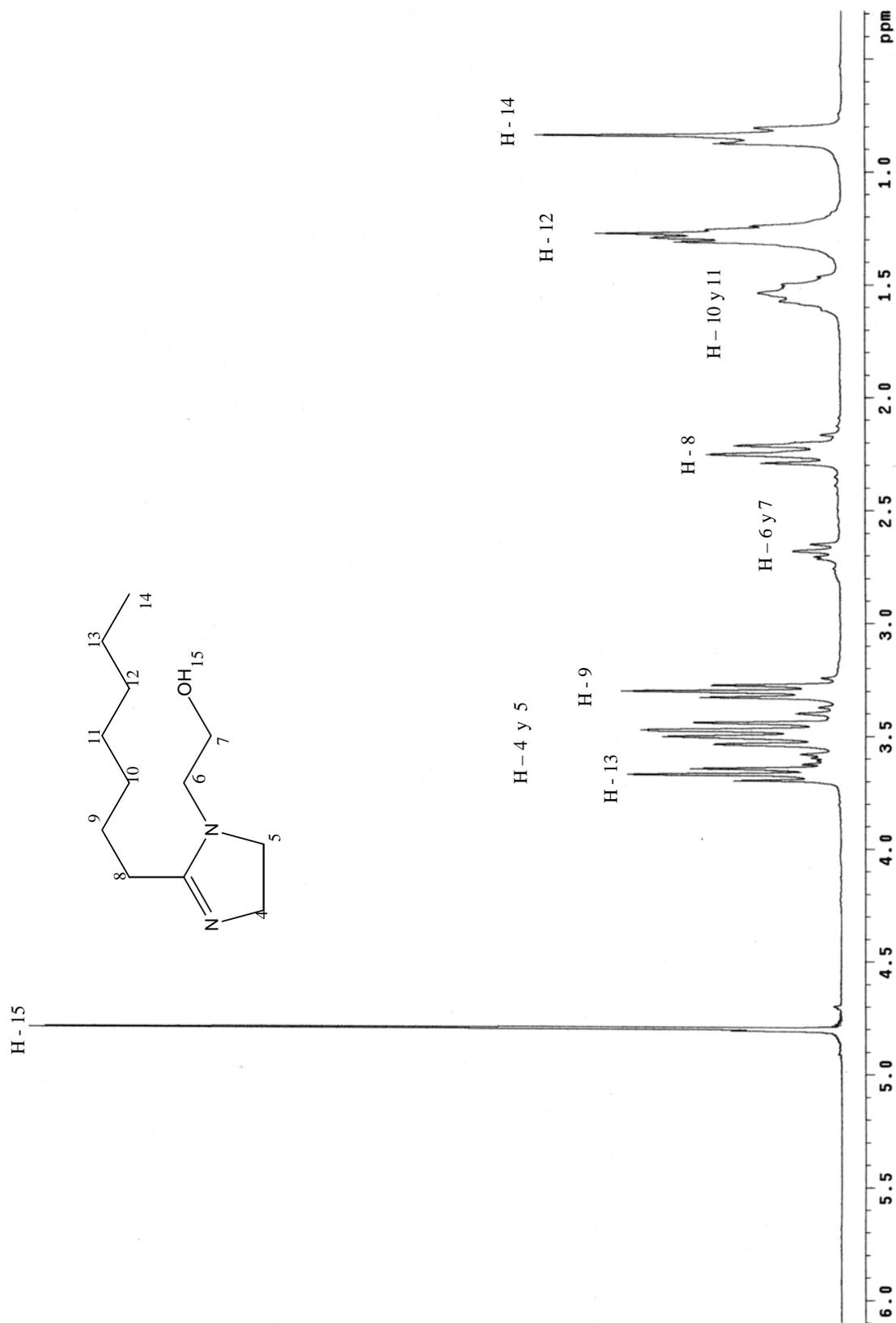
C	ppm	C	ppm
2	168.123,	9	29.302
7	59.230	10	28.834
4	51.079	11	27.479
5	49.917	12	26.319
8	49.803	13	21.897
6	31.492	14	13.848

Tabla A3-4 Señales de RMN ^1H para imidazolina octanoíca.

H	Tipo de señal	ppm
14	t	0.877
12	q	1.324
10 y 11	q	1.575
9	q	3.374
8	t	2.303
6 y 7	t	2.725
4 y 5	t	3.452
13	s	3.636



Espectro de ^{13}C RMN para imidazolina octanoica en CDCl_3



Espectro V.4 RMN ¹H para imidazolina octanoica en CDCl₃

El espectro de RMN ¹³C (Espectro V.5) para el precursor amídico de la imidazolina hexanoíca se compone de diez señales a 173.570, 60.635, 51.119, 48.717, 39.042, 36.670, 31.526, 25.548, 22.487 y 14.069 ppm, cada una de estas señales representan a los carbonos que constituyen la molécula. La señal característica de la molécula se obtiene a 173.570 ppm (Tabla A3-5).

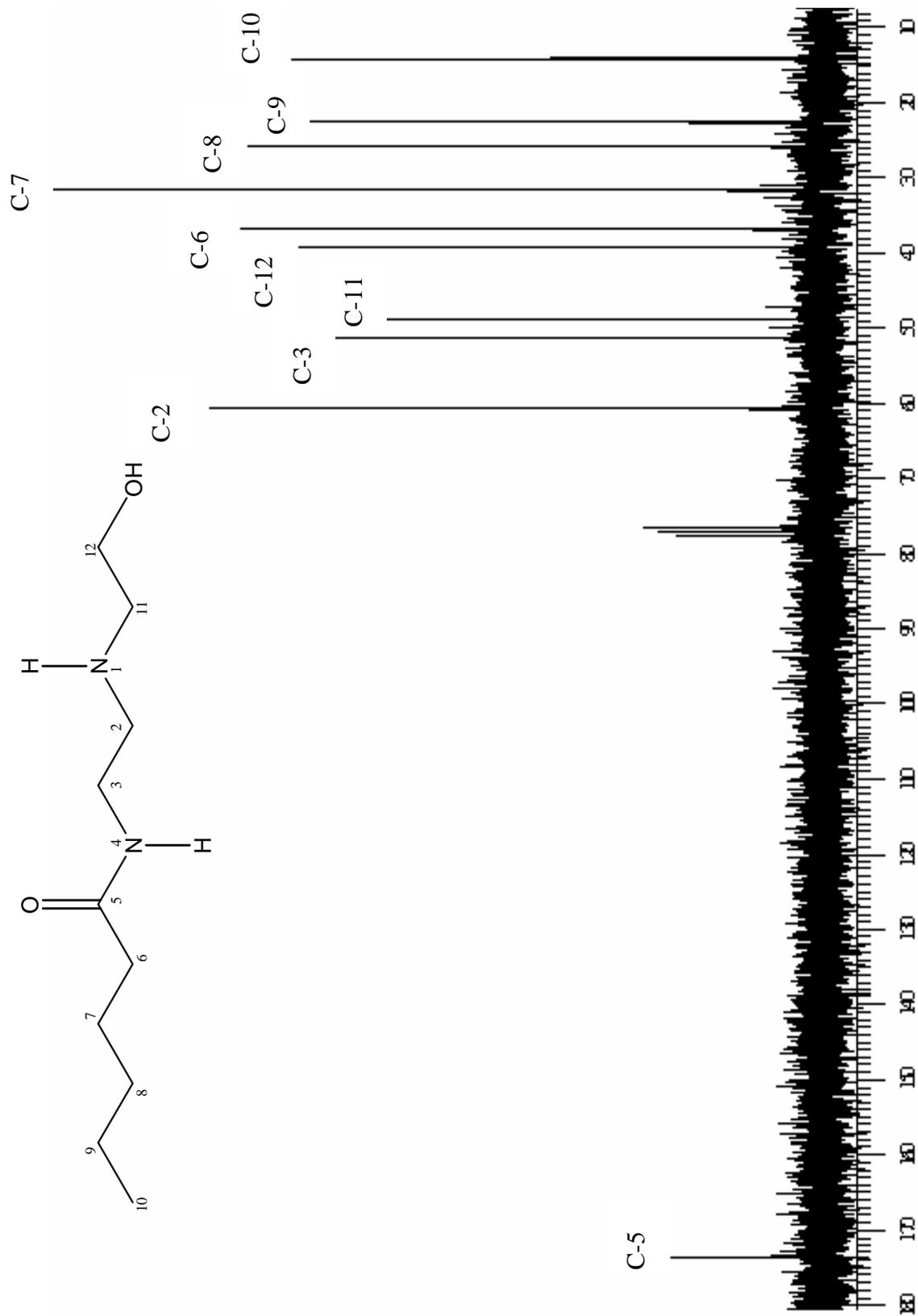
El espectro de RMN ¹H (Espectro V.6) para el precursor amídico de la imidazolina hexanoíca se compone de un triplete que integra para tres protones a 0.880 ppm, dos quintetes que integran para dos protones cada uno, a 1.652 ppm y 3.360 ppm, tres triplete que integran para dos protones a 2.174 ppm, 2.752 ppm y 3.650 ppm y un sextete que integra para dos protones a 1.285 ppm (Tabla A3-6).

Tabla A3-5 Señales de RMN ¹³C para el precursor amídico hexanoíco.

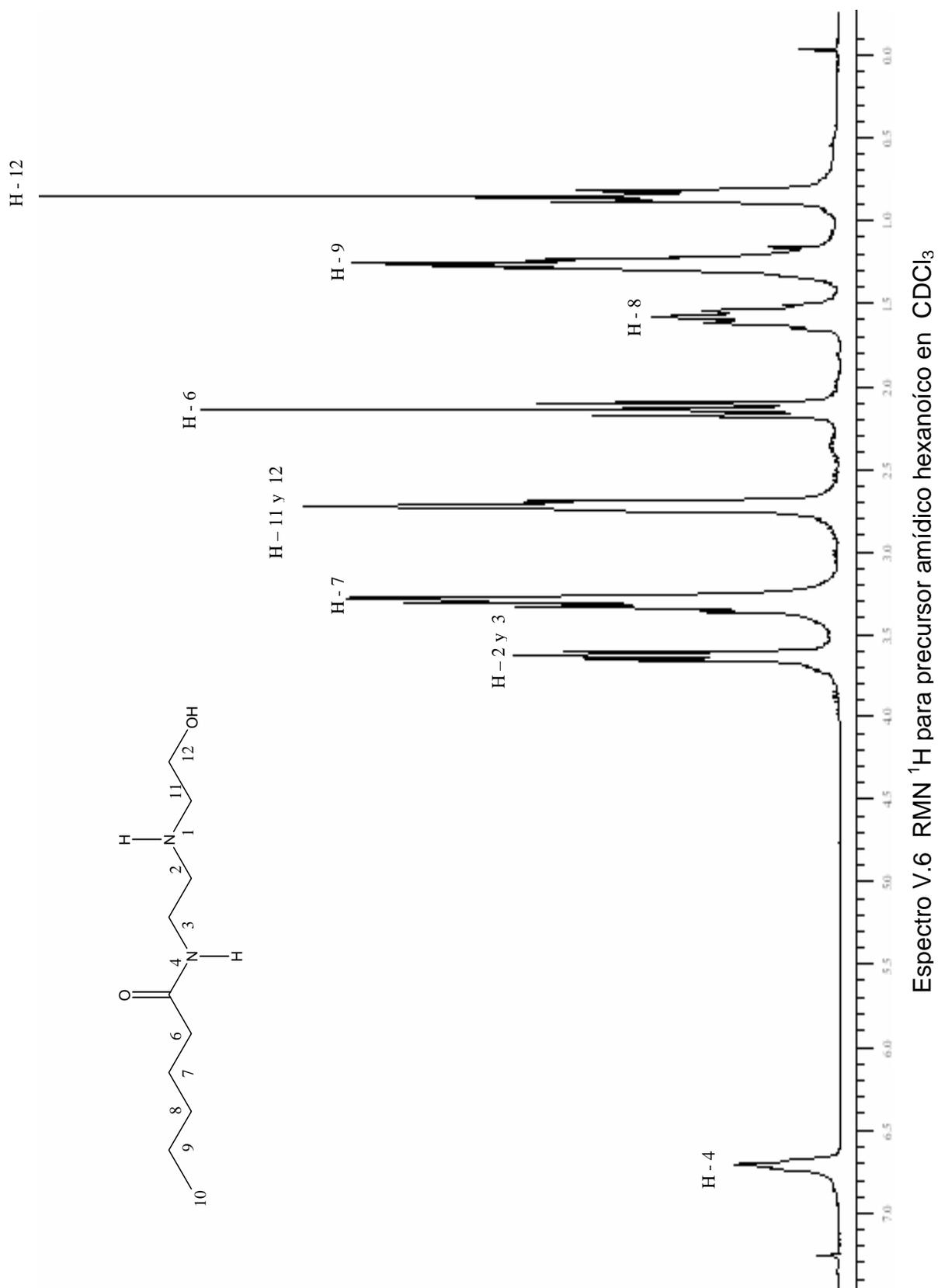
C	ppm	C	ppm
5	173.570	6	36.670
2	60.635	7	31.526
3	51.119	8	25.548
11	48.717	9	22.487
12	39.042	10	14.069

Tabla A3-6 Señales de RMN ¹H para precursor amídico hexanoíco.

H	Tipo de señal	ppm
10	t	0.880
8	q	1.652
7	q	3.360
6	t	2.174
11 y 12	t	2.752
2 y 3	t	3.650
9	s	1.285



Espectro V.5 RMN ^{13}C para precursor amídico hexanoico en CDCl_3



En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.7) para el precursor amídico octanoíco se observan 12 señales a 173.925, 61.224, 48.914, 39.330, 37.021, 31.912, 29.509, 26.012, 22.817, 14.301 ppm, estas señales corresponden a cada uno de los átomos de carbono de la molécula. La señal característica de la molécula se obtiene a 173.925 ppm.

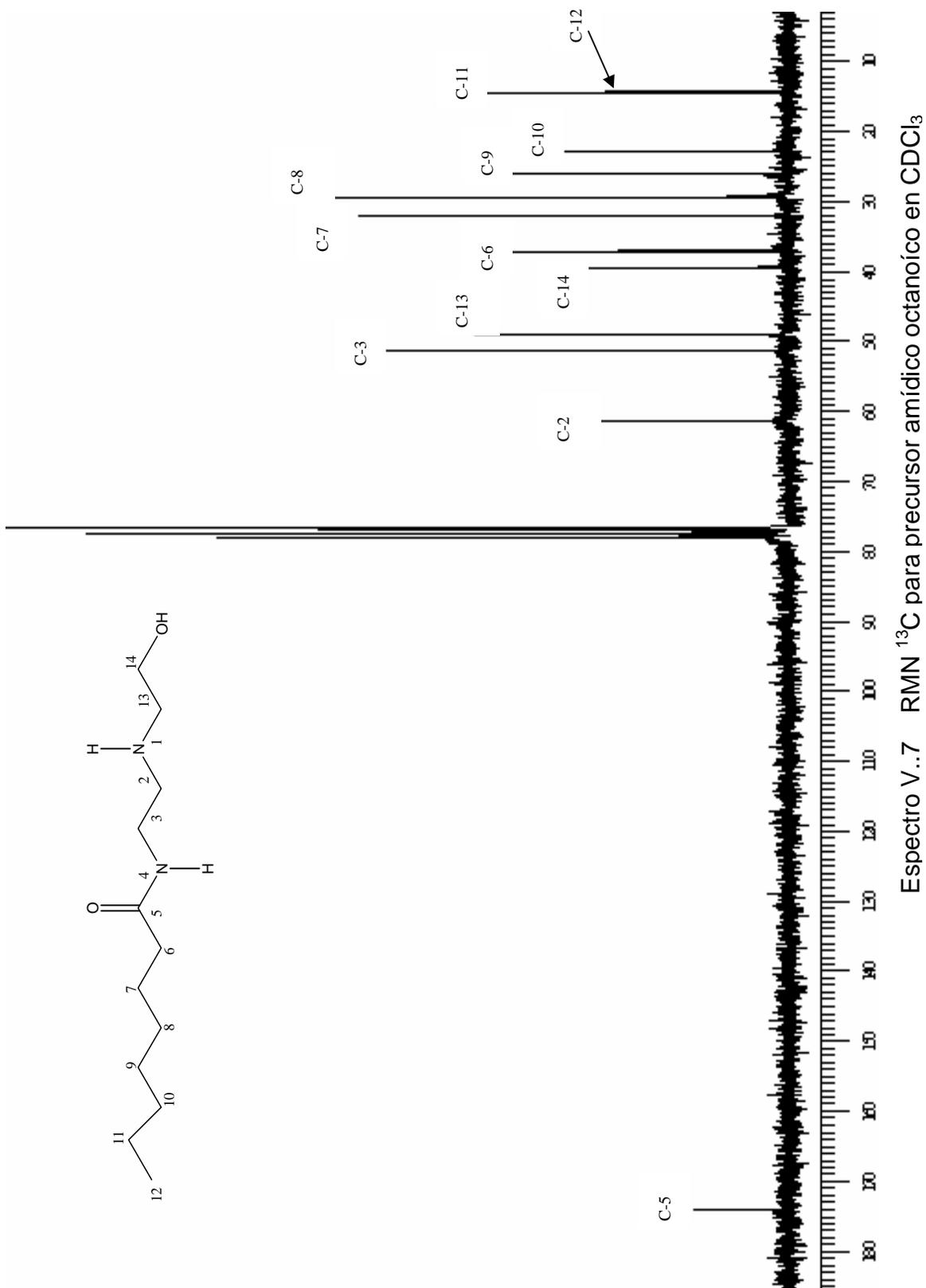
El espectro de RMN ^1H (Espectro V.8) para el precursor amídico de la imidazolina octanoíca se compone de una señal triple que integra para tres protones a 0.804 ppm, tres señales quíntuples que integran para dos protones cada uno, a 15632 ppm, 2.179 y 3.157 ppm, tres señales triples que integran para dos protones a 3.216 ppm, 3.308 ppm y 3.666 ppm y una señal séxtuple que integra para dos protones a 1.236 ppm.

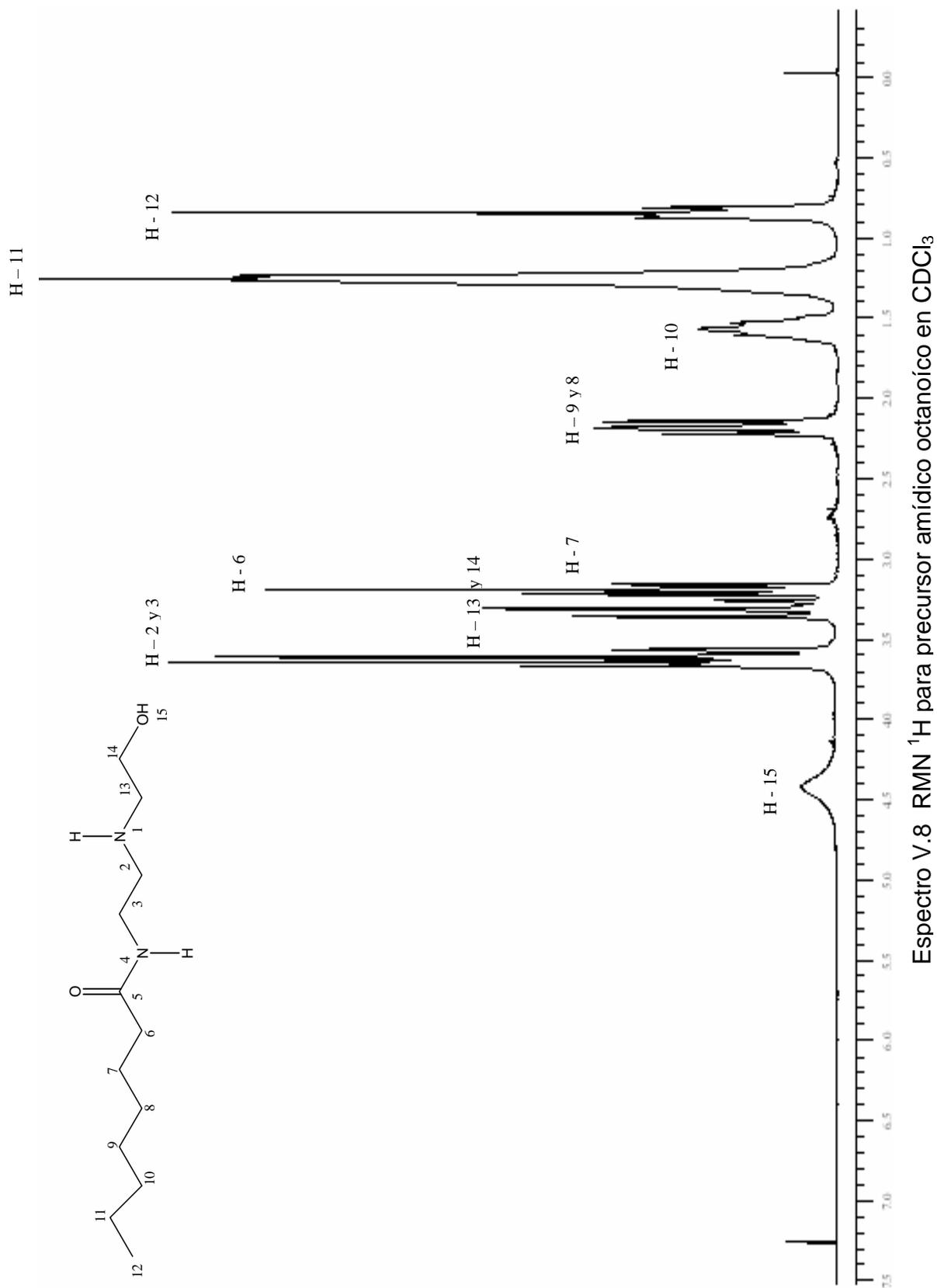
Tabla A3-7 Señales de RMN ^{13}C para el precursor amídico octanoíco.

C	ppm	C	ppm
5	173.925,	7	29.509
2	61.224	8	29.235
3	48.914	9	26.012
13	39.330	10	22.817
14	37.021	11	21.897
6	31.912	12	14.301

Tabla A3-8 Señales de RMN ^1H precursor amídico octanoíco.

H	Tipo de señal	ppm
12	t	0.804
10	q	1.563
9 y 8	q	2.179
7	q	3.157
6	t	3.216
13 y 14	t	3.308
2 y 3	t	3.666
11	s	1.236





Apéndice A-4

Barridos Espectrofotométricos

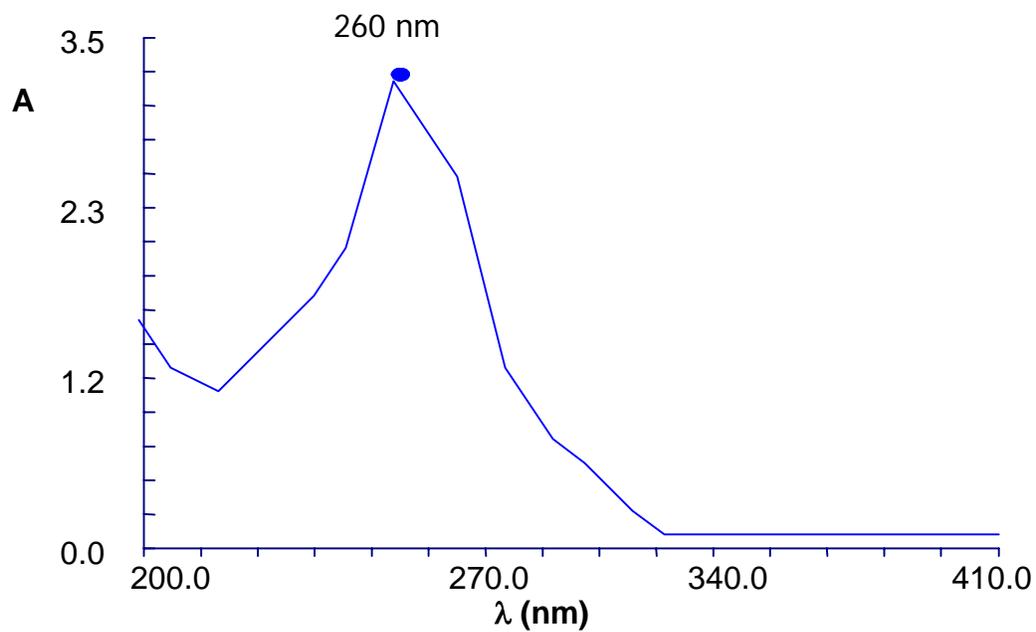


Figura A-4.1 Barrido espectrofotométrico para la imidazolina hexanoíca

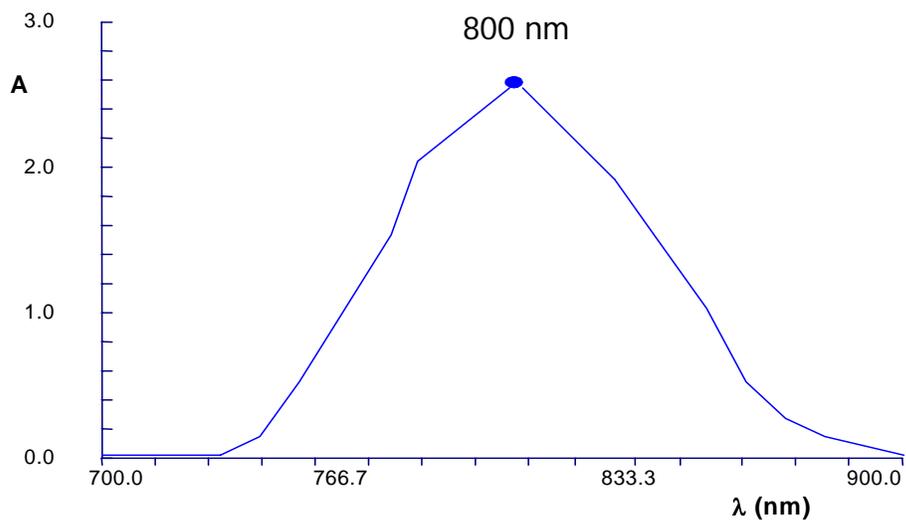


Figura A-4.2 Barrido espectrofotométrico para la sal CuCl₂·2H₂O

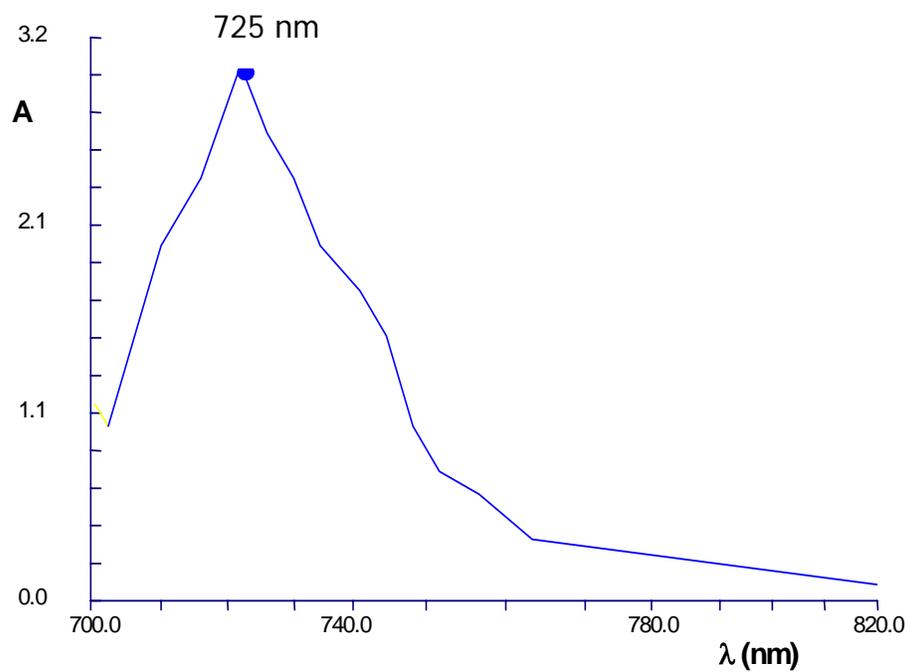


Figura A-4.3 Barrido espectrofotométrico para el complejo imidazolina-
 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

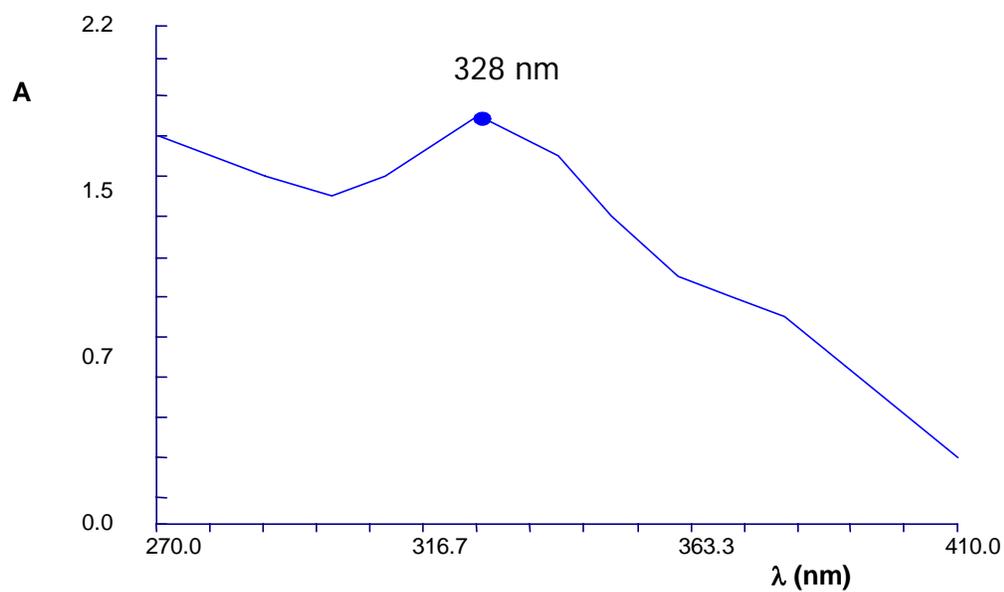


Figura A-4.4 Barrido espectrofotométrico para la sal $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

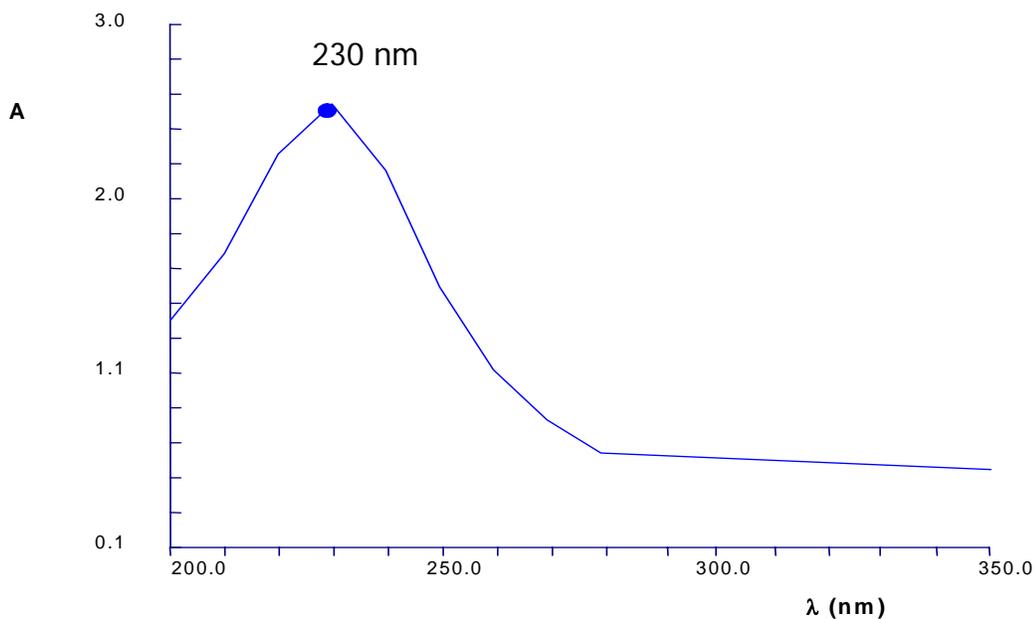


Figura A-4.5 Barrido espectrofotométrico para el complejo imidazolina- FeCl₃·6H₂O

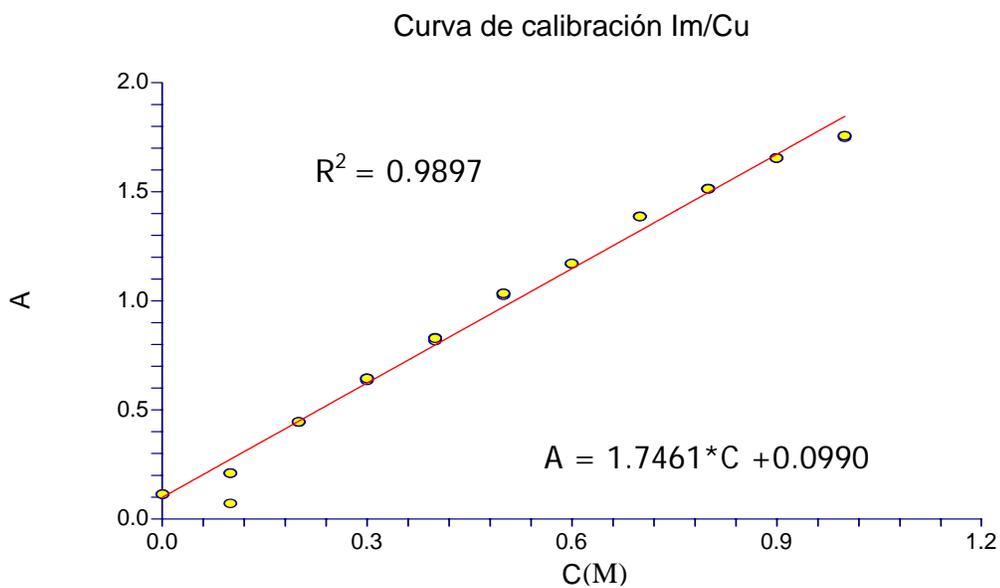


Figura A-4.6 Curva de calibración Imidazolina-CuCl₂·2H₂O

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO VIII

General.

1. ACHENSON, RM. 1976. "An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds", 3a ed., Ed. Wiley-Interscience.
2. ARNOLD E. 1980. "An Introduction to Metallic Corrosion". 3ª ed. Ed. London.
3. BORESTEIN SW. 1994. "Microbiologically influenced corrosion handbook". Ed. Industrial press Inc. New York. 4-16.
4. BROCK TD, MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 1998. "Biología de Microorganismos". 8ª ed. Prentice Hall.
5. PAQUETTE, L.A. 1968. "Principles of modern Heterocyclic Chemistry", 2ª ed, Ed. Wiley-Interscience.
6. PRESCOTT, HARLEY, KLEIN. 1997. "Microbiología", 4ª ed. Mc Graw-Hill, 105-117.
7. SASTRI VS. 1998. "Corrosion Inhibitors. Principles and Applications", Ed, John Wiley & Sons.
8. SEDRIKS, AJ. 1996. "Corrosion of Stainless Steels", 2ª ed., Ed. Wiley-Interscience.
9. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 2001. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Específica.

1. AMES-GOTTFRED NP, CHRISTIE BR, JORDAN DC. 1989. "Use of the chrome azurol S agar plate technique to differentiate strains and field isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*". Applied and Environmental Microbiology **55**(3):707-710.
2. ANDREWS SC, ROBINSON AK, RODRIGUEZ-QUIÑONES F. 2003. "Bacterial iron homeostasis". FEMS Microbiology Reviews **27**(4):215-237.
3. ARNOW LE. 1937. "Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures". Journal of Biological Chemistry **118**:531-537.
4. ATKIN CL, NEILANDS JB, PHAFF J. 1970. "Rhodotorulic acid, from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporodiobolus* and *Sporobolomyces* and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*". Journal of Bacteriology **103**:722-733.
5. BOUAYED M, RABAA H, SRHIRI A, SAILLARD JY. 1999. "ABCDEF". Corrosion Science **41**:501-510.
6. BOUKHALFA H, CRUMBLISS A. 2002. "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport". Biometals Journal **15**(4): 325-339.
7. CALVENTE V, ORELLANO ME, SANSONE G. 2001." A simple plate assay for screening siderophore producer yeast". Journal of the Microbiological Methods **47**:273-279.
8. COWART RE. 2002. "Reduction of iron by extracellular iron reductasas: implications for microbial iron acquisition". Archives of Biochemistry and Biophysics **400**:273-281.
9. COX DC.1994. "Deferration of Laboratory Media and Assays for Ferric and Ferrous Ions". Methods in Enzymology **235** (24):315-329.

10. CRUZ J, MARTÍNEZ R, GENESCA J, GARCIA-OCHOA E. 2004. "Experimental and theoretical study of as an inhibitor of carbon steel corrosion in acid media". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **566**(1):111-121.
11. DUBEY RS, UPADHYAY SN. 1999. "Inhibition effect of pseudomonas fluorescens on the microbiologically influenced corrosion of mild steel". *Indian Journal of Chemical Technology* **6**(4):179-184.
12. GOODELL B, JELLISON J, LIU J, DANIEL G, PASZCZYNSKI A, FEKETE F, KRISHNAMURTHY S, JUN L, XU G. 1997. "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood". *Journal of Biotechnology* **53**: 133-162.
13. GRAHAM HT. 1990. "Chemical inhibitors for corrosion control". *Royal Society of Chemistry* **4**:7-15.
14. GUANG L, KANO H, KAMINO K. 2001. "Effect of Exogenous Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions". *Applied and Environmental Microbiology* **67** (4):1710-1717.
15. GUERINOT ML. 1994. "Microbial Iron Transport". *Annual Review of Microbiology* **48**:743-772.
16. HIDER RC. 1984."Siderophore mediated absorption of iron". *Structure and Bonding* **58**:25-87.
17. KOPTEVA ZHP, ZANINA VV, PILYASHENKO-NOVOKHATNY AI, KOPTEVA AY, KOZLOVA IA. 2001. "Formation of microbial populations on the surface of protective coatings". *Mikrobiologichnyi Zhurna* **63**(2): 3-9.
18. KWONG Y, LI C, HERBERT H, FANG P. 2002. "Anaerobic Electrochemical corrosion of mild steel in the presence of extracellular polymeric substances produced by a

- culture enriched in sulphate-reducing bacteria". Environmental Science Technology **36**: 1720-1727.
19. LEONG SA, NEILANDS JB. 1982. "Siderophore Production by Phytopathogenic Microbial Species". Archives of Biochemistry and Biophysics **218** (2):351-359.
20. MACHUCA A, MILAGRES MF. 2003. "Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*". Letters in Applied Microbiology **36**:177-181.
21. MANNINEN M, MATTILA-SANDHOLM T. 1994. "Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores". Journal of Microbiological Methods **19**(10):223-234.
22. MAURER PJ, MILLER MJ. 1982. "Microbial iron chelators, total synthesis of aerobactin and its constituent amino-acid, N6-acetyl-N6-hydroxyllysine". Journal of the American Chemical Society **104**(11): 3096-3101.
23. MCCAFFERTY E, MCARDLE JV. 1995. "Corrosion inhibition of iron in acid solutions by biological siderophores". Journal of the Electrochemical Society **142**(5):1447-1453.
24. MEYER M, TELFORD JR, COHEN SM, WHITE DJ, XU J, RAYMOND KN. 1997. "High yield synthesis of the enterobactin trilactone and evaluation of derivative siderophore analogs". Journal of the American Chemical Society **119**(42):10093-10103.
25. MILAGRES MF, MACHUCA A. 1999. "Detection of siderophores production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay". Journal of the Microbiological Methods **37**: 1-6.
26. MILLER JH. 1972."Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. 352-355.
27. NEILANDS JB. 1981. "Microbial iron compounds". Annual Review of Biochemistry **7**(2):159-197.

-
-
28. NEILANDS JB. 1993. Perspectives in biochemistry and biophysics, Siderophores". Archives of Biochemistry and Biophysics **302**(1):1-3.
 29. NEILANDS JB. 1995. "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds". The Journal of Biological Chemistry **270**(45):26723-26726.
 30. PATTUS F, ABDALLAH MA. 2000. "Siderophores and iron transport in microorganisms". Journal of the Chinese Chemical Society **47**(1):1-20.
 31. PAYNE SM. 1994. "Detection, isolation and characterization of siderophores". Methods in Enzymology **235**:329-344.
 32. RAYMOND KN, CARRANO CJ. 1979. "Coordination chemistry and microbial iron transport". Accounts of Chemical Research **12**(5):183-190.
 33. RAYMOND KN, MULLER G, MATZANKE BF. 1984. "Complexation of iron by siderophores, a review of their solution and structural chemistry and biological function". Topics in Current Chemistry **123**:49-102.
 34. REDDY CA, BRYANT MP, WOLIN MJ. 1972. "Characteristics of S-organism isolated from Methanobacillus omelianskii". Journal of Bacteriology **109**:539-545.
 35. RENSHAW JC, ROBSON GD, TRINCI APJ, WIEBE MG, LIVENS FR, COLLISON D, TAYLOR RJ. 2002. "Fungal Siderophores: Structures, Functions and Applications". Mycological Research **106**: 1123-1142.
 36. SANDERS PF, HAMILTON WA. 1986. "Biological and corrosion activities of sulphatereducing bacteria in industrial process plan" Biological Corrosion 47-50.
 37. SCHWYN B, NEILANDS JB. 1987. "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores". Analytical Biochemistry **160**: 46-56.
 38. SEIFFERT A, GOEKE K, FIEDLER HP. 1993. "Production of the siderophores enterobactin, use of 4 different fermentation systems and identification of the compound by HPLC". Biotechnology and Bioengineering **41**(2):237-244.

39. STOOKEY LL, 1970."Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron". Analytical Chemistry **42**(7):779-781.
40. SUBRAMANYAM NC, MAYANNA SM. 1985. "Azoles as corrosion inhibitors for mild steel in alkaline mine water". Corrosion Science **25**(3):163-169
41. SUNG HS, YONG SEL, NAM WY. 2000. "CAS agar diffusion for the measurement of siderophores in biological fluids". Journal of Microbiological Methods **44**(1): 89-95.
42. SZYPROWSKI AJ, 2000."Relationship between chemical structure of imidazoline inhibitors and their effectiveness against hydrogen sulphide corrosion of steels". British Corrosion Journal **35**(2):155-160.
43. TOUATI D, 2000."Iron and Oxidative Stress in Bacteria". Archives of Biochemistry and Biophysics **373**(1):1-6.
44. VOLKLAND HP, HARMS H, WANNER O, ZEHNDER AJB. 2001. "Corrosion protection by anaerobiosis". Water Science & Technology **44**(8):103-106.
45. WANG D, LI S, YING Y, WANG M, XIAO H, CHEN Z. 1999. "Theoretical and experimental studies of structure and inhibition efficiency of imidazoline derivates". Corrosion Science **41**(10): 1911-1919.
46. WANG D, WANG Z. 2001."Experimental studies of structure and inhibition efficiency of imidazoline derivates". Science in china **21**(2): 112-116.
47. WINKELMANN G. 1992. "Structure and functions of fungal siderophores containing hidroxamate and complexone type iron binding ligands". Mycology Research **96**(7):529-534.
48. WINKELMANN G. 2002. "Microbial siderophores-mediated transport". Biochemical Society Transactions **30**(4):691-695.

49. WRIGHT AC, SIMPSON LM, RICHARDSON K. 1986. "Siderophore production and outer membrane proteins of selected *Vibrio vulnificus* strains under conditions of iron limitation". FEMS Microbiology Letters **35**:256-260.
50. XUEYUAN Z, FENGPING W, YUFANG H, YUANLONG D. 2001. "Study of inhibition mechanism of imidazoline amide on CO₂ corrosion of Armco iron". Corrosion Science **43** (8):1417-1431.
51. ZAMUDIO RL, ESTRADA A, BENAVIDES A, ESTRADA-BUENDÍA, BENÍTEZ JL. 2002. "Corrosion control of carbon steel in sulfuric acid environment by 1-(2-hydroxyethyl)-2-alkylimidazolines and its corresponding amide precursors". Revista de la Sociedad Química de México **46**(4), 335-340.